

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 814 280**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2010.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2015** **PCT/US2015/027598**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015** **WO15164789**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2015** **E 15782332 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020** **EP 3133923**

54 Título: **Terapia génica basada en VAA para la esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

24.04.2014 US 201461983924 P

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

26.03.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.0%)
223 Grinter Hall
Gainesville, FL 32611, US**

72 Inventor/es:

HOFFMAN, BRAD, E.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 814 280 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

Terapia génica basada en VAA para la esclerosis múltiple

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio bajo la 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud provisional de EE. UU. número 61/983.924, presentada el 24 de abril de 2014.

10 Campo de la divulgación

La presente divulgación se refiere generalmente a los campos de la biología molecular y la virología, y en particular, al desarrollo de vectores de terapia génica y métodos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como la esclerosis múltiple (MS).

15 Antecedentes

Esclerosis múltiple (MS). La MS es una enfermedad desmielinizante multifocal con una neurodegeneración progresiva causada por una respuesta autoinmunitaria a autoantígenos en individuos genéticamente susceptibles. Dependiendo de donde se produzca el daño del SNC, los síntomas pueden incluir problemas con el control muscular, el equilibrio, la visión, o el habla. De 250.000 a 350.000 personas en los EE. UU. La MS es una enfermedad autoinmunitaria que se desarrolla (en parte) a partir de un fallo de los mecanismos de tolerancia centrales y periféricos (particularmente los reguladores T) para mantener la auto tolerancia y el control de los linfocitos autorreactivos potencialmente patógenos.^{2,3} Se caracteriza por la infiltración linfocítica crónica y la inflamación del SNC dando como resultado la desmielinización.

Terapia génica. Los grandes avances en el campo de la terapia génica se han logrado usando virus para suministrar material genético terapéutico. El virus adenoasociado (VAA) ha atraído una atención considerable como un vector viral altamente eficaz para la terapia génica debido a su baja inmunogenicidad y capacidad para transducir de manera eficaz células que no se encuentran en división. Se ha demostrado que los VAA infectan a varios tipos de células y tejidos y se han hecho avances significativos durante la última década para adaptar este sistema viral para su uso en terapia génica humana.

En esta forma de "tipo silvestre" normal, el ADN de VAA recombinante se empaqueta en la cápside viral en forma de una molécula monocatenaria de aproximadamente 4600 nucleótidos (nt) de longitud. Después de la infección de las células por el virus, la maquinaria molecular de la célula convierte el ADN monocatenario en una forma bicatenaria. Solo esta forma de ADN bicatenario puede ser transcrita por enzimas celulares en ARN, que después se traduce en polipéptidos por vías celulares adicionales.

40 Breve resumen de la divulgación

Lo que falta específicamente en la técnica anterior, sin embargo, son métodos de terapia génica basada en vectores víricos para el tratamiento y/o la mejoría de uno o más de los síntomas de enfermedades autoinmunitarias, incluyendo, por ejemplo, la MS. El desarrollo de dichos vectores y las composiciones que los comprenden proporcionaría un gran avance en la medicina, y particularmente en el desarrollo de una modalidad de tratamiento basado en la terapia génica para la MS. La presente invención está definida en las reivindicaciones adjuntas y se refiere a vectores de ácido nucleico vírico adenoasociado recombinante (VAAr), partículas de VAAr, vectores VAAr y partículas de VAAr para su uso en medicina, y vectores VAAr y partículas de VAAr para su uso en el tratamiento o mejoría de uno o más síntomas de una enfermedad autoinmunitaria en un mamífero. Las realizaciones de la invención se describen en los siguientes párrafos numerados:

(1). Un vector de ácido nucleico vírico adenoasociado recombinante (VAAr) con el serotipo VAA8 que comprende: un polinucleótido que incluye un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína básica de mielina (MBP) de mamífero de longitud completa, una proteína proteolipídica (PLP), o una glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) unido operativamente a un promotor que es capaz de expresar el segmento de ácido nucleico en una o más células del hígado de un mamífero.

(2). El vector de ácido nucleico de VAAr del párrafo 1, en el que la MBP, PLP o MOG son de origen humano.

(3). El vector de ácido nucleico de VAAr del párrafo 1, en el que el segmento de ácido nucleico codifica una proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolipídica (PLP), O glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3.

(4). El vector de ácido nucleico de VAAr de uno cualquiera de los párrafos 1 a 3, en el que el segmento de ácido nucleico comprende además un amplificador, una secuencia reguladora postranscripcional, una señal de

poliadenilación, o cualquier combinación de los mismos, unidos operativamente al segmento de ácido nucleico que codifica la molécula terapéutica.

(5). El vector de ácido nucleico de VAAr de uno cualquiera de los párrafos 1 a 4, en el que el promotor es específico de células de mamífero o un promotor específico de tejido de mamífero.

(6). El vector de ácido nucleico de VAAr de uno cualquiera de los párrafos 1 a 5, en el que el segmento de ácido nucleico además codifica o expresa adicionalmente un polipéptido, un péptido, una ribozima, un ácido nucleico peptídico, un ARNip, un ARNi, un oligonucleótido antisentido, un polinucleótido antisentido, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, o cualquier combinación de los mismos.

(7). Una partícula de VAAr, que comprende el vector de ácido nucleico de VAAr de uno cualquiera de los párrafos 1 a 6.

(8). El vector de ácido nucleico de VAAr de uno cualquiera de los párrafos 1 a 6, o la partículas de VAAr del párrafo 7 para su uso en medicina.

(9). El vector de ácido nucleico de VAAr de uno cualquiera de los párrafos 1 a 6 o la partícula de VAAr del párrafo 7 para su uso en el tratamiento o la mejoría de uno o más de los síntomas de una enfermedad autoinmunitaria en un mamífero, en el que el vector de ácido nucleico de VAAr o la partícula de VAAr se administran de manera sistémica al mamífero, en una cantidad y durante un tiempo suficientes para tratar o mejorar el uno o más síntomas de la enfermedad autoinmunitaria en el mamífero, en el que la enfermedad autoinmunitaria es la esclerosis múltiple, la esclerosis diseminada, o la encefalomiелitis diseminada.

(10). El vector de ácido nucleico de VAAr o la partícula de VAAr para su uso de acuerdo con el párrafo 9, en el que el mamífero es un recién nacido, un lactante, un joven o un adulto joven.

(11). El vector de ácido nucleico de VAAr o la partícula de VAAr para su uso de acuerdo con el párrafo 9 o el párrafo 10, en el que la producción de la molécula terapéutica en el mamífero reduce la inflamación del SNC, inhibe la desmielinización, restablece la tolerancia inmunitaria frente a una o más neuroproteínas, estimula la producción de células T reguladoras específicas de antígenos endógenos, o cualquier combinación de estos.

(12). El vector de ácido nucleico de VAAr o la partícula de VAAr para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 9 a 11, en el que el vector VAAr codifica además un agonista, un antagonista, un factor anti apoptosis, un inhibidor, un receptor, una citocina, una citotoxina, un agente eritropoyético, una glucoproteína, un factor de crecimiento, un receptor del factor de crecimiento, una hormona, un receptor hormonal, un interferón, una interleucina, un receptor de interleucina, un factor de crecimiento nervioso, un péptido neuroactivo, un receptor de péptido neuroactivo, una proteasa, un inhibidor de proteasa, una proteína descarboxilasa, una proteína cinasa, un inhibidor de proteína cinasa, una enzima, una proteína de unión al receptor, una proteína de transporte o un inhibidor de la misma, un receptor de serotonina, o un inhibidor de captación de la misma, una serpina, un receptor de serpina, un supresor tumoral, un quimioterapéutico, o cualquier combinación de los mismos.

(13). El vector de ácido nucleico de VAAr del párrafo 2, en el que el segmento de ácido nucleico codifica una proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolípida (PLP), O glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 29 o la SEQ ID NO: 15.

(14). El vector de ácido nucleico de VAAr del párrafo 2, en el que el segmento de ácido nucleico codifica una proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolípida (PLP), o glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 29 o la SEQ ID NO: 15.

La presente divulgación supera estas y otras limitaciones inherentes en la técnica anterior proporcionando, en parte, nuevos vectores de ácido nucleico VAA que son capaces de, y están optimizados para, la expresión dirigida en el hígado de proteínas de longitud completa tales como neuroproteínas (incluyendo, sin limitación, MOG, PLP, y MBP) o fragmentos funcionales de las mismas, anulando de esta manera la necesidad de identificar epítomos específicos del HLA-MHC necesarios para inducir los reguladores T específicos del antígeno. En algunas opciones, la divulgación permite que cada paciente se someta a un tratamiento para generar sus propios reguladores T específicos de antígeno únicos, lo que hace que el tratamiento sea más aplicable universalmente y más fiable clínicamente que las tecnologías existentes.

Hay 2 millones de personas viviendo con la MS en todo el mundo. El diagnóstico se produce generalmente en edades de 20 a 40 años, pero se han documentado casos de MS que se han registrado en niños hasta de dos años. La enfermedad de Schilder es un trastorno desmielinizante progresivo raro que comienza habitualmente en la niñez. Aunque actualmente no hay cura para la MS, existen varias opciones de tratamiento para la MS que presentan una disminución de la gravedad y frecuencia de las recaídas y un retraso en la progresión de la enfermedad en numerosos

estudios. Las terapias con propiedades predominantemente inmunomoduladoras incluyen, por ejemplo, interferones beta y acetato de Glitiramer. Las terapias con propiedades predominantemente inmunosupresoras incluyen, por ejemplo, natalizumab, Fingolimod, y Mitoxantrona. El desarrollo de protocolos que estimulen el número de reguladores T y/o su función se ha convertido en un foco significativo en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. De hecho, muchos de los efectos beneficiosos de los inmunomoduladores aprobados actualmente por la FDA que se utilizan en el tratamiento de la MS se asocian con la restauración de la homeostasis de los reguladores T.^{2,4,5}

La terapia génica con VAA ha demostrado ser una nueva herramienta poderosa para el tratamiento de una amplio espectro de enfermedades, incluyendo la recuperación de la vista en pacientes con amaurosis congénita de Leber mediante transferencia génica retiniana, y la hemofilia B mediante terapia génica.^{6,7} De acuerdo con aspectos de la divulgación, se ha demostrado que la terapia génica hepática de transferencia con vectores VAA puede inducir fácilmente una tolerancia inmunitaria específica del antígeno robusta en los animales de experimentación frente a varias proteínas incluso cuando el antígeno se expresa posteriormente de una manera altamente inmunógena en otros órganos. En conjunto, estos resultados demuestran que la terapia génica dirigida al hígado puede anular respuestas de células T CD8⁺ potencialmente citotóxicas.^{1,8-13} De manera importante, también se ha demostrado que este protocolo puede eliminar incluso los anticuerpos preexistentes.¹ Este hallazgo es bastante significativo ya que hay una evidencia creciente de que las células B y los autoanticuerpos pueden tener un papel patogénico en la enfermedad desmielinizante.^{14,15} Otros han demostrado que los ratones transgénicos o la transitoria mediante plásmidos o vectores Ad que expresen proteína básica de mielina pudrían prevenir la aparición de la enfermedad EAE en los ratones.^{16,17} La supresión era dependiente de la expresión génica hepática y estaba mediada por la inducción de reguladores T específicos de antígeno. Por el contrario, hay aspectos de la divulgación que se refieren al tratamiento de ciertas afecciones autoinmunitarias, por ejemplo, la MS, que utilizan el suministro con VAA de ácidos nucleicos que codifican una o más proteínas del huésped al hígado.

La expresión transgénica restringida a hepatocitos a partir de un vector de VAA optimizado puede inducir fácilmente una tolerancia inmunitaria frente a distintas proteínas terapéuticas (por ejemplo, mediadas por reguladores T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ específicos de antígeno). El procedimiento suprime la formación de anticuerpos y las respuestas de células T CD8⁺ citotóxicas contra el producto transgénico. La expresión transgénica hepática se mantiene incluso cuando el antígeno se expresó posteriormente de una manera altamente inmunogénica en otros órganos. El procedimiento invierte eficaz y rápidamente los altos títulos de anticuerpo preexistentes, y proporciona una corrección a largo plazo de la homeostasis en un modelo murino de hemofilia B. De manera importante, el método no necesita que se secreten proteínas para ser funcional.

En algunas opciones, ventajosamente, los nuevos vectores de ácido nucleico de VAAr, expresan construcciones, y viriones y partículas víricas infecciosas que las comprenden como se desvela en el presente documento tienen una eficacia mejorada para la transducción de una o más células hepáticas de mamífero para proporcionar una expresión persistente de uno o más genes de interés.

Los vectores de ácido nucleico de VAAr que se proporcionan en el presente documento transducen preferentemente células de mamífero con una eficacia de transducción suficiente para suprimir la respuesta inmunitaria asociada con la MS en los pacientes, y de esta manera impedir la inflamación del SNC, y el daño mediado inmunitariamente que se produce en los pacientes con MS. A diferencia de las terapias actuales, esta estrategia basada en la terapia génica representa un tratamiento persistente, a largo plazo que reduce la incapacidad clínica que experimentan los pacientes de MS.

En algunas opciones, la divulgación proporciona partículas de VAAr, mejoradas que incluyen las que se derivan de uno o más serotipos que se conocen en la técnica (que incluyen, por ejemplo, los seleccionados de entre el grupo que consiste en VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAA10, VAA11, y VAA12).

La presente descripción también se refiere a vectores de ácido nucleico de VAAr, en los que el segmento de ácido nucleico comprende además un promotor, un amplificador, una secuencia reguladora postranscripcional, una señal de poliadenilación, o cualquier combinación de los mismos, unidos operativamente al segmento de ácido nucleico que codifica el polinucleótido de interés seleccionado.

En ciertas opciones, los segmentos de ácido nucleico clonados en los nuevos vectores de expresión de VAAr descritos en el presente documento expresarán o codificarán uno o más polipéptidos, péptidos, ribozimas, ácidos peptidonucleicos, ARNip, ARNi, oligonucleótidos antisentido, polinucleótidos antisentido, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, o cualquier combinación de los mismos.

Como se observa en el presente documento, los agentes terapéuticos útiles en la divulgación pueden incluir uno o más agonistas, antagonistas, factores anti apoptosis, inhibidores, receptores, citoquinas, citotoxinas, agentes eritropoyéticos, glucoproteínas, factores de crecimiento, receptores del factor de crecimiento, hormonas, receptores hormonales, interferones, interleucinas, receptores de interleucina, factores de crecimiento nervioso, péptidos neuroactivos, receptores de péptidos neuroactivos, proteasas, inhibidores de proteasas, proteínas descarboxilasas, proteínas cinasas, inhibidores de proteína cinasa, enzimas, proteínas de unión al receptor, proteínas de transporte o uno o más inhibidores de las mismas, receptores de serotonina, o uno o más inhibidores de la captación de la misma,

serpinas, receptores de serpina, supresores tumorales, moléculas de diagnóstico, agentes quimioterapéuticos, citotoxinas, o cualquier combinación de los mismos.

Los vectores de ácido nucleico de VAAr de la presente divulgación pueden estar comprendidos dentro de un virión o partícula vírica que tenga un serotipo que se selecciona de entre el grupo que consiste en el serotipo 1 de VAA (VAA1), serotipo 2 de VAA (VAA2), serotipo 3 de VAA (VAA3), serotipo 4 de VAA (VAA4), serotipo 5 de VAA (VAA5), serotipo 6 de VAA (VAA6), serotipo 7 de VAA (VAA7), serotipo 8 de VAA (VAA8), serotipo 9 de VAA (VAA9), serotipo 10 de VAA (VAA10), serotipo 11 de VAA (VAA11), o serotipo 12 de VAA (VAA12), o cualquier otro serotipo que conozca un experto habituado en la técnica vírica.

En opciones relacionadas, la divulgación proporciona adicionalmente poblaciones y pluralidades de vectores de ácido nucleico de VAAr, viriones, partículas víricas infecciosos, o células huésped que incluyen uno o más segmentos de ácido nucleico que codifican un agente terapéutico de una enfermedad autoinmunitaria.

La divulgación proporciona adicionalmente composiciones y formulaciones que incluyen una o más de las proteínas, segmentos de ácido nucleico, vectores víricos, células huésped, o partículas víricas de la presente divulgación junto con uno o más tampones, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones pueden incluirse en uno o más kits de diagnóstico o terapéuticos, para diagnosticar, la prevención, el tratamiento o mejoría de uno o más síntomas de una enfermedad inflamatoria de mamífero, tal como una enfermedad autoinmunitaria, y en particular, para el suministro de un agente terapéutico para el tratamiento de la MS en un ser humano.

La divulgación incluye además un método para proporcionar a un mamífero que lo necesite una cantidad diagnóstica o terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico seleccionado, comprendiendo el método la administración a una célula, tejido u órgano de un mamífero que lo necesite, de una cantidad de uno o más de los vectores de ácido nucleico de VAAr; y durante un tiempo eficaz para proporcionar al mamífero una cantidad diagnóstica o terapéuticamente eficaz del agente terapéutico seleccionado.

La divulgación proporciona además un método para diagnosticar, la prevención, tratar o mejorar al menos uno o más síntomas de una enfermedad, un trastorno, una disfunción, una lesión, una afección anormal, o un trauma en un mamífero. En un sentido global y general, el método incluye al menos la etapa de administración a un mamífero que lo necesite uno o más de los vectores de ácido nucleico de VAAr desvelados, en una cantidad y durante un tiempo suficientes para diagnosticar, prevenir, tratar o mejorar el uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno, disfunción, lesión, afección anormal o traumatismo en el mamífero.

La divulgación también proporciona un método de transducción de una población de células de mamífero. En un sentido global y general, el método incluye al menos la etapa de introducir en una o más células de la población, una composición que comprende una cantidad eficaz de uno o más vectores de ácido nucleico de VAAr desvelados en el presente documento.

En algunas opciones, la divulgación también proporciona segmentos aislados de ácido nucleico que codifican una o más de las construcciones de terapia génica basada en vectores como se describe en el presente documento, y proporciona vectores recombinantes, partículas víricas, viriones infecciosos, y células huésped aisladas que comprenden uno o más de los vectores de ácido nucleico de VAAr descritos en el presente documento.

De manera adicional, la presente divulgación proporciona composiciones, así como kits terapéuticos y/o de diagnóstico que incluyen una o más de las composiciones de vector de ácido nucleico de VAA o partículas de VAA divulgadas, formuladas con uno o más ingredientes adicionales, o preparadas con una o más instrucciones para su uso.

En un aspecto, la divulgación proporciona composiciones que comprenden vectores de ácido nucleico vírico adenoasociado (VAA) recombinantes, viriones, partículas víricas y formulaciones farmacéuticas de los mismos, útiles en métodos para administrar material genético que codifica uno o más productos beneficiosos o terapéuticos a células y tejidos de mamífero. En algunas opciones, las composiciones y métodos de la divulgación proporcionan un avance significativo en la técnica a través de su uso en el tratamiento, prevención y/o mejoría de los síntomas de una o más enfermedades inflamatorias de los mamíferos, incluyendo las enfermedades autoinmunitarias tales como la MS y similares.

En algunas opciones, la divulgación proporciona construcciones de expresión basadas en VAAr que codifican uno o más agentes terapéuticos de mamíferos (incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, proteína(s), polipéptido(s), péptido(s), enzima(s), anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, así como variantes, y/o fragmentos activos de los mismos), para su uso en el tratamiento, profilaxis, y/o mejoría de uno o más síntomas de una enfermedad, disfunción, lesión y/o trastorno de los mamíferos.

Los vectores de ácido nucleico y sistemas de expresión mejorados de la presente divulgación también pueden incluir opcionalmente además un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, uno o más poli enlazadores, sitios de restricción, y/o una o más regiones de clonación múltiple para facilitar inserción (clonación) de uno o más elementos genéticos seleccionados, genes de interés, o construcciones terapéuticas o de diagnóstico en

el vector VAAr en un sitio seleccionado dentro del vector.

En aspectos adicionales de la presente divulgación, los polinucleótidos exógenos que pueden suministrarse en las células huésped mediante los vectores de ácido nucleico de VAAr divulgados en el presente documento preferentemente son de origen mamífero, siendo particularmente preferidos los polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos o péptidos de origen humano, de un primate no humano, porcino, bovino, ovino, felino, canino, equino, caprino, o lupino.

Los polinucleótidos exógenos que pueden suministrarse en las células huésped mediante los vectores de ácido nucleico vírico desvelados pueden, en ciertas opciones, codificar una o más proteínas, uno o más polipéptidos, uno o más péptidos, una o más enzimas, o uno o más anticuerpos (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos), o como alternativa, pueden expresar uno o más ARNip, ribozimas, oligonucleótidos antisentido, moléculas de PNA, o cualquier combinación de los mismos. Cuando se desean terapias genéticas combinacionales, pueden producirse dos o más moléculas diferentes a partir de un único sistema de expresión de VAAr, o como alternativa, una célula huésped seleccionada puede transfectarse con dos o más sistemas de expresión únicos de VAAr, cada uno de los cuales puede comprender uno o más polinucleótidos distintos que codifican un agente terapéutico.

En otras opciones, la divulgación también proporciona vectores de ácido nucleico de VAAr que están comprendidos dentro de una partícula vírica adenoasociada infecciosa o un virión, así como pluralidades de dichos viriones o partículas infecciosas. Dichos vectores, partículas y viriones pueden estar comprendidos dentro de uno o más diluyentes, tampones, soluciones fisiológicas o vehículos farmacéuticos, o formulados para la administración a un mamífero en uno o más regímenes diagnósticos, terapéuticos y/o profilácticos. Los vectores, partículas víricas, viriones, y una pluralidad de los mismos de la presente divulgación también se pueden proporcionar en formulaciones de excipientes que son aceptables para la administración veterinaria al ganado seleccionado, animales exóticos, animales domésticos y animales de compañía (incluidas mascotas y similares), así como a primates no humanos, especímenes de zoológico o cautivos de otra manera, y similares.

La divulgación también se refiere a células huésped que comprenden al menos uno de los vectores de expresión de ácido nucleico de VAAr desvelados, o una o más partículas víricas o viriones que comprendan dicho vector de expresión. Dichas células huésped son particularmente células huésped de mamífero, siendo las células hepáticas humanas altamente preferidas de manera particular, y que pueden estar aisladas, en cultivo celular o tisular. En el caso de modelos animales genéticamente modificados, las células huésped transformadas pueden incluso estar comprendidas dentro del propio cuerpo del animal no humano.

Las composiciones que comprenden uno o más de los vectores de ácido nucleico de VAAr desvelados, sistemas de expresión, partículas de VAAr infecciosas, o las células huésped también forman parte de la presente divulgación, y particularmente las composiciones que comprenden adicionalmente al menos un primer excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en terapia, y para su uso en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de una o más enfermedades inflamatorias, trastornos, disfunciones o traumatismos de los mamíferos. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender opcionalmente además uno o más diluyentes, tampones, liposomas, un lípido, un complejo lipídico. De manera alternativa, los vectores de ácido nucleico de VAAr o las partículas de VAAr de la presente divulgación pueden estar comprendidos dentro de una pluralidad de microesferas, nanopartículas, liposomas o cualquier combinación de los mismos.

Los kits que comprenden una o más de los vectores de ácido nucleico de VAAr desvelados (así como uno o más viriones, partículas víricas, células huésped transformadas o composiciones farmacéuticas que comprenden dichos vectores, viriones, partículas o células huésped); y las instrucciones para la utilización de dichos kits en uno o más opciones clínicas terapéuticas, diagnósticas, y/o profilácticas también se proporcionan en la presente divulgación. Dichos kits pueden comprender además uno o más reactivos, enzimas de restricción, péptidos, agentes terapéuticos, compuestos farmacéuticos, o medios para administrar la composición o composiciones a las células huésped, o a un animal (por ejemplo, jeringas, inyectables y similares). Los kits a modo de ejemplo incluyen aquellos para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de una enfermedad, deficiencia, disfunción y/o lesión, o pueden incluir componentes para la producción a gran escala de los propios vectores virales, tal como para la venta comercial o para su uso por otros, incluyendo, por ejemplo, virólogos, profesionales médicos y similares.

Otro aspecto importante de la presente divulgación se refiere a métodos de uso de los vectores de ácido nucleico de VAAr desvelados, viriones, sistemas de expresión, composiciones y células huésped descritas en el presente documento en la preparación de medicamentos para el diagnóstico, la prevención, el tratamiento o la mejoría de al menos uno o más síntomas de una enfermedad, una disfunción, un trastorno, una afección anormal, una deficiencia, lesión, o traumatismo en un animal y, en particular, una o más enfermedades autoinmunitarias de los seres humanos.

Las composiciones que comprenden uno o más de los vectores de ácido nucleico de VAAr desvelados, sistemas de expresión, partículas de VAAr infecciosas, y células huésped también forman parte de la presente divulgación, y particularmente las composiciones que comprenden además al menos un primer excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en la fabricación de medicamentos y métodos que implican la administración terapéutica de dichos vectores nucleicos de VAAr, partículas de VAAr, y células huésped.

Otro aspecto importante de la presente divulgación se refiere a los métodos de uso de los vectores de ácido nucleico desvelados, viriones, sistemas de expresión, composiciones, y células huésped descritas en el presente documento en la preparación de medicamentos para el tratamiento o la mejoría de los síntomas de distintas enfermedades autoinmunitarias, tales como la MS, en un mamífero, y en particular uno o más de dichas enfermedades en un ser humano.

En algunas opciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el método comprende además la administración de un inhibidor mTOR, por ejemplo, rapamicina.

Breve descripción de los dibujos

Para promover una comprensión de los principios de la divulgación, ahora se hará referencia a las opciones, o ejemplos, ilustrados en los dibujos y se utilizará un lenguaje específico para describirlos. Se entenderá, no obstante, que no se pretende por ello la limitación del alcance de la divulgación.

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar ciertos aspectos de la presente divulgación. La divulgación puede entenderse mejor haciendo referencia a la siguiente descripción tomada en conjunto con los dibujos adjuntos, en los que los números de referencia similares identifican elementos similares, y en los que:

La **FIG. 1** describe aspectos de un modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental empleado en el presente estudio como un modelo animal de la MS;

La **FIG. 2A** y **FIG. 2B** muestran un modelo de ratón y los criterios clínicos de puntuación media para el estudio de la EAE;

La **FIG. 3** muestra una comparación de los métodos a modo de ejemplo de la presente divulgación en comparación con los métodos de suministro basados en células de la técnica anterior;

La **FIG. 4A** y la **FIG. 4B** muestran la expresión por el VAA8 de MOG. La **FIG. 4A** muestra el análisis de transferencia de Western de la proteína extraída del hígado, mientras que la **FIG. 4B** muestra el análisis de los niveles transcripcionales utilizando una RT-PCR en tiempo real;

La **FIG. 5A** muestra la puntuación clínica media de ratones con EAE. Cinco ratones hembra se inyectaron s.c. con una emulsión de Ag/CFA. Se registró la puntuación clínica media ($\pm$ SEM) comenzando el día 12;

La **FIG. 5B** muestra la puntuación clínica media de ratones con EAE. Cinco ratones hembra C57BL/6 se inyectaron s.c. con una emulsión de MOG/CFA. Se registró la puntuación clínica media ($\pm$ SEM);

La **FIG. 6A**, la **FIG. 6B**, y la **FIG. 6C** muestran cómo se previene el desarrollo de EAE con VAA8-MOG en ratones C57BL/6. Se inyectaron ratones C57BL/6, (n=5) con VAA8-MOG o el control. Se indujo la EAE 2 semanas después. **FIG. 6A:** Puntuación clínica media, **FIG. 6B:** IgG1 anti-MOG, **FIG. 6C:** IgG2c anti-MOG;

La **FIG. 7A**, la **FIG. 7B**, y la **FIG. 7C** muestran que la terapia génica con el vector VAA8 evita la aparición de EAE en el modelo animal de MS;

La **FIG. 8** muestra que VAA8-MOG mejoraba la enfermedad en el modelo animal de MS;

La **FIG. 9** muestra un grupo de control intacto con EAE inducida con PLP para demostrar la progresión de la enfermedad;

La **FIG. 10** muestra la supresión eficaz de una enfermedad preexistente utilizando el tratamiento con MOG vehiculada con VAA8;

La **FIG. 11** muestra la expresión transgénica hepática de MOG. Análisis de transferencia de Western de la proteína extraída del hígado de ratones con EAE inducida con MOG inyectados con VAA8-MOG;

La **FIG. 12** muestra la tinción con Luxol azul rápido (LFB) de las médulas espinales de ratones que recibieron VAA8-GFP y tenían EAE inducida (A) o no (B);

La **FIG. 13A** muestra la puntuación clínica media (MCS) en ratones C57BL/6 con EAE inducida que recibieron VAA8-MOG o el vector de control después de que los ratones alcanzaran una MCS de aproximadamente 0,3. Los gráficos de barras muestran la significación estadística entre las puntuaciones finales y las puntuaciones pico-a-final;

La **FIG. 13B** muestra la puntuación clínica media (MCS) en ratones C57BL/6 con EAE inducida que recibieron VAA8-MOG o el vector de control después de que los ratones alcanzaran una MCS de aproximadamente 0,8. Los gráficos de barras muestran la significación estadística entre las puntuaciones finales y las puntuaciones pico-a-final;

La **FIG. 13C** muestra la puntuación clínica media (MCS) en ratones C57BL/6 con EAE inducida que recibieron VAA8-MOG o el vector de control después de que los ratones alcanzaran una MCS de aproximadamente 1,3. Los gráficos de barras muestran la significación estadística entre las puntuaciones finales y las puntuaciones pico-a-final;

Las **FIG. 14A** y **14B** muestran secciones en serie de la médula espinal de un ratón hembra con EAE inducida ~35 días después de recibir el vector de control (MCS = 4,0). La **FIG. 14A** es una tinción de hematoxilina y eosina que presenta áreas de alta infiltración inflamatoria. La **FIG. 14B** es una tinción de Luxol azul rápido que muestra áreas de desmielinización. Las áreas en los círculos resaltan la co-localización de inflamación y pérdida de mielina;

Las **FIG. 15A** y **15B** muestran secciones en serie de la médula espinal de un ratón hembra con EAE inducida ~35 días después de recibir el vector VAA-MOG. (MCS = 1,25) La **FIG. 15A** es una tinción con hematoxilina y eosina

que presenta una disminución de la infiltración. La FIG. 15B es una tinción con Luxol azul rápido que parece demostrar que la sección tiene menos áreas de desmielinización como resultado de la supresión de la inflamación; Las FIG. 16A y 16B muestran que los reguladores T aislados de los bazo de los ratones tratados con VAA-MOG son funcionalmente supresores; La FIG. 17A, 17B, 17C y 17D muestran que el vector VAA-MOG induce reguladores T específicos de antígeno. Los esplenocitos de los ratones inyectados con el vector VAA-MOG 8 semanas antes presentaban un aumento de la frecuencia de tetrámero positivo CD4+ I-Ab MOG₃₅₋₅₅ (FIG. 17A) y reguladores T+ (FIG. 17C) en comparación con el tetrámero positivo CD+ de control (FIG. 17B) y reguladores T+ (FIG. 17D).

La FIG. 18 muestra que el VAA8-PLP reduce la gravedad clínica en ratones con EAE en remisión-recaída inducida por PLP;

La FIG. 19A muestra un análisis de transferencia de Western de la proteína extraída del hígado de los ratones inyectados con VAA-MBP; y la FIG. 19B muestra el análisis de los niveles transcripcionales de ARN obtenidos del hígado de ratones tratados con VAA-MBP o los controles mediante RT-PCR en tiempo real.

Descripción detallada

Los vectores de virus adenoasociados recombinantes (VAA) se han usado con éxito para la transferencia de genes *in vivo* en numerosos modelos animales preclínicos de enfermedad humana, y se han usado con éxito para la expresión a largo plazo de una amplia diversidad de genes terapéuticos (Daya y Berns, 2008; Niemeyer *et al.*, 2009; Owen *et al.*, 2002; Keen-Rhinehart *et al.*, 2005; Scallan *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2004). Los vectores VAA también han generado un beneficio clínico a largo plazo en seres humanos cuando se dirigen a sitios con privilegios inmunitarios, por ejemplo, el suministro ocular para la amaurosis congénita de Leber (Bainbridge *et al.*, 2008; Maguire *et al.*, 2008; Cideciyan *et al.*, 2008). Una ventaja importante de este vector es su perfil inmunitario comparativamente bajo, que provoca respuestas inflamatorias limitadas y, en algunos casos, dirigiendo la tolerancia inmunitaria incluso a los productos transgénicos (LoDuca *et al.*, 2009). No obstante, la eficacia terapéutica, cuando se dirige a órganos con privilegiados no inmunes, se ha limitado en seres humanos debido a las respuestas de anticuerpos y células T CD8⁺ contra la cápside vírica, mientras que en modelos animales, también se ha informado de respuestas adaptativas al producto transgénico (Manno *et al.*, 2006; Mingozi *et al.*, 2007; Muruve *et al.*, 2008; Vandenberghe y Wilson, 2007; Mingozi y High, 2007).

En algunas opciones, un vector de ácido nucleico de VAAr descrito en el presente documento comprende secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR), tales como las derivadas de un genoma de VAA de tipo silvestre, tal como el genoma de VAA2. En algunas opciones, el vector de ácido nucleico de VAAr comprende además un segmento de ácido nucleico que incluye un transgén (al que también se hace referencia como molécula de ácido nucleico heterólogo) unido operativamente a un promotor y opcionalmente, a otros elementos reguladores, en los que las ITR flanquean el segmento de ácido nucleico.

En algunas opciones, el promotor es un promotor específico de células de mamífero o un promotor específico de tejido de mamífero. En algunas opciones, el promotor es un promotor que es capaz de expresar el segmento de ácido nucleico en una o más células del hígado de un mamífero, tales como los hepatocitos. Los promotores específicos de hepatocitos y los elementos amplificadores a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, los promotores o elementos amplificadores de la albúmina, la α 1-antitripsina humana (hAAT), transtiretina (TTR), y apolipoproteína E (apoE).

En algunas opciones, el transgén codifica una molécula terapéutica de interés para una enfermedad autoinmunitaria, tal como una proteína básica de mielina (MBP) de mamífero, proteína proteolipídica (PLP), o glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG). Como se utiliza en el presente documento, una molécula terapéutica autoinmunitaria incluye cualquier antígeno (tal como una proteína, un fragmento de la misma, o un péptido que contribuye al inicio y/o progresión de una enfermedad autoinmunitaria. Las moléculas terapéuticas autoinmunitarias a modo de ejemplo incluyen la proteína básica de mielina (MBP, por ejemplo, para la esclerosis múltiple), la proteína proteolipídica (PLP, por ejemplo, para la esclerosis múltiple), la glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG, por ejemplo, para la esclerosis múltiple), la glicoproteína asociada a la mielina (MAG, por ejemplo, para la Neuropatía periférica anti-MAG), la insulina (por ejemplo, para la diabetes tipo 1), la proteína relacionada con la subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes (IGRP, por ejemplo, para la diabetes tipo 1), la preproinsulina (por ejemplo, para la diabetes tipo 1), la glutámico descarboxilasa (GAD, por ejemplo, para la diabetes tipo 1), el autoantígeno tipo tirosina fosfatasa (por ejemplo, para la diabetes tipo 1), el antígeno-2 de insulinooma (por ejemplo, para la diabetes tipo 1), el antígeno celular de islotes (por ejemplo, para la diabetes tipo 1); el receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) (por ejemplo, para la enfermedad de Graves), el receptor de tirotrópina (por ejemplo, para la enfermedad de Graves), el AggreCAN (por ejemplo, para la artritis reumatoide), el epítipo de célula T CD4⁺ (GRVRVNSAY (SEQ ID NO: 36), por ejemplo, para la artritis inducida por proteoglicanos (PGIA) o la artritis reumatoide), o el receptor de acetilcolina (por ejemplo, para la miastenia grave). En algunas opciones, la molécula terapéutica de interés para una enfermedad autoinmunitaria es una proteína humana, tal como una proteína básica de mielina (MBP) humana, una proteína proteolipídica (PLP) humana, o glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) humana.

Las secuencias transgénicas a modo de ejemplo (por ejemplo, las secuencias de ADNc) y secuencias proteicas que se pueden codificar por el transgén se proporcionan posteriormente. En algunas opciones, el transgén comprende una

secuencia que es al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % idéntica a una cualquiera de las secuencias de ADNc que se proporcionan posteriormente (SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, o 34). En algunas opciones, el transgén comprende una secuencia que es una cualquiera de las secuencias de ADNc que se proporcionan posteriormente (SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, o 34). En algunas opciones, el transgén tiene optimizado el codón para la expresión en células humanas. En algunas opciones, el transgén contiene una secuencia de nucleótidos que codifica al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 o más aminoácidos contiguos de una cualquiera de las secuencias proteicas proporcionadas en el presente documento (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, o 35). En algunas opciones, el transgén contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que es al menos un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % idéntica a una cualquiera de las secuencias proteicas que se proporcionan en el presente documento (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, o 35). En algunas opciones, el transgén contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cualquiera de las secuencias proteicas que se proporcionan en el presente documento (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, o 35).

ADNc a modo de ejemplo de glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) de *Mus musculus*

1 atggcctgtt tgtggagctt ctctttgccc agctgcttcc tctcccttct cctcctcctt

61 ctccctccagt tgtcatgcag ctatgcagga caattcagag tgataggacc agggatatccc
121 atccgggctt tagttgggga tgaagcagag ctgccgtgcc gcatctctcc tgggaaaaat
181 gccacgggca tggaggtggg ttggtaccgt tctcccttct caagagtggg tcacctctac
241 cgaaatggca aggaccaaga tgcagagcaa gcacctgaat accggggacg cacagagctt
301 ctgaaagaga ctatcagtga gggaaaggtt acccttagga ttcagaacgt gagattctca
361 gatgaaggag gctacacctg cttcttcaga gaccactctt accaagaaga ggcagcaatg
421 gagttgaaag tggaagatcc cttctattgg gtcaaccccg gtgtgctgac tctcatcgca
481 cttgtgccta cgatcctcct gcaggctctt gtaggccttg tattcctctt cctgcagcac
541 agactgagag gaaaacttcg tgcagaagta gagaatctcc atcggacttt tgatcctcac
601 ttcttgaggg tgccctgctg gaagataaca ctgtttgtta ttgtgcctgt tcttgagccc
661 ctggttgctt tgatcatctg ctacaactgg ctgcaccgaa gactggcagg acagtttctt
721 gaagagctaa gaaaccccct ttga (SEQ ID NO: 8)

Proteína a modo de ejemplo de glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) de *Mus musculus*

1 macfwsfswp scflsl1111 llqlscsyag qfrvigpgyp iralvgdeae lpcripgkn
61 atgmevgwyr spfsrvvhly rngkdqdaeq apeyrgrtel lketisegkv tlriqnvrfs
121 deggytcffr dhsyqeeam elkvedpfyw vnpgvltlia lvptillqvs vglvflflqh
181 rlrqklraev enlhrtfdph flrvpcwkit lfvivpvlgp lvaliicynw lhrllagqfl
241 eelrnpf (SEQ ID NO: 9)

ADNc a modo de ejemplo de proteína proteolipídica 1 (PLP) de *Mus musculus*

ATGGGCTTGTTAGAGTGTTGTGCTAGATGTCTGGTAGGGGCCCCCTTTGCTTCCCTGGTGGCCACTGGAT
TGTGTTTCTTTGGAGTGGAAGTCTGTTCTGTGGATGTGGACATGAAGCTCTCACTGGTACAGAAAAGCTAAT
TGAGACCTATTTCTCCAAAACTACCAGGACTATGAGTATCTCATTAATGTGATTCATGCTTTCCAGTAT
GTCATCTATGGAAGTGCCTCTTTCTTCTTCTTTATGGGGCCCTCCTGCTGGCTGAGGGCTTCTACACCA
CCGGCGCTGTCAGGCAGATCTTTGGCGACTACAAGACCACCATCTGCGGCAAGGGCCTGAGCGCAACGGT
AACAGGGGGGCCAGAAGGGGAGGGGTTCCAGAGGCCAACATCAAGCTCATTCTTTGGAGCGGGTGTGTCTAT
TGTTTGGGAAAATGGCTAGGACATCCCGACAAGTTTGTGGGCATCACCTATGCCCTGACTGTTGTATGGC
TCCTGGTGTTTGCTGCTCGGCTGTACCTGTGTACATTTACTTCAATACCTGGACCACCTGTCAGTCTAT
TGCTTCCCTAGCAAGACCTCTGCCAGTATAGGCAGTCTCTGCGCTGATGCCAGAATGTATGGTGTCTC
CCATGGAATGCTTTCCCTGGCAAGGTTTGTGGCTCCAACCTTCTGTCCATCTGCAAAACAGCTGAGTTCC
AAATGACCTTCCACCTGTTTATTGCTGCGTTTGTGGGTGCTGCGGCCACACTAGTTTCCCTGCTCACCTT
CATGATTGCTGCCACTTACAACCTCGCCGTCCTTAAACTCATGGGCCGAGGCACCAAGTTCTGA (SEQ ID
NO: 10)

Proteína a modo de ejemplo de proteína proteolipídica 1 (PLP) de *Mus musculus*

1 mglleccarc lvgapfaslv atglcffgva lfcgchgheal tgtekliety fsknyqdyey
61 linvihafqy viygtasfff lygalllaeg fyttgavrqi fgdyktticg kglstvtgg
121 qkgrgsrgqh qahslervch clgkwlghpd kfvgitlyalt vvwllvfacs avpvyyifnt
181 wtccqsiafp sktsasigsl cadarmygv1 pwnafpgkvc gsnllsickt aefqmtfhlh
241 iaafvgaaat lvslltfmia atynfav1kl mgrgtkf (SEQ ID NO: 11)

ADNc a modo de ejemplo de proteína básica de mielina (MBP) de *Mus musculus*

ATGGGAAACCACTCTGGAAAGAGAGAATTATCTGCTGAGAAGGCCAGTAAGGATGGAGAGATTCACCGAG
GAGAGGCTGGAAAGAAGAGAAGCGTGGGCAAGCTTTCTCAGACGGCCTCAGAGGACAGTGATGTGTTTGG
GGAGGCAGATGCGATCCAGAACAATGGGACCTCGGCTGAGGACACGGCGGTGACAGACTCCAAGCACACA
GCAGACCCAAAGAATAACTGGCAAGGCGCCACCCAGCTGACCCAGGGAACCGCCCCACTTGATCCGCC
TCTTTTCCCGAGATGCCCCGGGAAGGGAGGACAACACCTTCAAAGACAGGCCCTCAGAGTCCGACGAGCT
TCAGACCATCCAAGAAGACCCACAGCAGCTTCCGGAGGCCCTGGATGTGATGGCATCACAGAAGAGACCC
TCACAGCGATCCAAGTACCTGGCCACAGCAAGTACCATGGACCATGCCAGGCATGGCTTCTCCCAAGGC
ACAGAGACACGGGCATCCTTGACTCCATCGGGCGCTTCTTTAGCGGTGACAGGGGTGCGCCCAAGCGGGG
CTCTGGCAAGGTGAGCTCCGAGCCGTAG (SEQ ID NO: 12)

5

Proteína a modo de ejemplo de proteína básica de mielina (MBP) de *Mus musculus*

1 mgnhsgkrel saekaskdge ihrgeagkkr svgklsqtas edsdfvgead aiqnnngtsae
61 dtavtdskht adpknnwqga hpadpgnrph lirlfsrdap gredntfkdr psedelqti
121 qedptaasgg ldvmasqkrp sqrs kylata stmdharhgf lprhrdtgil dsigrffsgd
181 rgapkrsgsk vssep (SEQ ID NO: 13)

10

ADNc a modo de ejemplo de glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) de *Homo sapiens*

1 atggcaagct tatcgagacc ctctctgccc agctgcctct gctccttctt cctcctctct
61 ctccctccaag tgtcttccag ctatgcaggg cagttcagag tgataggacc aagacaccct
121 atccgggctc tggtcgggga tgaagtggaa ttgcatgtc gcatactctc tgggaagaac
181 gctacaggca tggaggtggg gtggtaccgc ccccccttct ctagggtggt tcatctctac
241 agaaatggca aggaccaaga tggagaccag gcacctgaat atcggggccg gacagagctg
301 ctgaaagatg ctattggtga gggaaagggtg actctcagga tccggaatgt aaggttctca
361 gatgaaggag gtttcacctg cttcttccga gatcattctt accaagagga ggcagcaatg
421 gaattgaaag tagaagatcc tttctactgg gtgagccctg gagggtggt tctcctcgcg
481 gtgctgcctg tgctcctcct gcagatcact gttggcctcg tcttctctct cctgcagtac
541 agactgagag gaaaacttcg agcagagata gagaatctcc accggacttt tgatccccac
601 tttctgaggg tgccctgctg gaagataacc ctgtttgtaa ttgtgccggt tcttggaacc
661 ttggttgctt tgatcatctg ctacaactgg ctacatcgaa gactagcagg gcaattcctt
721 gaagagctac gaaatccctt ctga (SEQ ID NO: 14)

15 Proteína a modo de ejemplo de glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) de *Homo sapiens*

1 maslsrpslp sclcsfllll llqvsssyag qfrvigprhp iralvgdeve lpcrispgkn
61 atgmevgwyr ppfsrvvhly rngkdqgdgq apeyrgrtel lkdaigegkv tlrirnvrf
121 deggftcfr dhsyqeeam elkvedpfyw vspgvlvlla vlpvlllqit vglvflclqy
181 rlrghklraei enlhrtfdph flrvpcwkit lfvi vplgp lvaliicynw lhrrlagqfl
241 eelnrpf (SEQ ID NO: 15)

ADNc de la transcripción de la variante 7, de la proteína básica de mielina (MBP) a modo de ejemplo de *Homo sapiens*

20

ATGGGAAACCACGCAGGCAAACGAGAATTAAATGCCGAGAAGGCCAGTACGAATAGTGAAACTAACAGAG
 GAGAATCTGAAAAAAGAGAAAACCTGGGTGAACTTTACGGACAACCTCAGAGGACAACGAAGTGTTCCG
 AGAGGCAGATGCGAACCAGAACAATGGGACCTCCTCTCAGGACACAGCGGTGACTGACTCCAAGCGCACA
 GCGGACCCGAAGAATGCCTGGCAGGATGCCCCACCCAGCTGACCCAGGGAGCCGCCCCACTTGATCCGCC
 TCTTTTCCCGAGATGCCCCGGGGAGGGAGGACAACACCTTCAAAGACAGGCCCTCTGAGTCCGACGAGCT
 CCAGACCATCCAAGAAGACAGTGCAGCCACCTCCGAGAGCCTGGATGTGATGGCGTCACAGAAGAGACCC
 TCCCAGAGGCACGGATCCAAGTACCTGGCCACAGCAAGTACCATGGACCATGCCAGGCATGGCTTCCTCC
 CAAGGCACAGAGACACGGGCATCCTTGACTCCATCGGGCGCTTCTTTGGCGGTGACAGGGGTGCGCCAA
 GCGGGGCTCTGGCAAGGACTCACACCACCCGGCAAGAACTGCTCACTACGGCTCCCTGCCCCAGAAGTCA
 CACGGCCGGACCCAAGATGAAAACCCCGTAGTCCACTTCTTCAAGAACATTGTGACGCCTCGCACACCAC
 CCCCCTCGCAGGGAAAGGGGAGAGGACTGTCCCTGAGCAGATTTAGCTGGGGGGCCGAAGGCCAGAGACC
 AGGATTTGGCTACGGAGGCAGAGCGTCCGACTATAAATCGGCTCACAAGGGATTCAAGGGAGTCGATGCC
 CAGGGCACGCTTTCCAAAATTTTAAAGCTGGGAGGAAGAGATAGTCGCTCTGGATCACCCATGGCTAGAC
 GCTGA (SEQ ID NO: 16)

Proteína de la transcripción de la variante 7, de la proteína básica de mielina (MBP) a modo de ejemplo de Homo sapiens

5

1 mgnhagkrel naekastnse tnrgesekkr nlgelstrts ednevfgead anqnngtssq
 61 dtavtdskrt adpknawqda hpadpgsrph lirlfsrdap gredntfkdr pshedelqti
 121 qedsaates ldvmasskrp sqrhgskyla tastmdharh gflprhrdtg ildsigrffg
 181 gdrgapkrqs gkdshhpart ahygslpqs hgtrqdenpv vhffknivtp rtpppsqqkg
 241 rglsrslfsw gaegqrpgfg yggrasdyks ahkgfkgvda qgtlskifkl ggrdsrsqsp
 301 marr (SEQ ID NO: 17)

ADNc de la transcripción de la variante 1, de la proteína básica de mielina (MBP) a modo de ejemplo de Homo sapiens

ATGGCGTCACAGAAGAGACCCTCCCAGAGGCACGGATCCAAGTACCTGGCCACAGCAAGTACCATGGACC

ATGCCAGGCATGGCTTCCTCCCAAGGCACAGAGACACGGGCATCCTTGACTCCATCGGGCGCTTCTTTGG
 CGGTGACAGGGGTGCGCCCAAGCGGGGCTCTGGCAAGGTACCCTGGCTAAAGCCGGGCCGAGCCCTCTG
 CCCTCTCATGCCCCGAGCCAGCCTGGGCTGTGCAACATGTACAAGGACTCACACCACCCGGCAAGAACTG
 CTCCTACGGCTCCCTGCCCCAGAAGTCACACGGCCGGACCCAAGATGAAAACCCCGTAGTCCACTTCTT
 CAAGAACATTGTGACGCCTCGCACACCACCCCGTCGCAAGGAAAGGGGAGAGGACTGTCCCTGAGCAGA
 TTTAGCTGGGGGGCCGAAGGCCAGAGACAGGATTTGGCTACGGAGGCAGAGCGTCCGACTATAAATCGG
 CTCACAAGGGATTCAAGGGAGTCGATGCCCAGGGCAGCTTTCCAAAATTTTAAAGCTGGGAGGAAGAGA
 TAGTCGCTCTGGATCACCCATGGCTAGACGCTGA (SEQ ID NO: 18)

10

Proteína de la transcripción de la variante 1, de la proteína básica de mielina (MBP) a modo de ejemplo de Homo sapiens

1 masqkrpsqr hgskylatas tmdharhgfl prhrdtgild sigrffggdr gapkrsgskv
 61 pwlkpgrspl psharsqpgl cnmykdshhp artahygslp qkshgrtqde npvvhffkni
 121 vtprtppps qkggrglslsr fswgaegqr gfygygrasd ykshkgfkg vdaqgtlski
 181 fklggrdsrs gspmarr (SEQ ID NO: 19)

15

ADNc de la transcripción de la variante 2, de la proteína básica de mielina (MBP) a modo de ejemplo de Homo sapiens

ATGGCGTCACAGAAGAGACCCTCCCAGAGGCACGGATCCAAGTACCTGGCCACAGCAAGTACCATGGACC
 ATGCCAGGCATGGCTTCCTCCCAAGGCACAGAGACACGGGCATCCTTGACTCCATCGGGCGCTTCTTTGG
 CGGTGACAGGGGTGCGCCCAAGCGGGGCTCTGGCAAGGTACCCTGGCTAAAGCCGGGCCGAGCCCTCTG
 CCCTCTCATGCCCCGAGCCAGCCTGGGCTGTGCAACATGTACAAGGACTCACACCACCCGGCAAGAACTG
 CTCCTACGGCTCCCTGCCCCAGAAGTCACACGGCCGGACCCAAGATGAAAACCCCGTAGTCCACTTCTT
 CAAGAACATTGTGACGCCTCGCACACCACCCCGTCGCAAGGAAAGGGGGCCGAAGGCCAGAGACCAGGA
 TTTGGCTACGGAGGCAGAGCGTCCGACTATAAATCGGCTCACAAGGGATTCAAGGGAGTCGATGCCAGG
 GCACGCTTTCCAAAATTTTAAAGCTGGGAGGAAGAGATAGTCGCTCTGGATCACCCATGGCTAGACGCTG
 A (SEQ ID NO: 20)

Proteína de la transcripción de la variante 2, de la proteína básica de mielina (MBP) a modo de ejemplo de Homo sapiens

```
1 masqkrpsqr hgskylatas tmdharhgfl prhrdtgild sigrffggdr gapkrsgskv
61 pwlkpgrspl psharsqpgl cnmykdshhp artahygspl qkshgrtqde npvvhffkni
121 vtprtppps qkgaegqrpg fgyggrasdy ksahkgfkgv daqgtlskif klgrdsrsg
181 spmarr (SEQ ID NO: 21)
```

5

ADNc de la transcripción de la variante 3, de la proteína básica de mielina (MBP) a modo de ejemplo de Homo sapiens

```
ATGGCGTCACAGAAGAGACCCTCCCAGAGGCACGGATCCAAGTACCTGGCCACAGCAAGTACCATGGACC
ATGCCAGGCATGGCTTCTCTCCCAAGGCACAGAGACACGGGCATCCTTGACTCCATCGGGCGCTTCTTTGG
CGGTGACAGGGGTGCGCCCAAGCGGGGCTCTGGCAAGGACTCACACCACCCGGCAAGAACTGCTCACTAC
GGCTCCCTGCCCCAGAAGTCACACGGCCGGACCCAAGATGAAAACCCCGTAGTCCACTTCTTCAAGAACA
TTGTGACGCCTCGCACACCACCCCGTCGCAGGGAAAGGGGAGAGGACTGTCCCTGAGCAGATTTAGCTG
GGGGGCCGAAGGCCAGAGACCAGGATTTGGCTACGGAGGCAGAGCGTCCGACTATAAATCGGCTCACAAG
GGATTCAAGGGAGTCGATGCCCAGGGCACGCTTTCCAAAATTTTAAAGCTGGGAGGAAGAGATAGTCGCT
CTGGATCACCCATGGCTAGACGCTGA (SEQ ID NO: 22)
```

10

Proteína de la transcripción de la variante 3, de la proteína básica de mielina (MBP) a modo de ejemplo de Homo sapiens

```
1 masqkrpsqr hgskylatas tmdharhgfl prhrdtgild sigrffggdr gapkrsgskd
61 shhpartahy gslpqkshgr tqdenpvvhf fknivtprtp ppsqgkgrgl slsrfswgae
121 gqrpgfgygg rasdyksahk gfkvgdaqgt lskifklgr dsrsgspmar r (SEQ ID
NO: 23)
```

15

ADNc de la transcripción de la variante 4, de la proteína básica de mielina (MBP) a modo de ejemplo de Homo sapiens

```
ATGGCGTCACAGAAGAGACCCTCCCAGAGGCACGGATCCAAGTACCTGGCCACAGCAAGTACCATGGACC
ATGCCAGGCATGGCTTCTCTCCCAAGGCACAGAGACACGGGCATCCTTGACTCCATCGGGCGCTTCTTTGG

CGGTGACAGGGGTGCGCCCAAGCGGGGCTCTGGCAAGGACTCACACCACCCGGCAAGAACTGCTCACTAC
GGCTCCCTGCCCCAGAAGTCACACGGCCGGACCCAAGATGAAAACCCCGTAGTCCACTTCTTCAAGAACA
TTGTGACGCCTCGCACACCACCCCGTCGCAGGGAAAGGGGGCCGAAGGCCAGAGACCAGGATTTGGCTA
CGGAGGCAGAGCGTCCGACTATAAATCGGCTCACAAGGGATTCAAGGGAGTCGATGCCCAGGGCACGCTT
TCCAAAATTTTAAAGCTGGGAGGAAGAGATAGTCGCTCTGGATCACCCATGGCTAGACGCTGA (SEQ ID
NO: 24)
```

20 Proteína de la transcripción de la variante 4, de la proteína básica de mielina (MBP) a modo de ejemplo de Homo sapiens

```
1 masqkrpsqr hgskylatas tmdharhgfl prhrdtgild sigrffggdr gapkrsgskd
61 shhpartahy gslpqkshgr tqdenpvvhf fknivtprtp ppsqgkgaeg qrpqfgyggr
121 asdyksahkg fkgvdaqgtl skifklgrd srsqspmar (SEQ ID NO: 25)
```

25 ADNc de la transcripción de la variante 8, de la proteína básica de mielina (MBP) a modo de ejemplo de Homo sapiens

```
ATGGGAAACCACGCAGGCAAACGAGAATTAAATGCCGAGAAGGCCAGTACGAATAGTGAAACTAACAGAG
GAGAATCTGAAAAAAGAGAAACCTGGGTGAACTTTCACGGACAACCTCAGAGGACAACGAAGTGTTCCG
AGAGGCAGATGCGAACCAGAACAAATGGGACCTCCTCTCAGGACACAGCGGTGACTGACTCCAAGCGCACA
GCGGACCCGAAGAATGCCTGGCAGGATGCCCACCCAGCTGACCCAGGGAGCCGCCCCACTTGATCCGCC
TCTTTTCCCGAGATGCCCCGGGGAGGGAGGACAACACCTTCAAAGACAGGCCCTCTGAGTCCGACGAGCT
CCAGACCATCCAAGAAGACAGTGACGCCACCTCCGAGAGCCTGGATGTGATGGCGTCACAGAAGAGACCC
TCCCAGAGGCACGGATCCAAGTACCTGGCCACAGCAAGTACCATGGACCATGCCAGGCATGGCTTCTCTCC
CAAGGCACAGAGACACGGGCATCCTTGACTCCATCGGGCGCTTCTTTGGCGGTGACAGGGGTGCGCCCAA
GCGGGGCTCTGGCAAGGTGAGCTCTGAGGAGTAG (SEQ ID NO: 26)
```

Proteína de la transcripción de la variante 8, de la proteína básica de mielina (MBP) a modo de ejemplo de Homo sapiens

```

1 mgnhagkrel naekastnse tnrgesekkr nlgelsrtts ednevfgead anqngtssq
61 dtavtdskrt adpknawqda hpadpgsrph lirlfsrdap gredntfkdr psedelqti
121 qedsaatses ldvmasqkrp sqrhgskyla tastmdharh gflprhrdtg ildsigrffg
181 gdrgapkrgs gkvssee (SEQ ID NO: 27)

```

5 ADNc de la transcripción de la variante 1 de la proteína proteolípica 1 (PLP1) a modo de ejemplo de Homo sapiens

```

ATGGGCTTGTTAGAGTGCTGTGCAAGATGTCTGGTAGGGGGCCCCCTTTGCTTCCCTGGTGGCCACTGGAT
TGTGTTTCTTTGGGGTGGCACTGTTCTGTGGCTGTGGACATGAAGCCCTCACTGGCACAGAAAAGCTAAT
TGAGACCTATTTCTCCAAAACTACCAAGACTATGAGTATCTCATCAATGTGATCCATGCCTTCCAGTAT
GTCATCTATGGAAGTGCCTCTTTCTTCTTCTTATGGGGCCCTCCTGCTGGCTGAGGGCTTCTACACCA
CCGGCGCAGTCAGGCAGATCTTTGGCGACTACAAGACCACCATCTGCGGCAAGGGCCTGAGCGCAACGGT
AACAGGGGGCCAGAAGGGGAGGGGTTCAGAGGCCAACATCAAGCTCATTCTTTGGAGCGGGTGTGTCAT
TGTTTGGGAAAATGGCTAGGACATCCCGACAAGTTTGTGGGCATCACCTATGCCCTGACCGTTGTGTGGC
TCCTGGTGTGTGCTGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTGCTGTGCT
TGCTTCCCCAGCAAGACCTCTGCCAGTATAGGCAGTCTCTGTGCTGATGCCAGAATGTATGGTGTCTC
CCATGGAATGCTTTCCCTGGCAAGGTTTGTGGCTCCAACCTTCTGTCCATCTGCAAAACAGCTGAGTTCC
AAATGACCTTCCACCTGTTTATTGCTGCATTGTGGGGCTGCAGCTACACTGGTTTCCCTGCTCACCTT
CATGATTGCTGCCACTTACAACCTTTGCCGTCTTAACTCATGGGCCGAGGCACCAAGTTCTGA (SEQ ID
NO: 28)

```

10 Proteína de la transcripción de la variante 1 de proteína proteolípica 1 (PLP1) a modo de ejemplo de Homo sapiens

```

1 mglleccarc lvgapfaslv atglcffgva lfcgchgeal tgtkliety fsknyqdyey
61 linvihafqy viygtasfff lygalllaeg fyttgavrqi fgdyktticg kglstvtvgg
121 qkgrgsrgqh qahslervch clgkwlghpd kfvgityalt vvwllvfacs avpvyiyfnt
181 wtccqsiafp sktsasigsl cadarmygv1 pwnafpgkvc gsnllsickt aefqmtfhlf
241 iaafvgaaat lvslltfmia atynfavlk1 mgrgtkf (SEQ ID NO: 29)

```

15 ADNc de la transcripción de la variante 2 de la proteína proteolípica 1 (PLP1) a modo de ejemplo de Homo sapiens

```

ATGGGCTTGTTAGAGTGCTGTGCAAGATGTCTGGTAGGGGGCCCCCTTTGCTTCCCTGGTGGCCACTGGAT
TGTGTTTCTTTGGGGTGGCACTGTTCTGTGGCTGTGGACATGAAGCCCTCACTGGCACAGAAAAGCTAAT
TGAGACCTATTTCTCCAAAACTACCAAGACTATGAGTATCTCATCAATGTGATCCATGCCTTCCAGTAT
GTCATCTATGGAAGTGCCTCTTTCTTCTTCTTATGGGGCCCTCCTGCTGGCTGAGGGCTTCTACACCA
CCGGCGCAGTCAGGCAGATCTTTGGCGACTACAAGACCACCATCTGCGGCAAGGGCCTGAGCGCAACGTT
TGTGGGCATCACCTATGCCCTGACCGTTGTGTGGCTCCTGGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
ATTTACTTCAACACCTGGACCACCTGCCAGTCTATTGCCTTCCCCAGCAAGACCTCTGCCAGTATAGGCA
GTCTCTGTGCTGATGCCAGAATGTATGGTGTCTCCCATGGAATGCTTTCCCTGGCAAGGTTTGTGGCTC
CAACCTTCTGTCCATCTGCAAAACAGCTGAGTTCCAAATGACCTTCCACCTGTTTATTGCTGCATTTGTG
GGGGCTGCAGCTACACTGGTTTCCCTGCTCACCTTCATGATTGCTGCCACTTACAACCTTTGCCGTCTTCA
AATCATGGGCCGAGGCACCAAGTTCTGA (SEQ ID NO: 30)

```

Proteína de la transcripción de la variante 2 de proteína proteolípica 1 (PLP1) a modo de ejemplo de Homo sapiens

```

1 mglleccarc lvgapfaslv atglcffgva lfcgchgeal tgtkliety fsknyqdyey
61 linvihafqy viygtasfff lygalllaeg fyttgavrqi fgdyktticg kglstvtvgi
121 tyaltvwwll vfacsavpvy iyfntwtccq siafpsktsa sigslcadar mygvlpwnaf
181 pgkvcsnll sicktaefqm tfhlfiaafv gaaatlvsll tfmiaatynf avlklmgrgt
241 kf (SEQ ID NO: 31)

```

ADNc de la transcripción de la variante 3 de la proteína proteolípica 1 (PLP1) a modo de ejemplo de Homo sapiens

ATGGGCTTGTTAGAGTGTGTGCAAGATGTCTGGTAGGGGCCCCCTTTGCTTCCCTGGTGGCCACTGGAT
 TGTGTTTCTTTGGGGTGGCACTGTTCTGTGGCTGTGGACATGAAGCCCTCACTGGCACAGAAAAGCTAAT
 TGAGACCTATTTCTCCAAAACTACCAAGACTATGAGTATCTCATCAATGTGATCCATGCCTTCCAGTAT
 GTCATCTATGGAAGTGCCTCTTTCTTCTTCTTTATGGGGCCCTCCTGCTGGCTGAGGGCTTCTACACCA
 CCGGCGCAGTCAGGCAGATCTTTGGCGACTACAAGACCACCATCTGCGGCAAGGGCCTGAGCGCAACGGT
 AACAGGGGGGCCAGAAGGGGAGGGGTTCCAGAGGCCAACATCAAGCTCATTCTTTGGAGCGGGTGTGTTCAT
 TGTTTGGGAAAATGGCTAGGACATCCCGACAAGTTTGTGGGCATCACCTATGCCCTGACCGTTGTGTGGC
 TCCTGGTGTGTGCTGTCTGTGTGCTGTGTACATTTACTTCAACACCTGGACCACCTGCCAGTCTAT
 TGCCTTCCCCAGCAAGACCTCTGCCAGTATAGGCAGTCTCTGTGCTGATGCCAGAATGTATGGTGTCTC
 CCATGGAATGCTTTCCCTGGCAAGGTTTGTGGCTCCAACCTTCTGTCCATCTGCAAAACAGCTGAGTTCC
 AAATGACCTTCCACCTGTTTATTGCTGCATTTGTGGGGCTGCAGCTACACTGGTTTCCCTGCTCACCTT
 CATGATTGCTGCCACTTACAACCTTTGCCGTCCTTAAACTCATGGGCCGAGGCACCAAGTTCTGA (SEQ ID
 NO: 32)

Proteína de la transcripción de la variante 3 de proteína proteolipídica 1 (PLP1) a modo de ejemplo de Homo sapiens

1 mglleccarc lvgapfaslv atglcffgva lfcgchgheal tgtekliety fsknyqdyey
 61 linvihafqy viygtasfff lygalllaeg fyttgavrqi fgdyktticg kglstvtg
 121 qkgrgsrgqh qahslervch clgkwlghpd kfvgityalt vvwllvfacs avpvyiyfnt
 181 wtccqsiafp sktsasigsl cadarmygv l pwnafpgkvc gsnllsickt aefqmtfhlf
 241 iaafvgaat lvslltfmia atynfavkl mgrgtkf (SEQ ID NO: 33)

ADNc de la transcripción de la variante 4 de la proteína proteolipídica 1 (PLP1) a modo de ejemplo de Homo sapiens

ATGGACTATGAGTATCTCATCAATGTGATCCATGCCTTCCAGTATGTATCTATGGAAGTGCCTCTTTCT
 TCTTCTTTATGGGGCCCTCCTGCTGGCTGAGGGCTTCTACACCACCGGCGCAGTCAGGCAGATCTTTGG
 CGACTACAAGACCACCATCTGCGGCAAGGGCCTGAGCGCAACGGTAACAGGGGGCCAGAAGGGGAGGGGT
 TCCAGAGGCCAACATCAAGCTCATTCTTTGGAGCGGGTGTGTTCATTGTTTGGGAAAATGGCTAGGACATC
 CCGACAAGTTTGTGGGCATCACCTATGCCCTGACCGTTGTGTGGCTCCTGGTGTGTGCTGTCTGCTGT
 GCCTGTGTACATTTACTTCAACACCTGGACCACCTGCCAGTCTATTGCCTTCCCCAGCAAGACCTCTGCC
 AGTATAGGCAGTCTCTGTGCTGATGCCAGAATGTATGGTGTCTCCCATGGAATGCTTTCCCTGGCAAGG
 TTTGTGGCTCCAACCTTCTGTCCATCTGCAAAACAGCTGAGTTCCAAATGACCTTCCACCTGTTTATTGC
 TGCATTTGTGGGGGCTGCAGCTACACTGGTTTCCCTGCTCACCTTCATGATTGCTGCCACTTACAACCTT
 GCCGTCCTTAAACTCATGGGCCGAGGCACCAAGTTCTGA (SEQ ID NO: 34)

Proteína de la transcripción de la variante 4 de proteína proteolipídica 1 (PLP1) a modo de ejemplo de Homo sapiens

1 mdyeylinvi hafqyviygt asffflygal llaegfyttg avrqifgdyk tticgkgl
 61 tvttggqkgrg srgqhahsl ervchclgkw lghpdkfvgi tyaltvvwll vfacsavpvy
 121 iyfntwtccq siafpsktsa sigslcadarmygvlpwnaf pgkvcgsnll sicktaefqm
 181 tfhlfiaafv gaaatlvsll tfmiaatynf avlklmgrgt kf (SEQ ID NO: 35)

- 15 En algunas opciones, el vector de ácido nucleico de VAAr está encapsidado por una partícula de VAAr como se describe en el presente documento. La partícula de VAAr puede ser de cualquier serotipo de VAA (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10), incluyendo cualquier derivado (incluyendo las variantes de origen no natural de un serotipo) o pseudotipo. En algunas opciones, la partícula de VAAr es una partícula de VAA8, que puede estar pseudotipada con unas ITR de VAA2. Ejemplos no limitantes de derivados y pseudotipos incluyen híbridos de VAA2-VAA3, VAArh.10, VAAhu.14, VAA3a/3b, VAArh32.33, VAA-HSC15, VAA-HSC17, VAAhu.37, VAArh.8, CHt-P6, VAA2.5, VAA6.2, VAA2i8, VAA-HSC15/17, VAAM41, VAA9.45, VAA6(Y445F/Y731F), VAA2.5T, VAA-HAE1/2, clon 32/83 de VAA, VAASH10, VAA2 (Y → F), VAA8 (Y733F), VAA2.15, VAA2.4, VAAM41, y VAAr3.45. Dichos serotipos de VAA y derivados/pseudotipos, y los métodos de producción de dichos derivados/pseudotipos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Mol Ther. abr 2012; 20(4):699-708. doi: 10.1038/mt.2011.287. Epub 24 de ene de 2012. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. Asokan A1, Schaffer DV, Samulski RJ.).
- 20 En algunas opciones, la partícula de VAAr es una partícula de VAAr pseudotipada, que comprende (a) un vector de ácido nucleico que comprende unas ITR de un serotipo (por ejemplo, VAA2) y (b) una cápside comprendida por proteínas de cápside derivadas de otro serotipo (por ejemplo, VAA1, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, o VAA10). Los métodos para la producción y la utilización de los vectores de VAAr pseudotipados se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Duan *et al.*, J. Virol., 75:7662-7671, 2001; Halbert *et al.*, J. Virol., 74:1524-1532, 2000; Zolotukhin *et al.*, Methods, 28:158-167, 2002; y Auricchio *et al.*, Hum. Molec. Genet., 10:3075-3081, 2001).
- 30

Los vectores de ácido nucleico de VAAr a modo de ejemplo útiles de acuerdo con la divulgación incluyen vectores de ácido nucleico de VAA de cadena sencilla (ss) o autocomplementarios (sc), tales como genomas virales recombinantes de cadena sencilla o autocomplementarios.

- 5 Los métodos para producir partículas de VAAr y vectores de ácido nucleico también se conocen en la técnica y están disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, Zolotukhin *et al.* Production and purification of serotype 1,2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. *Methods* 28 (2002) 158-167; y las Publicaciones de Patente de EE. UU., números US20070015238 y US20120322861; y los plásmidos y kits disponibles en ATCC y Cell Biolabs, Inc.). Por ejemplo, un plásmido que contiene la secuencia del vector de ácido nucleico puede combinarse con uno o más
- 10 plásmidos auxiliares, por ejemplo, que contienen un gen rep (por ejemplo, que codifica Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40) y un gen cap (que codifica VP1, VP2, y VP3, incluyendo una región VP3 modificada como se describe en el presente documento), y se transfecta en una línea celular productora de modo que la partícula de VAAr pueda empaquetarse y purificarse posteriormente.
- 15 En algunas opciones, el uno o más plásmidos auxiliares incluyen un primer plásmido auxiliar que comprende un gen rep y un gen cap y un segundo plásmido auxiliar que comprende un gen E1a, un gen E1b, un gen E4, un gen E2a y un gen VA. En algunas opciones, el gen rep es un gen rep derivado de VAA2, y el gen cap se deriva de VAA2 e incluye modificaciones al gen para producir una proteína de la cápside modificada descrita en el presente documento. Los plásmidos auxiliares, y los métodos para producir dichos plásmidos, se conocen en la técnica y están disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, los plásmidos pDM, pDG, pDP1rs, pDP2rs, pDP3rs, pDP4rs, pDP5rs, pDP6rs, pDG(R484E/R585E), y pDP8.ape de PlasmidFactory, Bielefeld, Alemania; otros productos y servicios disponibles en Vector Biolabs, Filadelfia, PA; Cell Biolabs, San Diego, California; Agilent Technologies, Santa Clara, CA; y Addgene, Cambridge, MA; pxx6; Grimm *et al.* (1998), Novel Tools for Production and Purification of Recombinant Adenoassociated Virus Vectors, *Human Gene Therapy*, Vol. 9, 2745-2760; Kern, A. *et al.* (2003), Identification of a Heparin-Binding Motif on Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids, *Journal of Virology*, Vol. 77, 11072-11081.; Grimm *et al.* (2003), Helper Virus-Free, Optically Controllable, and Two-Plasmid-Based Production of Adeno-associated Virus Vectors of Serotypes 1 to 6, *Molecular Therapy*, Vol. 7, 839-850; Kronenberg *et al.* (2005), A Conformational Change in the Adeno-Associated Virus Type 2 Capsid Leads to the Exposure of Hidden VP1 N Termini, *Journal of Virology*, Vol. 79, 5296-5303; y Moullier, P. y Snyder, R. O. (2008), International efforts for recombinant adeno-associated viral vector reference standards, *Molecular Therapy*, Vol. 16, 1185-1188).
- 20
- 25
- 30

Una partícula de VAAr, a modo de ejemplo, no limitante, se describe a continuación. Se producen u obtienen uno o más plásmidos auxiliares, que comprenden ORF rep y cap para el serotipo de VAA deseado y los genes adenovíricos VA, E2A (DBP) y E4 bajo el control transcripcional de sus promotores nativos. El ORF cap también puede comprender una o más modificaciones para producir una proteína de la cápside modificada como se describe en el presente documento. Las células HEK293 (disponibles de ATCC®) se transfectan mediante transfección mediada por CaPO₄, lípidos o moléculas poliméricas tales como Polietilenimina (PEI) con el plásmido o plásmidos auxiliares y un plásmido que contiene un vector de ácido nucleico descrito en el presente documento. Las células HEK293 se incuban a continuación durante al menos 60 horas para permitir la producción de partículas de VAAr. De manera alternativa, en otro ejemplo, las líneas celulares estables del productor basadas en Sf9 se infectan con un solo baculovirus recombinante que contiene el vector de ácido nucleico. Como alternativa adicional, en otro ejemplo, las líneas celulares HEK293 o BHK se infectan con un HSV que contiene el vector de ácido nucleico y opcionalmente uno o más HSV auxiliares que contienen ORF rep y cap como se describe en el presente documento y los genes adenovíricos VA, E2A (DBP) y E4 bajo el control transcripcional de sus promotores nativos. Las células HEK293, BHK o Sf9 se incuban a continuación durante al menos 60 horas para permitir la producción de partículas de VAAr. Las partículas de VAAr se pueden purificar a continuación usando cualquier método conocido en la técnica o descrito en el presente documento, por ejemplo, mediante gradiente en etapas de yodixanol, gradiente de CsCl, cromatografía o precipitación con polietilenglicol (PEG).

35

40

45

50 Como se utiliza en el presente documento, los términos células "modificadas" y "recombinantes" pretenden referirse a una célula en la que se ha introducido un segmento polinucleotídico exógeno (tal como un segmento de ADN que conduce a la transcripción de una molécula biológicamente activa). Por lo tanto, las células modificadas se pueden distinguir de las células de origen natural, que no contienen un segmento de ADN exógeno introducido de forma recombinante. Las células modificadas son, por lo tanto, células que comprenden al menos uno o más segmentos polinucleotídicos heterólogos introducidos por la mano del hombre.

55

Para expresar un agente terapéutico de acuerdo con la presente divulgación, se puede preparar una partícula de VAAr modificada en la cápside que contenga un vector de expresión que comprenda un segmento de ácido nucleico que codifique un agente terapéutico bajo el control de uno o más promotores. Para poner una secuencia "bajo el control de" un promotor, se posiciona el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción de la fase de lectura transcripcional generalmente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos "corriente abajo" de (es decir, en 3' de) el promotor escogido. El promotor "corriente arriba" estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del polipéptido codificado. Este es el significado de "expresión recombinante" en este contexto. Las construcciones de vectores de ácido nucleico recombinantes preferidas de manera particular son las que comprenden un vector de ácido nucleico de VAAr que contiene un gen terapéutico de interés unido operativamente a uno o más promotores que sea capaz de expresar el gen en una o más células de mamífero seleccionadas. Dichos vectores de ácido nucleico se

60

65

describen detalladamente en el presente documento.

- Las construcciones genéticas de la presente divulgación pueden prepararse en varias composiciones, y también pueden formularse en vehículos farmacéuticos apropiados para su administración a sujetos humanos o animales. Las moléculas de VAAr de la presente divulgación y las composiciones que las comprenden proporcionan agentes terapéuticos nuevos y útiles para el tratamiento, control y mejoría de los síntomas de varios trastornos, enfermedades, lesiones, y/o disfunciones del sistema nerviosos de los mamíferos, y en particular, para el tratamiento o mejoría de la MS.
- En algunas opciones, el número de partículas de VAAr que se administran a un sujeto puede ser del orden que varía de 10^6 a 10^{14} partículas/ml o 10^3 a 10^{15} partículas/ml, o cualquier valor entre estos de cualquiera de los intervalos, tales como, por ejemplo, aproximadamente 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , o 10^{14} partículas/ml. En una opción, se pueden administrar partículas de VAAr con más de 10^{13} partículas/ml. En algunas opciones, el número de partículas de VAAr que se administran a un sujeto puede ser del orden que varía de 10^6 a 10^{14} genomas de vector (vg)/ml o 10^3 a 10^{15} vg/ml, o cualquier valor entre estos, tales como, por ejemplo, aproximadamente 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , o 10^{14} vg/ml. En una opción, se administran partículas de VAAr con más de 10^{13} vg/ml. Las partículas de VAAr pueden administrarse como una dosis única, o dividirse en dos o más administraciones, según sea necesario para lograr la terapia de la enfermedad o trastorno particular que se está tratando. En algunas opciones, se suministran a un sujeto 0,0001 ml a 10 ml, por ejemplo, 0,001 ml, 0,01 ml, 0,1 ml, 1 ml, 2 ml, 5 ml o 10 ml. En algunas opciones, el número de partículas de VAAr que se administran a un sujeto puede ser del orden que varía de 10^6 - 10^{14} vg/kg o cualquier valor entre estos, tales como, por ejemplo, aproximadamente 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , o 10^{14} vg/mg.
- En algunas opciones, la divulgación proporciona formulaciones de una o más composiciones basadas en virus divulgadas en el presente documento en soluciones farmacéuticamente aceptables para su administración a una célula o un animal, ya sea en solitario o en combinación con una o más modalidades diferentes de terapia, y en particular, para la terapia de células, tejido humanos y enfermedades que afectan al hombre.
- Si se desea, las partículas de VAAr descritas en el presente documento también se pueden administrar en combinación con otros agentes, tales como, por ejemplo, proteínas o polipéptidos o diversos agentes farmacéuticamente activos, incluyendo una o más administraciones sistémicas o tópicas de polipéptidos terapéuticos, fragmentos biológicamente activos, o variantes de los mismos. De hecho, prácticamente no hay límite para otros componentes que también pueden incluirse, dado que los agentes adicionales no causan un efecto adverso significativo al contacto con las células diana o los tejidos del huésped. Por lo tanto, las partículas de VAAr pueden administrarse junto con diversos otros agentes según sea necesario en el caso particular. Dichas composiciones pueden purificarse a partir de células huésped u otras fuentes biológicas, o como alternativa, pueden sintetizarse químicamente como se describe en el presente documento.
- La formulación de excipientes y soluciones transportadoras farmacéuticamente aceptables es bien conocida por los expertos en la técnica, como lo es el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para utilizar las composiciones concretas descritas en el presente documento en diversos regímenes de tratamiento, incluyendo, por ejemplo, la administración y formulación oral, parenteral, intravítrea, intraocular, intravenosa, intranasal, intraarticular, e intramuscular.
- Normalmente, estas formulaciones pueden contener al menos aproximadamente un 0,1 % del agente terapéutico (por ejemplo, de la partícula de VAAr) o más, aunque el porcentaje de los principios activos, por supuesto, se puede variar y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 1 o el 2 % y aproximadamente el 70 % o el 80 % o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de agente o agentes terapéuticos en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal manera que se obtendrá una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Factores tales como la solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, la vía de administración, vida de almacenamiento del producto, así como otras consideraciones farmacológicas se contemplarán por un experto en la técnica de preparación de dichas formulaciones farmacéuticas, y como tales, pueden ser deseables diversas dosificaciones y regímenes de tratamiento.
- En ciertas circunstancias, será deseable administrar partículas de VAAr en composiciones farmacéuticas adecuadamente formuladas divulgadas en el presente documento, ya sea por vía subcutánea, por vía intraocular, intravítrea, por vía parenteral, por vía subcutánea, por vía intravenosa, intracerebro-ventricular, intramuscular, por vía intratecal, oral, por vía intraperitoneal, por inhalación oral o nasal, o por inyección directa de una o más células, tejidos u órganos mediante inyección directa. Las formas farmacéuticas de las composiciones adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles. En algunas opciones, la forma es estéril y fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. En algunas opciones, la forma es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se conserva contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, solución salina, etanol, poliol (p.ej., glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y mediante

el uso de tensioactivos.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra la partícula de VAAr. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de aceite de petróleo tal como aceite mineral, aceite vegetal, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite de sésamo, aceite animal, o aceite de origen sintético. Se pueden emplear también soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos. Otros vehículos a modo de ejemplo incluyen solución salina tampón de fosfato, solución salina tampón de HEPES, y agua para inyección, cualquiera de los cuales puede combinarse opcionalmente con uno o más de entre cloruro de calcio dihidrato, fosfato disódico anhidro, cloruro magnésico hexahidrato, cloruro de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, o sacarosa.

Las composiciones de la presente divulgación se pueden administrar al sujeto que se está tratando por rutas convencionales que incluyen, pero sin limitación, la pulmonar, intranasal, la administración y formulación oral, por inhalación, parenteral tal como intravenosa, tópica, transdérmica, intradérmica, transmucosa, intraperitoneal, intramuscular, intracapsular, intraorbital, intravítrea, intracardíaca, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e inyección intraesternal. En algunas opciones, la composición se administra por vía intravenosa, mediante infusión en la arteria hepática, inyección en la vena porta, o inyección intraesplénica. En algunas opciones, la composición comprende una partícula VAAr de VAA8 que comprende un vector de ácido nucleico de VAAr como se describe en el presente documento, y la composición se administra por vía intravenosa.

Para la administración de una solución acuosa inyectable, por ejemplo, la solución puede tamponarse de forma adecuada, si es necesario, y el diluyente líquido se vuelve en primer lugar isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, intravítrea, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, un medio acuoso estéril que se puede emplear será uno conocido por los expertos en la técnica, a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y se añade tanto a 1000 ml de fluido de hipodermocilisis como se inyecta en el sitio propuesto de la infusión, (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Puede producirse alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para la administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir los estándares de esterilidad, pirogenicidad, y de seguridad y pureza generales según lo exigen, por ejemplo, los estándares de la FDA Office of Biologics.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando las partículas de VAAr en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con varios de los demás ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los distintos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación a modo de ejemplo son las técnicas de secado al vacío y liofilización, que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente esterilizada por filtración.

La cantidad de composiciones de partículas de VAAr y el tiempo de administración de dichas composiciones estarán dentro del alcance del experto en la técnica que se beneficia de las presentes enseñanzas. Es probable, sin embargo, que la administración de cantidades terapéuticamente eficaces de las composiciones divulgadas pueda conseguirse mediante una única administración, tales como, por ejemplo, una sola inyección de un número suficiente de partículas víricas para proporcionar un beneficio terapéutico al paciente sometido a dicho tratamiento. De manera alternativa, en algunas circunstancias, puede ser deseable proporcionar administraciones múltiples, o sucesivas administraciones de las composiciones, ya sea durante un periodo de tiempo relativamente corto, o relativamente prolongado, según se puede determinar por el médico encargado de supervisar la administración de dichas composiciones.

La composición puede incluir partículas de VAAr o vectores de ácido nucleico en solitario, o en combinación con uno o más principios activos adicionales, que pueden obtenerse a partir de fuentes naturales o recombinantes o sintetizarse químicamente.

De acuerdo con la presente divulgación, los polinucleótidos, segmentos de ácido nucleico, secuencias de ácido nucleico y similares, incluyen, pero sin limitarse a, los ADN (incluyendo y sin limitarse a ADN genómicos o extragenómicos), genes, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), los ARN (que incluyen, pero sin limitación, ARNr, ARNm y ARNt), nucleósidos, y segmentos de ácido nucleico adecuados obtenidos de fuentes naturales, sintetizados químicamente, modificados, o preparados de otro modo o sintetizados en su totalidad o en parte por la mano del hombre.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habituado en la técnica a la cual pertenece la presente divulgación. Aunque se puede utilizar cualquier método y composición similar o equivalente a los descritos

en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente divulgación, en el presente documento se describen los métodos y composiciones preferidos. Para los fines de la presente divulgación, a continuación se definen los siguientes términos:

- 5 El término "sujeto", como se utiliza en el presente documento, describe un organismo, incluyendo mamíferos tales como primates, al que se puede proporcionar tratamiento con las composiciones de acuerdo con la presente divulgación. Las especies de mamíferos que pueden beneficiarse de los métodos de tratamiento desvelados incluyen, pero sin limitarse a, seres humanos; simios; chimpancés; orangutanes; monos; animales domesticados tales como
10 perros y gatos; ganado tales como caballos, ganado bovino, cerdos, ovejas, cabras y pollos; y otros animales tales como ratones, ratas, cobayas y hámsteres. En algunas opciones, el sujeto tiene, se sospecha que tiene, está en riesgo de desarrollar, o ha sido diagnosticado de una enfermedad o trastorno autoinmunitario, tal como la esclerosis múltiple, la esclerosis diseminada, o la encefalomiелitis diseminada. En algunas opciones, el sujeto tiene una enfermedad o trastorno autoinmunitarios, tal como la esclerosis múltiple, la esclerosis diseminada, o la encefalomiелitis diseminada. Otras enfermedades autoinmunitarias a modo de ejemplo incluyen la diabetes tipo 1, la enfermedad de Grave, la artritis
15 (por ejemplo, la artritis reumatoide o la PGIA), la uveítis autoinmunitaria, la neuropatía periférica, la miastenia grave, el lupus y la enfermedad de Crohn. En algunas opciones, una enfermedad o trastorno autoinmunitarios se asocian con una infección (por ejemplo, una infección microbiana o vírica).

- 20 El término "tratamiento" o cualquier variación gramatical del mismo (por ejemplo, tratar, que trata y tratamiento, etc.), como se utiliza en el presente documento, incluye, pero sin limitación, el alivio de un síntoma de una enfermedad o afección; y/o la reducción, supresión, inhibición, minoración, mejoría o que afecta a la progresión, gravedad, y/o alcance de una enfermedad o afección.

- 25 La expresión "cantidad eficaz", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una cantidad que es capaz de tratar o mejorar una enfermedad o afección, o de otra manera es capaz de producir un efecto terapéutico que se pretende.

- 30 El término "promotor", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una región o regiones de una secuencia de ácido nucleico que regula la transcripción.

- La expresión "elemento regulador", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una región o regiones de una secuencia de ácido nucleico que regula la transcripción. Los elementos reguladores a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitarse a, amplificadores, elementos postranscripcionales, secuencias de control transcripcional y similares.

- 35 El término "vector", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico (normalmente compuesta por ADN) capaz de replicarse en una célula huésped y/o a la que puede unirse operativamente otro segmento de ácido nucleico de manera que se lleve a cabo la replicación del segmento adjunto. Un plásmido, cósmido, o un virus es un vector a modo de ejemplo.

- 40 Las expresiones "se corresponde sustancialmente con", "sustancialmente homólogo", o "identidad sustancial", como se utiliza en el presente documento, denota una característica de un ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos, en la que un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos seleccionados tiene al menos aproximadamente un 70 o aproximadamente un 75 por ciento de identidad de secuencia en comparación con un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos de referencia seleccionados. De manera más normal, la secuencia seleccionada y la secuencia de
45 referencia tendrán al menos aproximadamente un 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 o incluso un 85 por ciento de identidad de secuencia, y más preferiblemente, al menos aproximadamente un 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 o 95 por ciento de identidad de secuencia. De manera aún más preferible, las secuencias altamente homólogas a menudo comparten una identidad de secuencia mayor de al menos aproximadamente el 96, 97, 98 o 99 por ciento entre la secuencia seleccionada y la secuencia de referencia con la que se comparó.

- 50 El porcentaje de identidad de secuencia se puede calcular sobre la longitud total de las secuencias a comparar, o se puede calcular excluyendo pequeñas delecciones o adiciones que suman menos de aproximadamente el 25 por ciento, etc., de la secuencia de referencia elegida. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, tal como una porción de un gen o secuencia de flanqueo, o una porción repetitiva de un cromosoma. Sin embargo, en el caso de la homología de secuencia de dos o más secuencias de polinucleótidos, la secuencia de
55 referencia comprenderá normalmente al menos aproximadamente 18-25 nucleótidos, más normalmente al menos aproximadamente de 26 a 35 nucleótidos, e incluso más normalmente al menos aproximadamente 40, 50, 60, 70, 80, 90, o incluso 100 o más nucleótidos.

- 60 Cuando se desean fragmentos altamente homólogos, el grado de identidad porcentual entre las dos secuencias será de al menos aproximadamente el 80 %, preferiblemente de al menos aproximadamente el 85 %, y más preferiblemente de aproximadamente el 90 % o el 95 % o más, según se determina fácilmente por uno o más de los algoritmos de comparación de secuencias bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, el análisis del programa FASTA descrito por Pearson y Lipman (1988).

- 65 La expresión "unido operativamente", como se utiliza en el presente documento, se refiere a que las secuencias de

ácido nucleico que se unen son normalmente contiguas, o sustancialmente contiguas, y, cuando es necesario para unir dos regiones codificantes de proteína, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, dado que los amplificadores funcionan en general cuando están separados del promotor por varias kilobases y las secuencias intrónicas pueden tener longitudes variables, algunos elementos polinucleotídicos pueden estar unidos operativamente pero no ser contiguos.

La expresión "biológicamente activa", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una variante de ácido nucleico o secuencia proteica que tiene sustancialmente la misma actividad, tal como la reducción de la gravedad clínica de la EAE en un modelo de ratón o la inducción de células T reguladoras como se describe en el Ejemplo 1, el Ejemplo 2, el Ejemplo 3, o el Ejemplo 4 posteriormente, como un ácido nucleico o proteína como se describe en el presente documento (por ejemplo, tiene sustancialmente la misma actividad que un ácido nucleico o proteína MOG, PLP, o MBP descritas en el presente documento).

Ejemplos

Ejemplo 1- Restablecimiento de la tolerancia inmunitaria frente a neuroantígenos mediante terapia génica con VAA

Los inventores han demostrado que la expresión restringida a los hepatocitos de un neuroantígeno suministrado por VAA establece una tolerancia inmunológica persistente mediada por reguladores T específicos de antígeno capaces de prevenir y revertir la EAE en ratones. Este ejemplo describe el desarrollo de un protocolo que induce de manera persistente reguladores T *in vivo* y previene el desarrollo de enfermedad en un modelo murino de MS. El ejemplo también determina si la tolerancia puede inducir la remisión de una enfermedad de EAE preexistente y sustancialmente reduce la patología clínica y asociada al tejido.

Una enfermedad neurodegenerativa tal como la esclerosis múltiple (MS) se caracteriza por la infiltración crónica del SNC por linfocitos autorreactivos patógenos que reconocen los neuroantígenos. Los defectos funcionales de las células T reguladoras endógenas (reguladores T) que dan lugar a un fallo de los mecanismos central y/o periférico necesarios para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica en combinación con las células T que reconocen los péptidos de proteína de mielina están implicados en la patogénesis de la enfermedad. En los ratones C57BL/6, la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) inducida por la glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) produce una enfermedad inflamatoria del SNC mediada por células T CD4 que sirve como modelo relevante para la MS (FIG. 1 y FIG. 2A y 2B).

La transferencia génica hepática con vectores VAA que contienen promotores específicos del hígado pueden producir la expresión transgénica estable e inducir una tolerancia inmunitaria específica de antígeno frente a varias proteínas terapéuticas. Se ha informado de que la inducción de reguladores T no solo suprimen las respuestas inmunitarias celulares contra el producto transgénico sino que también pueden suprimir las respuestas humorales. De manera importante, Se ha demostrado que la tolerancia inmunitaria establecida por la expresión antigénica en el hígado se mantiene incluso cuando el antígeno se expresaba posteriormente de una manera altamente inmunogénica en otros órganos, tales como el músculo esquelético o por vía intravenosa.

El desarrollo de protocolos que estimulen un aumento del número de reguladores T y/o su función se ha convertido en un foco en el tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria. Muchos de los efectos beneficiosos de los inmunomoduladores aprobados actualmente que se utilizan en el tratamiento de la MS se asocian con la restauración de la homeostasis de los reguladores T. Este ejemplo demuestra que la terapia génica con VAA dirigida al hígado representa una nueva estrategia para detener la progresión de la enfermedad restaurando la función normal de los reguladores T al aparecer la enfermedad.

En primer lugar, se generó un vector VAA8-MOG, y se validó la expresión hepática del transgén en ratones mediante transferencia de western y análisis de qPCR (FIG. 4). Seguidamente, para determinar si la expresión hepática de MOG puede proporcionar una protección contra el desarrollo de EAE, se inyectaron los ratones con un vector VAA8-MOG o -GFP. A las 2 semanas se indujo la EAE y se controlaron y puntuaron los ratones de acuerdo con la escala clásica de signos de la EAE. Se obtuvo plasma los días 0, 7 y 14 después de la EAE o los días 0, 11, 19, 26, y 35 después de la EAE. Los resultados revelaron que los ratones que recibieron el VAA8-MOG estaban claramente protegidos del desarrollo de la EAE. Asimismo, estos ratones tampoco produjeron ningún anticuerpo anti-MOG ni IgG1 ni IgG2c. Por el contrario, los ratones que recibieron en vector de control desarrollaron una EAE grave con títulos de anticuerpos elevados (FIG. 7 y 8).

Ejemplo 2 - Moléculas terapéuticas para la terapia génica basada en VAA de la MS

Este ejemplo muestra que la transferencia génica hepática utilizando un vector de VAA que expresa un neuroantígeno es capaz de suprimir la inflamación del SNC y previene la EAE. De manera importante, utilizando el VAA para expresar una neuroproteína de longitud completa se hará posible una mayor aplicabilidad a través de los haplotipos de HLA asociados a la MS. Los planes en curso son evaluar la reversión de una EAE preexistente y el análisis funcional de la interacción de las células efectoras (Th1/Th17) y los reguladores T.

Utilizando las secuencias para las proteínas completas, se evitan las restricciones del HLA/MHC

Secuencia de MBP en el vector:

MGNHSGKRELSAEKASKDGEIHRGEAGKKRSVGKLSQTASEDSDFVGEADAIQNNGTSAEDT
AVTDSKHTADPKNNWQGAHPADPGNRPHLIRLF SRDAPGREDNTFKDRPSESDELQTIQEDP
TAASGGLDVMASQKRPSQORSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFSGDRGAPKR
GSGKVSSEP* (SEQ ID NO:1)

Secuencia de PLP en el vector:

MGLLECCARCLVGAPFASLVATGLCFFGVALFCGCGHEALTGTEKLIETYFSKNYQDYEYLI
NVIHAFQYVIYGTASFFFLYGALLAEGFYTTGAVRQIFGDYKTTICGKLSATVTGGQKGR
GSRGQHQAHSLELVCHCLGKWLGHDPKFVGITYALTVVWLLVFACSAVPVYIYFNTWTTTQS
IAFPSKTSASIGSLCADARMYGVLPWNAFPGKVCNSLLSICKTAEFQMTFHLFIAAFVGAA
(SEQ ID NO:2)

Secuencia de MOG en el vector:

MACLWSFSLPSCFLSLLLLLLLQLSCSYAGQFRVIGPGYPICALVGDEAELPCRISPGKN
ATGMEVGWYRSPFSRVVHLYRNGKDQDAEQAPEYRGRTELLKETISEGKVTLRIQNVRF
DEGGYTCTFFRDHSYQEEAAMELKVEDPFYWNPGVLTLLIALVPTILLQVSVGLVFLFLQH
RLRGKLRAEVENLHRTFDPHFLRVPCWKITLFVIVPVLGPLVALIICYNWLHRRLAGQFL
EELRNPL (SEQ ID NO:3)

El péptido inductor de EAE en ratones SJL PLP₁₃₉₋₁₅₁ HCLGKWLGHDPKF (SEQ ID NO:4)

El péptido inductor de EAE en ratones C57BL NTWTCQSIAPF (SEQ ID NO:5) o PLP₁₇₈₋₁₉₁ NTWTCQSIAPFSK (SEQ ID NO: 37)

C57BL: MOG35-55 MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (SEQ ID NO:6)

SJL: MOG92-106 DEGGYTCTFFRDHSYQ (SEQ ID NO:7)

Ejemplo 3 - Vectores VAA8 para la terapia génica de la MS

Los vectores VAA8 pueden expresar establemente una neuroproteína en hepatocitos. El VAA8-MOG puede prevenir el desarrollo de la EAE y el VAA8-MOG puede eliminar los síntomas clínicos de la EAE establecida.

Este ejemplo describe el desarrollo de una terapia relevante (pre)clínicamente utilizando una transferencia génica vírica que dará como resultado la inducción y expansión de las células T específicas de antígeno, estableciendo la tolerancia inmunológica como tratamiento para la esclerosis múltiple. La estrategia tiene amplias aplicaciones ya que utiliza proteína glicoproteica oligodendrocítica de mielina (MOG) y por lo tanto elimina la necesidad de identificación de epítomos específicos del HLA/MHC para la inducción de reguladores T específicos de antígeno. El conocimiento ganado a partir del trabajo que se presenta aquí tendrá el potencial de crear una nueva línea de protocolos de tratamiento para pacientes con MS así como un avance de la investigación tanto de la MS como del campo de la terapia génica.

En conjunto, hay una base clara para estrategias terapéuticas que sean multifactoriales. La presente divulgación proporciona una nueva terapia que no solo se enfoca en la reducción de las células T CD4+, sino que también se dirige al efecto de las células T CD8+, células B y componentes derivados de las células B del sistema inmunitario. Los datos previos, sugieren que la presentación de neuroantígenos dentro del hígado suministrados por VAA tiene una relevancia clínica significativa como intervención terapéutica para la MS y otras enfermedades autoinmunitarias. La presente solicitud de terapia génica representa una nueva e innovadora opción de tratamiento para la MS.

Métodos experimentales

Prevención de la EAE: Se inyectarán ratones C57B1/6 con el vector VAA8-MOG o de control para la expresión específica en el hepatocito. A las 4 semanas después de la transferencia genética, comenzará la inducción de EAE. Los ratones se controlarán diariamente y se registrará la discapacidad neurológica en una escala clínica detallada. Semanalmente, se recolectará sangre/suero y se analizará en cuanto a la frecuencia de CD4, CD8 y reguladores T

activados mediante un análisis de citometría de flujo, y formación de anticuerpos α -MOG mediante ELISA. Al terminar, se evaluará la histología de tejidos recolectados en cuanto a la expresión transgénica (hígado), la magnitud y fenotipo de infiltración de las células inflamatorias, la desmielinización, y el daño en la materia blanca (SNC). El establecimiento de una correlación basal de la histología con respecto a la puntuación clínica (especialmente en los ratones de control) será esencial para la identificación del éxito en objetivos posteriores.

Reversión de la EAE: En este estudio, se llevó a cabo en primer lugar la inducción de la EAE en los ratones. A los primeros signos de EAE, se seleccionarán aleatoriamente los ratones para recibir la transferencia génica hepática utilizando el vector VAA8-MOG o de control. Se registrará diariamente una evaluación clínica detallada. En diversos puntos temporales, se recolectará sangre/suero y se analizará como anteriormente. Al sacrificio, se recolectará tejido hepático y del SNC y se conservará para los análisis patológicos e histoquímicos.

Análisis funcional ex vivo de reguladores T tolerogénicos: Para determinar si los reguladores T específicos de Tg inducidos por el VAA8-MOG eran inmunosupresores, se co-cultivarán reguladores T GFP⁺ aislados por FACS de ratones transgénicos ("Foxp3^{EGFP}" B6.Cg-Foxp3^{tm2Tch/J}) que recibieron el vector 4 semanas antes, con esplenocitos alogénicos obtenidos de ratones 2D2-TCR (TCR específico de MOG) en presencia del péptido MOG. Las células y el sobrenadante del cultivo se analizarán en cuanto a la activación, la apoptosis, citocinas de Th1/Th2/Th17 la actividad de CTL mediante ensayos específicos.

Transferencia adoptiva in vivo de reguladores T: Para ensayar si la función inmunosupresora de los reguladores T específicos de Tg son capaces de atenuar la progresión de la enfermedad, los reguladores T GFP⁺ aislados como anteriormente, se transferirán adoptivamente en (a) ratones intactos que se someterán a inducción de EAE 24 h más tarde y (b) ratones que se someterán a EAE inducida por MOG. Estas afecciones reflejarán los eventos del objetivo 1.1 prevención y 1.2 reversión. En diversos puntos temporales, se recolectará sangre/suero; y se recolectará tejido hepático y del SNC y se analizarán como anteriormente.

El tema general de la presente divulgación es el desarrollo de un método basado en terapia génica para la inducción *in vivo* de células T reguladoras (reguladores T) específicas de antígeno (Ag) utilizando una terapia génica de virus adenoasociados (VAA) dirigidos al hígado, como una nueva estrategia de tratamiento para las enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, la esclerosis múltiple (MS).

Como se indicó anteriormente, la MS es una enfermedad neurodegenerativa autoinmunitaria del sistema nervioso central (SNC) en la que la etiología no se entiende bien. Aunque, las células T CD4⁺ autoagresivas tienen un papel central, la caída de los mecanismos de tolerancia inmunitaria que permite la activación de las células T específicas de la mielina intacta se considera una etapa inicial de la patogénesis de la MS. Varios estudios centrales de modelos de roedores han sustanciado que los reguladores T específicos de antígeno tienen un papel significativo en la modulación de la enfermedad autoinmunitaria del SNC y que pueden ser altamente eficaces en el tratamiento de la MS.¹⁻⁵ En consecuencia, existe un foco principal en el desarrollo de protocolos que estimulen la cantidad de reguladores T y su función. Desafortunadamente, el uso terapéutico satisfactorio de los reguladores T se ha limitado por la falta de protocolos específicos de antígeno eficaces y seguros para el aislamiento y expansión que sean adecuados para la traducción.

Utilizando la plataforma de transferencia génica del VAA, se ha demostrado claramente que la expresión transgénica restringida al hepatocito de un vector de VAA optimizado puede inducir de manera fiable la tolerancia frente a distintas proteínas terapéuticas, incluyendo el factor de coagulación IX (F. IX), α -1-antitripsina, eritropoyetina, y enzimas de almacenamiento lisosómico, entre otras.⁶ La inducción de tolerancia después de la transferencia génica hepática implica una combinación de mecanismos. De manera importante, la tolerancia inducida por VAA está mediada por los reguladores T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, que dependen críticamente de la consecución y el mantenimiento de una expresión transgénica adecuada restringida al hepatocito.⁷⁻⁹ También se ha demostrado que los reguladores T inducidos por el VAA pueden suprimir activamente la formación de anticuerpo y las respuestas de células T CD8⁺ citotóxicas contra el producto transgénico.^{7,10,11} Los animales tolerizados fallan en la formación de anticuerpos contra el transgén incluso después de intentos posteriores para inmunizar con la proteína formulada en adyuvante.¹⁰⁻¹² La transferencia génica hepática induce una respuesta de reguladores T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ dependiente de TGF- β que confiere un estado dominante de la tolerancia inmunitaria específica de antígeno que se mantiene incluso cuando se introduce más tarde el antígeno en otros tejidos de una manera altamente inmunógena.^{7,12} La inducción de muerte celular programada de las células T efectoras inclina adicionalmente la balanza hacia la tolerancia, lo que está forzado eficazmente por los reguladores T inducidos.^{13,14} Los datos publicados han demostrado que la tolerancia con VAA hepáticos también puede revertir las respuestas inmunitarias preexistentes al F.IX en un modelo de ratón de hemofilia B.¹⁵ Estos conceptos bien establecidos ahora se han apoyado adicionalmente por los resultados de otros laboratorios y han dado lugar al desarrollo de varios protocolos de tolerancia inmunitaria para las enfermedades genéticas.¹⁶⁻³⁷

Más de 400.000 personas en los Estados Unidos viven actualmente con la MS, y se diagnostican 10.000 nuevos casos cada año. Con un riesgo de desarrollo de la enfermedad en la vida de 1:600-800, la MS es la causa más común de discapacidad neurológica en adultos jóvenes entre 18 y 45 años de edad. Esta demografía representa la mayoría de la mano de obra adulta en los Estados Unidos; por lo tanto, los costes directos e indirectos de los servicios de salud para esta población se estiman actualmente en 12.000 millones de dólares anualmente.³⁸

La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad mediada inmunitariamente, prolongada, del SNC. La MS es una enfermedad autoinmunitaria neuroinflamatoria en la que la inflamación dirigida por las células T da lugar a la desmielinización y el daño de los axones. Aunque la patogénesis exacta de la MS se mantiene desconocida, se cree que las células T CD4⁺ tienen un papel central en el inicio y la orquestación de la inflamación del SNC. Se cree que un fallo de los mecanismos centrales y periféricos (particularmente los reguladores T) para mantener la auto tolerancia y el control de los linfocitos autorreactivos potencialmente patógenos es un evento clave en el desarrollo y patogénesis de la MS.^{4, 39-41} Varios estudios utilizando ensayos de supresión *in vitro* han documentado alteraciones funcionales de los reguladores T en pacientes con MS.^{42, 43} Los experimentos en ratones utilizando la transferencia adoptiva de reguladores T específicos de mielina o el agotamiento de reguladores T también han proporcionado pruebas de que los reguladores T pueden controlar el desarrollo y gravedad de la encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE) y se acumulan dentro del SNC durante la recuperación.⁴⁴ También se ha demostrado que los ratones transgénicos que expresan la proteína básica de mielina (MBP) podían prevenir la aparición de la enfermedad de EAE en los ratones en un procedimiento dependiente de los reguladores T.^{45,46} De hecho, el mecanismo de acción de varios de los inmunomoduladores aprobados actualmente que se utilizan en el tratamiento de la MS se asocia con la restauración de la homeostasis de los reguladores T.^{39,47,48}

En suma, la bibliografía apoya claramente el concepto de que las células reguladoras T tienen influencia en la susceptibilidad y progresión de la enfermedad. Los avances recientes han dado lugar al reconocimiento de que los reguladores T específicos de Ag representan una forma ideal de terapia celular para la MS. Sin embargo, Los reguladores T siguen estando entre los subconjuntos de células T menos comprendidos, y en consecuencia son los más difíciles de utilizar en aplicaciones terapéuticas.

La terapia génica con vectores VAA induce una tolerancia inmunitaria específica del antígeno. La terapia génica sigue siendo una nueva herramienta probada y potente para el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades.⁴⁹ Los vectores VAA han tenido específicamente grandes éxitos en la transferencia génica *in vivo* a varios tejidos diana.¹² Por ejemplo, la transferencia génica con VAA a las células epiteliales de la retina restauran la visión en niños con Amaurosis Congénita de Leber (LCA) y con Coroideremia.^{50,51} Un vector de AAV para el tratamiento de la lipoproteína lipasa es el primer fármaco para terapia génica aprobado en el mundo occidental ("Glybera").⁵² La terapia génica mediante la administración hepática de VAA ha dado como resultado la expresión sostenida del factor IX (F.IX) a niveles de >5 % del normal en pacientes con hemofilia B, cambiando su fenotipo hemorrágico de grave a leve.⁴⁸ La transferencia génica hepática con VAA promueve la tolerancia mediante la inducción de reguladores T específicos del producto transgénico, un fenómeno que se puede aprovechar para el tratamiento de la MS.^{6, 21, 34, 35, 49, 53}

La terapia eficaz para la EAE establecida necesita considerar la inducción de múltiples mecanismos reguladores directos e indirectos (tolerancia cruzada), incluyendo la inducción de los reguladores T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ específicos de Ag a través de múltiples epítomos de mielina endógenos (diseminación de epítomos). La bibliografía apoya la idea de que los reguladores T son potentes supresores de la EAE y esenciales para el establecimiento de la remisión de la enfermedad. Sin embargo, muy pocos estudios han abordado cómo generar dichos reguladores T específicos de antígeno que sean fiables y traducibles. Basándose en trabajos previos, la transferencia génica hepática utilizando vectores de VAA8 para expresar proteínas asociadas a la mielina de longitud completa inducirá reguladores T específicos de Ag a través de múltiples epítomos endógenos de una manera que se ha demostrado que es segura, factible, y de larga duración. Este estudio es innovador en varios aspectos. (i) Esta es la primera vez que se utiliza una técnica de vector VAA probada clínicamente para restablecer la tolerancia inmunitaria en el contexto de una enfermedad autoinmunitaria. (ii) los vectores VAA8 a modo de ejemplo se han diseñado para que expresen una neuroproteína de longitud completa (glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) o proteínas proteolipídicas (PLP)) eliminando de esta manera la necesidad de la identificación de epítomos específicos de HLA/MHC y aumentando el potencial de éxito. (iii) Basándose en los datos publicados, la incorporación de una modulación inmunitaria transitoria utilizando el inhibidor de mTOR aprobado por la FDA, la rapamicina, se debería proporcionar un efecto sinérgico, que facilite la inducción de tolerancia a los neuroantígenos inclinando la balanza de efectores T a reguladores T *in vivo*.⁵⁴⁻⁵⁶

Los inventores contemplan que la transferencia génica al hígado con VAA8 de una proteína neural (PLP y MOG) induce una activación de los reguladores T específicos de Ag, suficiente para restablecer la tolerancia inmunitaria y eliminar la progresión de la enfermedad en el SNC de un modelo murino de MS.

La base para esta proposición se funda en los estudios precedentes publicados recientemente cuyos hallazgos relevantes se presentan a continuación:

La transferencia génica hepática con vectores VAA puede fácilmente inducir una tolerancia inmunitaria específica de antígeno robusta en animales de experimentación frente a varias proteínas terapéuticas.^{7, 9, 13,54,57} Aquí, la tolerancia se caracterizaba por la falta de formación de anticuerpos, de repuesta de células T auxiliares, o de respuesta de CTL contra el producto transgénico, incluso después de un desafío posterior con la proteína en adyuvante. Utilizando ratones transgénicos para un receptor de célula T, se encontraron pruebas de una anergia y eliminación de las células T CD4⁺ específicas del producto transgénico.

Esa tolerancia inmunitaria establecida mediante la expresión transgénica hepática se mantiene incluso cuando el antígeno se expresó posteriormente de una manera altamente inmunogénica en otros órganos, tales como el músculo esquelético, o incluso suministrado por vía intravenosa.⁷ Estos resultados revelaban que la terapia génica dirigida al hígado podía eliminar las respuestas de células T CD8 potencialmente citotóxicas, indicando que el intervalo de tolerancia inmunitaria se extiende más allá del nivel de la expresión antigénica que se alcanza inicialmente en la transferencia génica hepática.

La transferencia génica hepática con VAA revierte eficaz y rápidamente los altos títulos de anticuerpo preexistentes y proporciona una corrección a largo plazo de la homeostasia en un modelo murino de hemofilia B.^{15, 56} Los altos niveles de proteína transgénica suprimía las células B de memoria y aumentaba la inducción de reguladores T, indicando los mecanismos directos e indirectos de supresión de la formación de inhibidor. Este hallazgo es bastante significativo ya que hay un aumento de pruebas de que las células B y los autoanticuerpos pueden tener un papel patogénico en la enfermedad desmielinizante.^{58,59}

La inducción de tolerancia inmunitaria mediante transferencia génica hepática con VAA no necesita que se secrete una proteína. Aunque la expresión hepática es crucial para la inducción de la tolerancia, no es necesaria la secreción desde los hepatocitos para el suministro sistémico del producto transgénico. La expresión de un neo-antígeno citoplasmático en solo el 3 % de los hepatocitos es suficiente para inducir los reguladores T proporcionar una supresión a largo plazo de las respuestas inflamatorias.⁵⁷

RESULTADOS

Establecimiento satisfactorio de múltiples modelos de inducción de EAE: La EAE es un modelo experimental de ratón ampliamente aceptado para la esclerosis múltiple que se induce en animales susceptibles mediante inmunización con antígenos del sistema nervioso central. La EAE es una enfermedad autoinmunitaria que está mediada por las células T CD4⁺ auxiliares 1 (T_H1) y las células T_H17 productoras de interleucina-17 que son reactivas a componentes de la vaina de mielina. Las células infiltran el parénquima nervioso, liberan las citocinas y quimiocinas inflamatorias, promueven la infiltración leucocitaria y contribuyen a la desmielinización.

La EAE se puede inducir en distintas estirpes de ratones utilizando diferentes neuroproteínas emulsionadas en adyuvante completo de Freud (CFA). La progresión de la enfermedad y la patología se manifiesta de manera diferente con cada combinación. Por ejemplo, la EAE inducida por (i) MOG produce células T encefalitogénicas y autoanticuerpos desmielinizantes en ratones C57BL/6. La enfermedad resultante es una enfermedad progresiva-crónica caracterizada por la desmielinización axonal y lesiones en la materia blanca de la médula espinal y se considera en general que es un modelo relevante para la enfermedad desmielinizante mediada inmunitariamente del ser humano.⁶⁰ La EAE también se puede inducir en ratones SJL (H-2s) utilizando el principal péptido encefalitogénico (ii) PLP (PLP₁₃₉₋₁₅₁). Aquí la enfermedad se caracteriza por un curso de recaída-remisión de parálisis, que permite la evaluación de la eficacia de distintas estrategias reguladoras inmunitarias en un cuadro de enfermedad recurrente.

En estos estudios, los inventores demostraron la línea temporal y la puntuación clínica para la inducción satisfactoria de la enfermedad EAE en dos estirpes diferentes de ratones. En un experimento, se inyectaron ratones hembra de 8 semanas de edad por vía subcutánea con 200 µg de péptido de mielina emulsionado en CFA que contenía 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*. Los signos clínicos de EAE comenzaban 12 días después en cuyo momento los ratones se evaluaron dos veces al día. Los ratones se puntuaron de acuerdo con la gravedad de los signos clínicos (FIG. 5A). En un experimento similar, La EAE se indujo en ratones C57BL/6 (n = 5) utilizando MOG con el fin de desarrollar una enfermedad de EAE progresiva crónica (FIG. 5B).

Los nuevos vectores de VAA8 transducen los hepatocitos de ratón eficazmente y expresan la proteína neural suministrada: El VAA es un parvovirus ADN de cadena sencilla no patógeno con un tamaño de genoma de aproximadamente 4,7 kb. Se han aislado serotipos con distintos tropismos tisulares a partir de múltiples especies de vertebrados, incluyendo seres humanos. Los vectores víricos derivados de VAA carecen de genes víricos y en vez de eso contienen un casete de expresión para el gen de interés, que se limita a ~5 kb de longitud. En estos estudios, se escogió un vector de serotipo VAA8 debido a su fuerte tropismo natural por los hepatocitos después de su administración en una vena periférica, evitando la necesidad de un procedimiento invasivo. De manera adicional, tiene en fallo en la transducción de células presentadoras de antígeno profesionales (APC). Las construcciones de vector modificadas incluyen un promotor fuerte y altamente específico del hepatocito.¹⁰

Los vectores sintetizados nuevos se evaluaron en cuanto a la eficacia de transducción. Para demostrar la eficacia, los inventores evaluaron si los hepatocitos del ratón se podían transducir y expresaban el transgén de la neuroproteína después de la inyección en la vena. Se inyectó un grupo de ratones con 1 x 10¹¹ partículas de vector de VAA8-ApoE/hAAT-MOG. Dos semanas después, utilizando lisados hepáticos se probó la evidencia de expresión hepática de MOG tanto por transferencia de western como por análisis de qPCR. Los resultados demuestran claramente la capacidad de este nuevo vector para producir la expresión hepática estable del neuroantígeno después de la transferencia génica hepática (FIG. 4A y FIG. 4B).

El VAA8-MOG produce una expresión transgénica hepática que previene el establecimiento de la EAE:

Previamente se había demostrado que la expresión ectópica de una proteína asociada a la mielina utilizando distintas metodologías transitorias promovía la resistencia a la EAE.^{18, 28, 45, 61} Lamentablemente, estas estrategias anteriores no se desarrollaron en terapias prácticas para las enfermedades autoinmunitarias humanas. Antes de esta divulgación, la capacidad de la transferencia génica hepática con VAA para inducir una supresión antigénica específica de una enfermedad autoinmunitaria estaba sin ensayar en la comunidad científica.

Para apoyar adicionalmente la presente divulgación, se llevó a cabo un estudio piloto. se inyectó un pequeño número de ratones ($n = 5$) por vía intravenosa con 10^{11} partículas de vector vía vena caudal con el vector VAA8-MOG o VAA8-GFP (de control). Dos semanas después, Se indujo la EAE utilizando MOG en CFA como se llevó a cabo anteriormente. Se obtuvieron muestras de plasma los días 0, 7 y 14 después de la inducción de la EAE o los días 0, 11, 19, 26, y 35 después de la inducción de la EAE. Los ratones que recibieron el VAA8-MOG estaban protegidos esencialmente del desarrollo de EAE (FIG. 6A, FIG. 6B, y FIG. 6C). Por el contrario, los ratones que recibieron en vector de control desarrollaron una EAE grave con títulos de anticuerpos elevados. Estos datos indican que los vectores descritos en el presente documento no solo se expresan en el hígado, sino también tienen un efecto modulador inmunitario.

La supresión activa mediante los reguladores T tiene un papel clave en el control de células T autorreactivas y la inducción de tolerancia periférica *in vivo*. En particular, la significación de los reguladores T específicos de antígeno para conferir resistencia a la autoinmunidad específica de órgano y en la limitación del daño tisular autoinmunitario se ha documentado en muchos modelos de enfermedad, incluyendo la MS.⁴⁴ Sin embargo, ya se ha identificado un método seguro y clínicamente factible para la expansión sostenida de los reguladores T endógenos,^{41, 44, 60, 63} un protocolo de tratamiento basado en terapia génica con VAA puede inducir con durabilidad una tolerancia específica de Ag, teniendo de esta manera el potencial para bloquear la respuesta autoinmunitaria patógena presente en la MS e inhibir la actividad de la enfermedad; mientras se evitan los efectos secundarios graves asociados con muchas de las inmunoterapias utilizadas actualmente. Basándose en estos y en estudios relacionados, la transferencia génica hepática con VAA8 puede restaurar la tolerancia inmunológica contra los antígeno de la vaina de mielina, tal como MOG y PLP, induciendo reguladores T específicos del antígeno *in vivo*.

Estrategia experimental y métodos de análisis: Este conjunto de experimentos ensaya las construcciones de vector con el fin de verificar la eficacia de la transducción al hígado y la expresión hepática sin efectos adversos. Se inyectarán grupos de ratones (i) C57BL/6 o (ii) SJL/J (de 7-8 semanas de edad) con 10^{11} partículas de vector (vp) (dosis eficaz del vector como se determinó previamente) de (i) AAV8-MOG o (ii) AAV8-PLP (respectivamente), o el control (un transgén irrelevante, GFP) por vía intravenosa a través de la vena caudal. Comenzando en el día 0, se recolectará sangre cada 2 semanas y se analizará en cuanto a la frecuencia de distintas poblaciones de células T utilizando marcadores convencionales para el fenotipo de las células T (que incluyen, pero sin limitación, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD62L, CD44). Se pueden determinar las respuestas inmunitarias humorales (por ejemplo, respuestas de α -IgG1, -IgG2a, -IgG2c) mediante un ELISA específico del antígeno. A los 14 días después de la transferencia genética, la mitad de los ratones de cada grupo se podían seleccionar aleatoriamente y se les practicó la eutanasia humanitariamente. Se pueden recolectar tejidos (sangre, hígado, bazo, y SNC (cerebro/médula espinal)) para el análisis. Los niveles de expresión transgénica hepática se pueden determinar a nivel de ARNm utilizando una PCR cuantitativa en tiempo real. También se determinarán los niveles de proteínas hepáticas absolutos y relativos del transgén mediante transferencia de western utilizando lisados hepáticos. A los 90 días después de la inyección, el resto de los ratones se procesará de manera similar para establecer una expresión transgénica sostenida. De manera adicional, algunos ratones se pueden someter a la inducción de EAE en distintos puntos temporales después de la administración del vector y evaluarse en cuanto a la prevención de la enfermedad, como se describió en los datos preliminares. Se pueden archivar alícuotas de las muestras de tejido recolectado como material de referencia.

Análisis de supresión funcional *in vitro* de reguladores T específicos de Ag inducidos mediante transferencia génica hepática con VAA8. Los reguladores esplénicos ($CD4^+CD25^+$) se pueden separar magnéticamente de entre los ratones que recibieron el vector (i) VAA8-MOG o (ii) VAA8-PLP o VAA8-GFP (de control) y se co-cultivaron con una cantidad medida de células marcadas CFSE obtenidas de ratones 2D2-TCR (esta línea de ratones C57B1/6 expresa un TCR que reconoce el MOG₃₅₋₅₅ en el contexto de H-2 I A^b) o se recolectaron los esplenocitos y se marcaron de entre los ratones SJL que se habían inmunizado previamente con PLP/adjuvante en presencia de perlas revestidas de anti-CD3/CD28 (proporciona la activación de efectores T no específicos/independientes de las APC). La supresión mediada por los reguladores T de las células efectoras proliferantes se puede determinar mediante citometría de flujo. Los sobrenadantes del cultivo celular se pueden analizar en cuanto a citocinas de Th1/Th2/Th17 mediante ensayos específicos. Los resultados se pueden comparar con los datos de los ratones intactos y con EAE inducida (en los cuales muchas células $CD4^+CD25^+$ deberían representar efectores activados más que reguladores T). En combinación, estos estudios demostrarán una supresión funcional específica de antígeno de los reguladores T inducidos con el vector en comparación con los controles.

Basándose en los datos iniciales y los estudios publicados, los inventores esperan una máxima expresión transgénica en 2 semanas, que permanezca prácticamente sin cambios con el tiempo, indicando de esta manera una transducción estable de los hepatocitos.¹⁰ Como las construcciones de vector se han diseñado con el fin de que expresen MOG o PLP de longitud completa e incluyen un promotor de hepatocitos fuerte, también se espera que la expresión mediada por el vector VAA8 se pueda restringir a los hepatocitos y no secretarse. El secuestro del transgén restringirá las

consecuencias patológicas del neuroantígeno derivado de VAA circulando libremente. Finalmente, los inventores no esperan respuestas inflamatorias en ningún tejido y el análisis de enzimas hepáticas (ALT/AST) deberían demostrar la ausencia de hepatotoxicidad. Asimismo, basándose en los estudios piloto, se espera que la administración del vector antes de la inducción de EAE prevendrá el desarrollo de la enfermedad. También sería un resultado positivo la ausencia/reducción significativa de las respuestas de anticuerpo específicas de antígeno. Finalmente, los resultados de los ensayos de supresión con reguladores T se espera que muestren que la supresión inducida por la expresión transgénica hepática se facilita por la activación de los reguladores T específicos de Ag.

Incluso aunque la bibliografía apoya abrumadoramente la idea de que los reguladores T son potentes supresores de la EAE y son la fuerza directora para cambiar la progresión de la enfermedad a remisión, hay muy pocos estudios en el pasado que hayan abordado cómo generar dichos reguladores T específicos de antígeno que sean fiables y eficaces.⁶⁴ En teoría, esto se podría conseguir mediante dos estrategias. La primera sería aislar los reguladores T, expandir su número *ex vivo* y luego reintroducirlos, con la idea de que un aumento de la frecuencia total de los reguladores T policlonales pueda tener influencia en el curso de la enfermedad. En 2004, el grupo de Bluestone en un modelo de diabetes tipo 1 proporcionó la prueba inicial del principio de esta estrategia.⁶⁵ Más recientemente, otros han demostrado adicionalmente que la utilización de los reguladores T expandidos de ratones con TCR transgénico específico de mielina es más eficaz.⁶⁴ La segunda estrategia es administrar un tratamiento adecuado que promueva la expansión del número de reguladores T y/o su función *in vivo*. Hay informes recientes que han descrito el uso de distintos compuestos (por ejemplo, nanopartículas/moléculas pequeñas) para aumentar la función de los reguladores T en la EAE, mientras que otros intentan aumentar la presentación de antígenos con el fin de generar reguladores T.^{64,66} Al final, hasta ahora, aún falta un método factible y traducible para la inducción de reguladores T específicos de Ag relevantes para la enfermedad. Esta proposición presenta una metodología que proporcionará un método duradero para la inducción continua *in vivo* de reguladores específicos de Ag endógenos. Basándose en trabajos previos, la transferencia génica hepática utilizando vectores de VAA8 que expresen MOG o PLP de longitud completa debería inducir reguladores T específicos de Ag a través de múltiples epítomos de mielina endógenos de una manera que se ha demostrado que es segura, factible, y de larga duración.

Estrategia experimental y métodos de análisis. Aquí, los ratones se sometieron primero a la inducción activa de EAE utilizando (i) MOG o (ii) PLP. A los primeros signos clínicos de EAE, se les puede dar a los ratones con progresiva crónica inducida con MOG, o en el pico de la enfermedad, a los ratones con recaída-remisión inducida con PLP, el vector VAA8-MOG o VAA8-PLP (respectivamente) o el VAA8-GFP para los ratones del control. Los ratones se pueden puntuar clínicamente por peso y déficit neurológico 2x al día. Se puede recolectar sangre y analizarla en cuanto a respuestas humorales (IgG) como anteriormente. A los ~45 días, cada cohorte de ratones se puede perfundir y subdividir aleatoriamente en 2 grupos. El Grupo 1 tendrá recolectados los tejidos cerebral, de la médula espinal, y hepáticos y conservados para los análisis histopatológicos y de inmunofluorescencia. Los linfocitos infiltrantes se pueden aislar de los cerebros y médulas espinales de los ratones del Grupo 2 (como se ha descrito previamente⁶⁷). Se puede analizar la frecuencia de distintas poblaciones de células T utilizando marcadores convencionales de las células T (que incluyen, pero sin limitación, CD4, CD8, FoxP3, CD25, CD62L, CD44, CTLA-4, CD103). El tejido hepático se puede someter a un análisis transcripcional y proteico como se mostró. Los resultados se pueden comparar con los ratones del control y el material de referencia. También se pueden archivar partes del tejido para estudios futuros.

Se espera que el tratamiento terapéutico con una única inyección de vector VAA8-MOG o -PLP al inicio o en el pico de la enfermedad dé como resultado una remisión drástica de la alteración clínica. Debería haber una reducción concurrente en los títulos de anticuerpo y/o frecuencia de las respuestas de células B contra el péptido que induce la EAE, en comparación con los ratones tratados con el vector de control. La inflamación del SNC es característica de la EAE y el grado de infiltración linfocítica se correlaciona con la progresión de la enfermedad; mientras que, la presencia de reguladores T en el SNC durante la EAE se ha asociado con disminución de la inflamación y resolución de la enfermedad clínica.⁶⁸ Por lo tanto, se espera una reducción significativa de los infiltrados inflamatorios en el SNC de los ratones tratados con el vector en el análisis histopatológico. Esto sugeriría que los reguladores T específicos de Ag inducidos que migraron al sitio del daño del SNC son protectores y capaces de limitar el daño mediado por las células T efectoras. De manera adicional, la naturaleza de recaída-remisión natural de la EAE inducida por PLP puede aprovecharse programando la inyección del vector VAA8-PLP de manera que los efectos del pico de la tolerancia inducida se correspondan con cuando la enfermedad está relativamente quiescente (en remisión).

Por otra parte, los ratones que reciben MOG para la inducción de la EAE comienzan mostrando alteraciones neurológicas después de ~12 días de la escalada progresiva. En este escenario, es posible que siga presente algún nivel de inflamación, aunque; el análisis fenotípico de las poblaciones de células T muestran que el número absoluto de células T que infiltran el SNC sea menor con una mayor relación reg T: efec T.

Inmunosupresión transitoria utilizando rapamicina. La rapamicina cruza fácilmente la BBB ejerciendo de esta manera efectos directos dentro del SNC. Bloqueando la activación de la ruta del mTOR, la rapamicina previene la activación de las células T inhibiendo su respuesta frente a la IL-2 evitando de esta manera la proliferación de efectores T inducida por el Ag, mientras que permite la expansión selectivamente de reguladores T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ funcionales. En la EAE, la rapamicina es eficaz en la prevención de la aparición de la enfermedad, sin embargo; la supresión de la enfermedad establecida solo se mantiene con su uso continuo.⁶⁹ En una serie adicional de

experimentos, los ratones tratados con el vector se inmunosuprimen transitoriamente. Los Grupos de ratones se inyectan entonces con VAA8-MOG, -PLP, -GFP o PBS en puntos temporales específicos que se corresponden con el inicio de la aparición o el pico de la enfermedad. Al mismo tiempo, los ratones reciben rapamicina intraperitoneal (1 mg/kg) o PBS (falso control) diariamente durante 14 días consecutivos.⁶⁹ En puntos de tiempo específicos que se correspondan con antes y después del tratamiento y cambios significativos en la puntuación clínica, se pueden recolectar los tejidos y linfocitos del SNC y el bazo de ratones seleccionados aleatoriamente. Se pueden identificar entonces los cambios histopatológicos dentro de los tejidos. Las células aisladas se pueden entonces fenotipar y se puede determinar la frecuencia de reguladores T y efectores T de los diferentes compartimentos y compararse con los grupos de control para validar la eficacia del co-tratamiento con rapamicina.

Independientemente de la administración de VAA8, se espera que el tratamiento con rapamicina sola produzca transitoriamente una rápida reducción de la presentación clínica de EAE debido a que inhibe selectivamente la proliferación de efectores T.⁶⁹ Sin embargo, cuando se utiliza en conjunto con la transferencia génica hepática con VAA8, el tratamiento con rapamicina tiene un efecto sinérgico que da como resultado un aumento de los reguladores T FoxP3⁺ específicos de Ag inducidos por el vector (aunque son menos sensibles a la inhibición de la señalización de mTOR) con una disminución correspondiente en las células T efectoras.⁷⁰ El cambio a tolerancia se potencia adicionalmente por el hecho de que se ha demostrado que los reguladores T median en la inhibición selectiva de las células Th1 específicas de antígeno del SNC en la EAE.⁷¹

Cuando se consideran los datos que apoyan claramente la capacidad de la transferencia génica hepática para inducir reguladores T específicos de Ag y para provocar una tolerancia inmunitaria; y que la acumulación de reguladores T en el SNC durante la fase de recuperación de la EAE ha sido un hallazgo constante en los modelos inducidos activamente, parece improbable que la presente terapia no tuviera, al menos hasta cierto grado, un beneficio clínico o patológico.^{3, 64, 71, 72}

En conclusión, el régimen terapéutico presentado en el presente documento afronta una necesidad no satisfecha proporcionando un tratamiento eficaz para enfermedades tales como la MS utilizando una estrategia de terapia génica. Utilizando la plataforma del vector de VAA desvelado en el presente documento para suministrar proteínas de longitud completa se ofrece una estrategia independiente del HLA superior para la inducción de reguladores T específicos de Ag en comparación con otras terapias mediadas por reguladores T restringidas a epítomos o *ex vivo*. De manera adicional, La transferencia génica con VAA da como resultado una generación de reguladores T continua debido a la expresión en hepatocitos a largo plazo del transgén.⁷³

REFERENCIAS

1. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology* (Baltimore, MD). 169(9):4712-4716 (2002)
2. Zhang G-X, Yu S, Gran B, Li J, Calida D, Ventura E, Chen X, Rostami A. T cell and antibody responses in remitting-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in (C57BL/6×SJL) F1 mice. *Journal of Neuroimmunology*. 2004;148(1-2):1-10.
3. McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *Journal of Immunology* (Baltimore, MD). 2005;175(5):3025-3032.
4. Paust S, Cantor H. Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunological reviews*. 2005;204:195-207.
5. Marusic S, Tonegawa S. Tolerance induction and autoimmune encephalomyelitis amelioration after administration of myelin basic protein-derived peptide. *Journal of Experimental Medicine*. 1997;186(4):507-515.
6. LoDuca PA, Hoffman BE, Herzog RW. Hepatic gene transfer as a means of tolerance induction to transgene products. *Current gene therapy*. 2009;9(2):104-14.
7. Hoffman B, Dobrzynski E, Wang L, Hirao L, Mingozzi F, Cao O, Herzog RW. Muscle as a Target for Supplementary Factor IX Gene Transfer. *2007;18(7):603-13*.
8. Dobrzynski E, Fitzgerald JC, Cao O, Mingozzi F, Wang L, Herzog RW. Prevention of cytotoxic T lymphocyte responses to factor IX-expressing hepatocytes by gene transfer-induced regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(12):4592-7.
9. Dobrzynski E, Herzog RW. Tolerance induction by viral *in vivo* gene transfer. *Clinical medicine & research*. 2005;3(4):234-40.
10. Cooper M, Nayak S, Hoffman BE, Terhorst C, Cao O, Herzog RW. Improved induction of immune tolerance to

factor IX by hepatic AAV-8 gene transfer. Human gene therapy. 2009;20(7):767-76.

11. Cao O, Furlan-Freguia C, Arruda VR, Herzog RW. Emerging role of regulatory T cells in gene transfer. Curr Gene Ther. 2007;7(5):381-90.

12. Hoffman BE, Martino AT, Sack BK, Cao O, Liao G, Terhorst C, Herzog RW. Nonredundant roles of IL-10 and TGF-beta in suppression of immune responses to hepatic AAV-factor IX gene transfer. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. 2011;19(7):1263-72.

13. Mingozzi F, Liu YL, Dobrzynski E, Kaufhold A, Liu JH, Wang Y, Arruda VR, High KA, Herzog RW. Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by *in vivo* hepatic gene transfer. The Journal of clinical investigation. 2003;111(9):1347-56. doi: 10.1172/JCI16887. PMID: 12727926.

14. Faust SM, Bell P, Zhu Y, Sanmiguel J, Wilson JM. The role of apoptosis in immune hyporesponsiveness following AAV8 liver gene transfer. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. 2013;21(12):2227-35.

15. Markusic DM, Hoffman BE, Perrin GQ, Nayak S, Wang X, LoDuca PA, High KA, Herzog RW. Effective gene therapy for haemophilic mice with pathogenic factor IX antibodies. EMBO Molecular Medicine. 2013;1-12.

16. Annoni A, Brown BD, Cantore A, Sergi LS, Naldini L, Roncarolo MG. *In vivo* delivery of a microRNA-regulated transgene induces antigen-specific regulatory T cells and promotes immunologic tolerance. Blood. 2009;114(25):5152-61.

17. Breous E, Somanathan S, Vandenberghe LH, Wilson JM. Hepatic regulatory T cells and Kupffer cells are crucial mediators of systemic T cell tolerance to antigens targeting murine liver. Hepatology. 2009;50(2):612-21.

18. Matrai J, Cantore A, Bartholomae CC, Annoni A, Wang W, Acosta-Sanchez A, Samara-Kuko E, De Waele L, Ma L, Genovese P, Damo M, Arens A, Goudy K, Nichols TC, von Kalle C, MK LC, Roncarolo MG, Schmidt M, Vandendriessche T, Naldini L. Hepatocyte-targeted expression by integrase-defective lentiviral vectors induces antigen-specific tolerance in mice with low genotoxic risk. Hepatology. 2011;53(5):1696-707.

19. Mingozzi F, Hasbrouck NC, Basner-Tschakarjan E, Edmonson SA, Hui DJ, Sabatino DE, Zhou S, Wright JF, Jiang H, Pierce GF, Arruda VR, High KA. Modulation of tolerance to the transgene product in a nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver. Blood. 2007;110(7):2334-41.

20. Sun B, Kulis MD, Young SP, Hobeika AC, Li S, Bird A, Zhang H, Li Y, Clay TM, Burks W, Kishnani PS, Koeberl DD. Immunomodulatory gene therapy prevents antibody formation and lethal hypersensitivity reactions in murine pompe disease. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. 2010;18(2):353-360.

21. Miao CH, Harmeling BR, Ziegler SF, Yen BC, Torgerson T, Chen L, Yau RJ, Peng B, Thompson AR, Ochs HD, Rawlings DJ. CD4+FOXP3+ regulatory T cells confer long-term regulation of factor VIII-specific immune responses in plasmid-mediated gene therapy-treated hemophilia mice. Blood. 2009;114(19):4034-44.

22. Brown BD, Cantore A, Annoni A, Sergi LS, Lombardo A, Della Valle P, D'Angelo A, Naldini L. A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. Blood. 2007;110(13):4144-52.

23. Brown BD, Venneri MA, Zingale A, Sergi L, Naldini L. Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. Nature medicine. 2006;12(5):585-91.

24. Cerullo V, McCormack W, Seiler M, Mane V, Cela R, Clarke C, Rodgers JR, Lee B. Antigen-specific tolerance of human alpha 1-antitrypsin induced by helper-dependent adenovirus. Human gene therapy. 2007;18(12):1215-24.

25. Follenzi A, Battaglia M, Lombardo A, Annoni A, Roncarolo MG, Naldini L. Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice. Blood. 2004;103(10):3700-9.

26. Franco LM, Sun B, Yang X, Bird A, Zhang H, Schneider A, Brown T, Young SP, Clay TM, Amalfitano A, Chen YT, Koeberl DD. Evasion of immune responses to introduced human acid alpha-glucosidase by liver-restricted expression in glycogen storage disease type II. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. 2005;12(5):876-84.

27. Koeberl DD, Kishnani PS. Immunomodulatory gene therapy in lysosomal storage disorders. Curr Gene Ther. 2009;9(6):503-10.

28. Luth S, Huber S, Schramm C, Buch T, Zander S, Stadelmann C, Bruck W, Wraith DC, Herkel J, Lohse AW. Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(10):3403-10.
- 5 29. Matsui H, Hegadorn C, Ozelo M, Burnett E, Tuttle A, Labelle A, McCray PB, Jr., Naldini L, Brown B, Hough C, Lillicrap D. A microRNA-regulated and GP64-pseudotyped lentiviral vector mediates stable expression of FVIII in a murine model of Hemophilia A. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2011;19(4):723-30.
- 10 30. Matsui H, Shibata M, Brown B, Labelle A, Hegadorn C, Andrews C, Chuah M, VandenDriessche T, Miao CH, Hough C, Lillicrap D. A murine model for induction of long-term immunologic tolerance to factor VIII does not require persistent detectable levels of plasma factor VIII and involves contributions from Foxp3+ T regulatory cells. *Blood*. 2009;114(3):677-85.
- 15 31. McEachern KA, Nietupski JB, Chuang WL, Armentano D, Johnson J, Hutto E, Grabowski GA, Cheng SH, Marshall J. AAV8-mediated expression of glucocerebrosidase ameliorates the storage pathology in the visceral organs of a mouse model of Gaucher disease. *Journal of Gene Medicine*. 2006;8(6):719-29.
- 20 32. Nietupski JB, Hurlbut GD, Ziegler RJ, Chu Q, Hodges BL, Ashe KM, Bree M, Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Scheule RK. Systemic administration of AAV8-alpha-galactosidase A induces humoral tolerance in nonhuman primates despite low hepatic expression. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2011;19(11):1999-2011.
- 25 33. Passini MA, Bu J, Fidler JA, Ziegler RJ, Foley JW, Dodge JC, Yang WW, Clarke J, Taksir TV, Griffiths DA, Zhao MA, O'Riordan CR, Schuchman EH, Shihabuddin LS, Cheng SH. Combination brain and systemic injections of AAV provide maximal functional and survival benefits in the Niemann-Pick mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(22):9505-10.
- 30 34. Sharland A, Logan GJ, Bishop A, Alexander IE. Liver-directed gene expression using recombinant AAV 2/8 vectors--a tolerogenic strategy for gene delivery? *Discovery medicine*. 2010;9(49):519-27.
- 35 35. Somanathan S, Breous E, Bell P, Wilson JM. AAV vectors avoid inflammatory signals necessary to render transduced hepatocyte targets for destructive T cells. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2010;18(5):977 -82.
- 36 36. Sun B, Bird A, Young SP, Kishnani PS, Chen YT, Koeberl DD. Enhanced response to enzyme replacement therapy in Pompe disease after the induction of immune tolerance. *American journal of human genetics*. 2007;81(5):1042-9.
- 40 37. Ziegler RJ, Lonning SM, Armentano D, Li C, Souza DW, Cherry M, Ford C, Barbon CM, Desnick RJ, Gao G, Wilson JM, Peluso R, Godwin S, Carter BJ, Gregory RJ, Wadsworth SC, Cheng SH. AAV2 vector harboring a liver-restricted promoter facilitates sustained expression of therapeutic levels of alpha-galactosidase A and the induction of immune tolerance in Fabry mice. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2004;9(2):231-40.
- 45 38. Moses H, Picone MA, Smith V. An In-Depth Overview: Consensus Medical Communications; 2012.
39. Gonsette RE. Self-tolerance in multiple sclerosis. *Acta neurologica Belgica*. 2012;112(2):133-40
- 50 40. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2004;199(7):971-9
- 55 41. Zozulya AL, Wiendl H. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nature Clinical Practice Neurology*. 2008;4(7):384-98.
42. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(12):849-59. doi: 10.1038/nri2889.
- 60 43. Buc M. Role of Regulatory T Cells in Pathogenesis and Biological Therapy of Multiple Sclerosis. *Mediators of Inflammation*. 2013;2013(6):1-11.
44. Costantino CM, Baecher-Allan C, Hafler DA. Multiple Sclerosis and Regulatory T Cells. *Journal of Clinical Immunology*. 2008;28(6):697-706.
- 65 45. Hoffman BE, Herzog RW. Coaxing the liver into preventing autoimmune disease in the brain. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(10):3271-3.

46. Luth S, Huber S, Schramm C, Buch T, Zander S, Stadelmann C, Bruck W, Wraith DC, Herkel J, Lohse AW. Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(10):3403-10.
47. Haas J, Korporeal M, Balint B, Fritzsche B, Schwarz A, Wildemann B. Glatiramer acetate improves regulatory T-cell function by expansion of naive CD4(+)CD25(+)FOXP3(+)CD31(+) T-cells in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2009;216(1-2):113-7.
48. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, Chowdary P, Riddell A, Pie AJ, Harrington C, O'Beirne J, Smith K, Pasi J, Glader B, Rustagi P, Ng CY, Kay MA, Zhou J, Spence Y, Morton CL, Allay J, Coleman J, Sleep S, Cunningham JM, Srivastava D, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F, High KA, Gray JT, Reiss UM, Nienhuis AW, Davidoff AM. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *The New England journal of medicine*. 2011;365(25):2357-65.
49. Herzog RW, Cao O, Srivastava A. Two decades of clinical gene therapy--success is finally mounting. *Discovery medicine*. 2010;9(45):105-11. Epub 2010/03/03.
50. Mingozzi F, High KA. Therapeutic *in vivo* gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet*. 2011;12(5):341-55.
51. Maclaren RE, Groppe M, Barnard AR, Cottrill CL, Tolmachova T, Seymour L, Clark KR, During MJ, Cremers FP, Black GC, Lotery AJ, Downes SM, Webster AR, Seabra MC. Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet*. 2014. Epub 2014/01/21.
52. Bryant LM, Christopher DM, Giles AR, Hinderer C, Rodriguez JL, Smith JB, Traxler EA, Tycko J, Wojno AP, Wilson JM. Lessons learned from the clinical development and market authorization of Glybera. *Human gene therapy Clinical development*. 2013;24(2):55-64.
53. Byrne BJ, Falk DJ, Pacak CA, Nayak S, Herzog RW, Elder ME, Collins SW, Conlon TJ, Clement N, Cleaver BD, Cloutier DA, Porvasnik SL, Islam S, Elmallah MK, Martin A, Smith BK, Fuller DD, Lawson LA, Mah CS. Pompe disease gene therapy. *Human molecular genetics*. 2011;20(R1):R61-R68.
54. Moghimi B, Sack BK, Nayak S, Markusic DM, Mah CS, Herzog RW. Induction of tolerance to factor VIII by transient co-administration with rapamycin. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. 2011;9(8):1524-1533.
55. Nayak S, Cao O, Hoffman BE, Cooper M, Zhou S, Atkinson MA, Herzog RW. Prophylactic immune tolerance induced by changing the ratio of antigen-specific effector to regulatory T cells. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. 2009;7(9):1523-1532.
56. Nayak S, Sarkar D, Perrin GQ, Moghimi B, Hoffman BE, Zhou S, Byrne BJ, Herzog RW. Prevention and Reversal of Antibody Responses Against Factor IX in Gene Therapy for Hemophilia B. *Frontiers in Microbiology*. 2011;2.
57. Martino AT, Nayak S, Hoffman BE, Cooper M, Liao G, Markusic DM, Byrne BJ, Terhorst C, Herzog RW. Tolerance induction to cytoplasmic beta-galactosidase by hepatic AAV gene transfer: implications for antigen presentation and immunotoxicity. *PloS one*. 2009;4(8):e6376.
58. Lalive PH, Molnarfi N, Benkhoucha M, Weber MS, Santiago-Raber ML. Antibody response in MOG(35-55) induced EAE. *J Neuroimmunol*. 2011;240-241:28-33. doi: 10.1016/j.jneuroim.2011.09.005.
59. Mann MK, Ray A, Basu S, Karp CL, Dittel BN. Pathogenic and regulatory roles for B cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autoimmunity*. 2012;45(5):388-399.
60. Miller SD, Karpus WJ, Davidson TS. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Current protocols in immunology / edited by John E Coligan [et al]*. 2010;Chapter 15:Unit 15.1.
61. Ko HJ, Chung JY, Nasa Z, Chan J, Siatskas C, Toh BH, Alderuccio F. Targeting MOG expression to dendritic cells delays onset of experimental autoimmune disease. *Autoimmunity*. 2011;44(3): 177-87.
62. Dobrzynski E, Mingozzi F, Liu YL, Bendo E, Cao O, Wang L, Herzog RW. Induction of antigen-specific CD4⁺ T-cell anergy and deletion by *in vivo* viral gene transfer. *Blood*. 2004;104(4):969-77.
63. Fissolo N, Costa C, Nurtdinov RN, Bustamante MF, Llombart V, Mansilla MJ, Espejo C, Montalban X, Comabella M. Treatment with MOG-DNA vaccines induces CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells and up-regulates genes with neuroprotective functions in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroinflammation*.

2012;9:139.

64. O'Connor RA, Anderton SM. Foxp3⁺ regulatory T cells in the control of experimental CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol.* 2008;193(1-2):1-11.

65. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, Masteller EL, McDevitt H, Bonyhadi M, Bluestone JA. *In vitro*-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med.* 2004;199(11):1455-65.

66. Chen X, Oppenheim JJ, Winkler-Pickett RT, Ortaldo JR, Howard OM. Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells *in vivo* and enhances their capacity to suppress EAE. *European journal of immunology.* 2006;36(8):2139-49.

67. Oleszak EL, *Hoffman BE, Chang JR, Zaczynska E, Gaughan J, Katsetos CD, Platsoucas CD, Harvey N. Apoptosis of infiltrating T cells in the central nervous system of mice infected with Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Virology.* 2003;315(1):110-23. Epub 2003/11/01.

68. Selvaraj RK, Geiger TL. Mitigation of experimental allergic encephalomyelitis by TGF-beta induced Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes through the induction of anergy and infectious tolerance. *Journal of immunology.* 2008;180(5):2830-8.

69. Esposito M, Ruffini F, Bellone M, Gagliani N, Battaglia M, Martino G, Furlan R. Rapamycin inhibits relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by both effector and regulatory T cells modulation. *J. Neuroimmunol.,* 2010;220(1-2):52-63.

70. Bensinger SJ, Walsh PT, Zhang J, Carroll M, Parsons R, Rathmell JC, Thompson CB, Burchill MA, Farrar MA, Turka LA. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Journal of immunology.* 2004;172(9):5287-96.

71. O'Connor RA, Malpass KH, Anderton SM. The inflamed central nervous system drives the activation and rapid proliferation of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Journal of immunology.* 2007;179(2):958-66.

72. Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, Backstrom BT, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nature medicine.* 2007;13(4):423-31.

73. Niemeyer GP, Herzog RW, Mount J, Arruda VR, Tillson DM, Hathcock J, van Ginkel FW, High KA, Lothrop CD, Jr. Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood.* 2009 113(4):797-806.

Ejemplo 4 - Datos adicionales del modelo de EAE de ratón y evaluación de otras proteínas

Se inyectaron los animales por vía intravenosa en la vena caudal con 10¹¹ partículas de vector de VAA8-apoE/haAT-MOG. La secuencia de MOG que se utilizó era la MOG murina. Se demostró que el transgén de MOG se expresaba en el hígado como se evidenció por el aumento de la cantidad de proteína MOG (FIG. 11= en las muestras del hígado.

Para asegurar que el VAA no interfería con el desarrollo o progresión de la EAE en el modelo de ratón descrito en los otros Ejemplos, se inyectó el VAA8-GFP por vía intravenosa en los ratones. Dos semanas después, Se indujo la EAE o no. El vector de control VAA no parecía que interfiriera con el desarrollo o la progresión de la EAE (FIG. 12).

En otro estudio, la EAE se indujo en ratones C57BL/6. En distintos momentos del déficit neurológico con una puntuación clínica media (MCS) ~0,3, ~ 0,8, o ~ 1,3, los ratones recibieron el vector VAA8-MOG o de control. Se registró la puntuación clínica media. Incluso al aumentar la patología de la enfermedad, el vector VAA-MOG tenía un déficit neurológico significativamente reducido en comparación con los ratones tratados con el vector de control (FIG. 13A-C). Los gráficos de barras muestran la significación estadística entre las puntuaciones finales y las puntuaciones pico-a-final.

En un estudio posterior, se tomaron secciones en serie de la médula espinal de un ratón hembra con EAE inducida ~35 días después de recibir el vector de control (MCS = 4,0). La tinción con hematoxilina y eosina presentaba áreas de alta infiltración inflamatoria (FIG.14A). La tinción con Luxol azul rápido muestra áreas de desmielinización (FIG. 14B). Por el contrario, las secciones en serie de la médula espinal de un ratón hembra con EAE inducida ~35 días después de recibir el vector de VAA-MOG (MCS = 1,25). presentaban supresión de la inflamación. La tinción con hematoxilina y eosina presentaba disminución de la infiltración (FIG.15A). La tinción con Luxol azul rápido parecía tener menos áreas de desmielinización como resultado de la supresión de la inflamación (FIG. 15B).

En otro estudio, se midió la supresión mediada por células T reguladoras (reguladores T) mediante un Trazador Celular

CFDA-SE. Se aislaron las células T efectoras a partir de los ratones C57BL/6 y se marcaron con CFDA. Las células se cultivaron solas o en presencia de reguladores T con diferentes relaciones reg T: efec T. Después de 72 horas, se determinó la proliferación por dilución CFDA y análisis de citometría de flujo. Se descubrió que los reguladores T aislados de los bazo de los ratones tratados con VAA-MOG eran funcionalmente supresores (FIG. 16A y 16B).

En un estudio posterior, se evaluó la capacidad del VAA-MOT para inducir reguladores T específicos del antígeno. Los esplenocitos de los ratones inyectados con el vector VAA- MOG 8 semanas antes presentaban un aumento de la frecuencia del tetramero I-Ab MOG₃₅₋₅₅ positivo a CD4+ y reguladores T + en comparación con el tetramero de control (FIG. 17A-D), indicando que el vector VAA-MOG inducía reguladores T específicos de antígeno.

Seguidamente, se ensayó un vector PLP. Se utilizó un VAA8-PLP para esta parte del estudio. La PLP que se utilizó era la PLP murina. Este experimento inicial de prueba del concepto demostró la línea temporal y la puntuación clínica para la inducción satisfactoria de PLP/EAE y el beneficio terapéutico potencial de la transferencia génica hepática. Se inyectaron ratones SJL hembra con el VAA8-PLP o el control 2 semanas antes de la inmunización con 200 µg de PLP emulsionada en CFA que contenía 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*. Los signos clínicos de EAE comenzaban ~10 días después en cuyo momento los ratones se evaluaron dos veces al día. Los ratones se puntuaron de acuerdo con la gravedad de los signos clínicos (FIG. 2). Claramente, los ratones que recibieron el vector VAA8-PLP tenían una reducción significativa de la enfermedad en el pico de la aparición (FIG. 18). También había una disminución significativa en la MCS durante la recaída (día 26) con menos recaídas en total (FIG. 18). Estos resultados demuestran que el VAA8-PLP reducía la gravedad clínica en ratones con EAE en remisión-recaída inducida por PLP. El aumento de la reducción o la prevención completa se anticipa con la optimización de la dosis y programación del vector.

Finalmente, se ensayó un vector MBP. Se utilizó un VAA8-MBP para esta parte del estudio. La MBP que se utilizó era la MBP murina. El análisis de la transferencia de Western de la proteína extraída del hígado de los ratones inyectados con VAA8-MBP presentaba un aumento de la expresión de MBP (FIG. 19a), que era congruente con un aumento de los niveles de ARNm (FIG. 19B).

Se debería entender que los ejemplos y opciones descritos en el presente documento son con fines solamente ilustrativos. La mención de intervalos de valores en el presente documento pretende simplemente servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento, y cada valor separado se incorpora a la memoria descriptiva como si se enumerara de manera individual en el presente documento.

La descripción en el presente documento de cualquier aspecto u opción de la divulgación usando términos tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene" con referencia a un elemento o elementos pretende proporcionar soporte para un aspecto u opción similar de la divulgación que "consiste en", "consiste esencialmente en" o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos en particular, a menos que se indique de otro modo o se contradiga claramente por el contexto (por ejemplo, una composición que se describe en el presente documento que comprende un elemento particular debe entenderse que también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se indique de otro modo o se contradiga claramente por el contexto).

Todas las composiciones y métodos desvelados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin excesiva experimentación a la luz de la presente divulgación.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> University of Florida Research Foundation, Inc.

<120> TERAPIA GÉNICA BASADA EN VAA PARA LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

<130> U1197.70049WO00

<150> US 61/983.924

<151> 24-04-2014

<160> 37

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 195

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

ES 2 814 280 T3

Met 1	Gly	Asn	His	Ser 5	Gly	Lys	Arg	Glu	Leu 10	Ser	Ala	Glu	Lys	Ala 15	Ser
Lys	Asp	Gly	Glu 20	Ile	His	Arg	Gly	Glu 25	Ala	Gly	Lys	Lys	Arg 30	Ser	Val
Gly	Lys	Leu 35	Ser	Gln	Thr	Ala	Ser 40	Glu	Asp	Ser	Asp	Val 45	Phe	Gly	Glu
Ala	Asp 50	Ala	Ile	Gln	Asn	Asn 55	Gly	Thr	Ser	Ala	Glu 60	Asp	Thr	Ala	Val
Thr 65	Asp	Ser	Lys	His	Thr 70	Ala	Asp	Pro	Lys	Asn 75	Asn	Trp	Gln	Gly	Ala 80
His	Pro	Ala	Asp	Pro 85	Gly	Asn	Arg	Pro	His 90	Leu	Ile	Arg	Leu	Phe 95	Ser
Arg	Asp	Ala 100	Pro	Gly	Arg	Glu	Asp 105	Asn	Thr	Phe	Lys	Asp 110	Arg	Pro	Ser
Glu	Ser	Asp 115	Glu	Leu	Gln	Thr	Ile 120	Gln	Glu	Asp	Pro	Thr 125	Ala	Ala	Ser
Gly	Gly 130	Leu	Asp	Val	Met	Ala 135	Ser	Gln	Lys	Arg	Pro 140	Ser	Gln	Arg	Ser
Lys 145	Tyr	Leu	Ala	Thr	Ala 150	Ser	Thr	Met	Asp	His 155	Ala	Arg	His	Gly	Phe 160
Leu	Pro	Arg	His	Arg	Asp	Thr	Gly	Ile	Leu	Asp	Ser	Ile	Gly	Arg	Phe

165

170

175

Phe Ser Gly Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Val Ser
180 185 190

Ser Glu Pro
195

5 <210> 2
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 2

ES 2 814 280 T3

Met Gly Leu Leu Glu Cys Cys Ala Arg Cys Leu Val Gly Ala Pro Phe
1 5 10 15

Ala Ser Leu Val Ala Thr Gly Leu Cys Phe Phe Gly Val Ala Leu Phe
20 25 30

Cys Gly Cys Gly His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu
35 40 45

Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile Asn Val
50 55 60

Ile His Ala Phe Gln Tyr Val Ile Tyr Gly Thr Ala Ser Phe Phe Phe
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ala Leu Leu Leu Ala Glu Gly Phe Tyr Thr Thr Gly Ala
85 90 95

Val Arg Gln Ile Phe Gly Asp Tyr Lys Thr Thr Ile Cys Gly Lys Gly
100 105 110

Leu Ser Ala Thr Val Thr Gly Gly Gln Lys Gly Arg Gly Ser Arg Gly
115 120 125

Gln His Gln Ala His Ser Leu Glu Arg Val Cys His Cys Leu Gly Lys
130 135 140

Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe Val Gly Ile Thr Tyr Ala Leu Thr
145 150 155 160

Val Val Trp Leu Leu Val Phe Ala Cys Ser Ala Val Pro Val Tyr Ile
165 170 175

Tyr Phe Asn Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys
180 185 190

Thr Ser Ala Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly
195 200 205

Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn Leu
210 215 220

Leu Ser Ile Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met Thr Phe His Leu Phe
225 230 235 240

Ile Ala Ala Phe Val Gly Ala Ala
245

<210> 3
<211> 247
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

ES 2 814 280 T3

<400> 3

Met	Ala	Cys	Leu	Trp	Ser	Phe	Ser	Leu	Pro	Ser	Cys	Phe	Leu	Ser	Leu
1				5					10					15	

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Leu Ser Cys Ser Tyr Ala Gly Gln Phe
20 25 30

Arg Val Ile Gly Pro Gly Tyr Pro Ile Arg Ala Leu Val Gly Asp Glu
35 40 45

Ala Glu Leu Pro Cys Arg Ile Ser Pro Gly Lys Asn Ala Thr Gly Met
50 55 60

Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Asp Gln Asp Ala Glu Gln Ala Pro Glu Tyr Arg Gly
85 90 95

Arg Thr Glu Leu Leu Lys Glu Thr Ile Ser Glu Gly Lys Val Thr Leu
100 105 110

Arg Ile Gln Asn Val Arg Phe Ser Asp Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Phe
115 120 125

Phe Arg Asp His Ser Tyr Gln Glu Glu Ala Ala Met Glu Leu Lys Val
130 135 140

Glu Asp Pro Phe Tyr Trp Val Asn Pro Gly Val Leu Thr Leu Ile Ala

ES 2 814 280 T3

145		150		155		160
Leu Val Pro Thr	Ile Leu Leu Gln Val	Ser Val Gly Leu Val	Phe Leu			
	165	170	175			
Phe Leu Gln His	Arg Leu Arg Gly	Lys Leu Arg Ala	Glu Val Glu Asn			
	180	185	190			
Leu His Arg Thr	Phe Asp Pro His	Phe Leu Arg Val	Pro Cys Trp Lys			
	195	200	205			
Ile Thr Leu Phe	Val Ile Val Pro Val	Leu Gly Pro Leu	Val Ala Leu			
	210	215	220			
Ile Ile Cys Tyr	Asn Trp Leu His	Arg Arg Leu Ala	Gly Gln Phe Leu			
	225	230	235	240		
Glu Glu Leu Arg	Asn Pro Leu					
	245					

<210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido de PLP

<400> 4

His Cys Leu Gly	Lys Trp Leu Gly	His Pro Asp Lys Phe
1	5	10

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido de PLP

<400> 5

Asn Thr Trp Thr	Cys Gln Ser Ile	Ala Phe Pro
1	5	10

<210> 6
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido de MOG

<400> 6

ES 2 814 280 T3

Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu
1 5 10 15

Tyr Arg Asn Gly Lys
20

5 <210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido de MOG

<400> 7

Asp Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Phe Phe Arg Asp His Ser Tyr Gln
1 5 10 15

15 <210> 8
<211> 744
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

20 <400> 8

```
atggcctggt tgtggagctt ctctttgcc agctgcttcc tctcccttct cctcctcctt      60
ctcctccagt tgtcatgcag ctatgcagga caattcagag tgataggacc agggatatccc      120
atccgggctt tagttgggga tgaagcagag ctgccgtgcc gcatctctcc tgggaaaaaat      180
gccacgggca tggaggtggg ttggtaccgt tctcccttct caagagtggg tcacctctac      240
cgaaatggca aggaccaaga tgcagagcaa gcacctgaat accggggacg cacagagctt      300
ctgaaagaga ctatcagtga gggaaagggt acccttagga ttcagaacgt gagattctca      360
gatgaaggag gctacacctg cttcttcaga gaccactctt accaagaaga ggcagcaatg      420
gagttgaaag tggaagatcc cttctattgg gtcaaccccg gtgtgctgac tctcatcgca      480
cttgtgccta cgatcctcct gcagggtctt gtaggccttg tattcctctt cctgcagcac      540
agactgagag gaaaacttcg tgcagaagta gagaatctcc atcggacttt tgatcctcac      600
ttcctgaggg tgccctgctg gaagataaca ctgtttgtta ttgtgcctgt tcttggaacc      660
ctggttgctt tgatcatctg ctacaactgg ctgcaccgaa gactggcagg acagtttctt      720
gaagagctaa gaaacccctt ttga                                     744
```

25 <210> 9
<211> 247
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

30 <400> 9

ES 2 814 280 T3

Met	Ala	Cys	Leu	Trp	Ser	Phe	Ser	Trp	Pro	Ser	Cys	Phe	Leu	Ser	Leu	1	5	10	15
Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gln	Leu	Ser	Cys	Ser	Tyr	Ala	Gly	Gln	Phe	20	25	30	
Arg	Val	Ile	Gly	Pro	Gly	Tyr	Pro	Ile	Arg	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Glu	35	40	45	
Ala	Glu	Leu	Pro	Cys	Arg	Ile	Ser	Pro	Gly	Lys	Asn	Ala	Thr	Gly	Met	50	55	60	
Glu	Val	Gly	Trp	Tyr	Arg	Ser	Pro	Phe	Ser	Arg	Val	Val	His	Leu	Tyr	65	70	75	80
Arg	Asn	Gly	Lys	Asp	Gln	Asp	Ala	Glu	Gln	Ala	Pro	Glu	Tyr	Arg	Gly	85	90	95	
Arg	Thr	Glu	Leu	Leu	Lys	Glu	Thr	Ile	Ser	Glu	Gly	Lys	Val	Thr	Leu	100	105	110	
Arg	Ile	Gln	Asn	Val	Arg	Phe	Ser	Asp	Glu	Gly	Gly	Tyr	Thr	Cys	Phe	115	120	125	
Phe	Arg	Asp	His	Ser	Tyr	Gln	Glu	Glu	Ala	Ala	Met	Glu	Leu	Lys	Val	130	135	140	
Glu	Asp	Pro	Phe	Tyr	Trp	Val	Asn	Pro	Gly	Val	Leu	Thr	Leu	Ile	Ala	145	150	155	160
Leu	Val	Pro	Thr	Ile	Leu	Leu	Gln	Val	Ser	Val	Gly	Leu	Val	Phe	Leu	165	170	175	
Phe	Leu	Gln	His	Arg	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	180	185	190	
Leu	His	Arg	Thr	Phe	Asp	Pro	His	Phe	Leu	Arg	Val	Pro	Cys	Trp	Lys	195	200	205	
Ile	Thr	Leu	Phe	Val	Ile	Val	Pro	Val	Leu	Gly	Pro	Leu	Val	Ala	Leu	210	215	220	
Ile	Ile	Cys	Tyr	Asn	Trp	Leu	His	Arg	Arg	Leu	Ala	Gly	Gln	Phe	Leu	225	230	235	240
Glu	Glu	Leu	Arg	Asn	Pro	Phe	245												

<210> 10
<211> 834
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

5

<400> 10
atgggcttgt tagagtgttg tgctagatgt ctggtagggg cccctttgc ttccctggtg 60
gccactggat tgtgtttctt tggagtggca ctgttctgtg gatgtggaca tgaagctctc 120
actggtacag aaaagctaata tgagacctat ttctccaaaa actaccagga ctatgagtat 180
ctcattaatg tgattcatgc tttccagtat gtcattctatg gaactgcctc tttcttcttc 240
ctttatgggg ccctcctgct ggctgagggc ttctacacca ccggcgctgt caggcagatc 300
tttggcgact acaagaccac catctgcggc aagggcctga gcgcaacggt aacagggggc 360
cagaagggga ggggttccag aggccaaacat caagctcatt ctttggagcg ggtgtgtcat 420
tggttgggaa aatggctagg acatcccgc aagtttgtgg gcatcaccta tgccctgact 480
gttgtatggc tcctggtgtt tgcctgctcg gctgtacctg tgtacattta cttcaatacc 540
tggaaccact gtcagtctat tgccttcctt agcaagacct ctgccagtat aggcagtctc 600
tgcgctgatg ccagaatgta tgggtgttct ccatggaatg ctttccctgg caaggtttgt 660
ggctccaacc ttctgtccat ctgcaaaaca gctgagttcc aaatgacctt ccacctgttt 720
attgctgcgt ttgtgggtgc tgcggccaca ctagtttccc tgctcacctt catgattgct 780
gccacttaca acttcgccgt ccttaaactc atggggccgag gcaccaagtt ctga 834

10

<210> 11
<211> 277
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15

<400> 11
Met Gly Leu Leu Glu Cys Cys Ala Arg Cys Leu Val Gly Ala Pro Phe
1 5 10 15
Ala Ser Leu Val Ala Thr Gly Leu Cys Phe Phe Gly Val Ala Leu Phe
20 25 30
Cys Gly Cys Gly His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu
35 40 45
Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile Asn Val
50 55 60
Ile His Ala Phe Gln Tyr Val Ile Tyr Gly Thr Ala Ser Phe Phe Phe
65 70 75 80

ES 2 814 280 T3

Leu Tyr Gly Ala Leu Leu Leu Ala Glu Gly Phe Tyr Thr Thr Gly Ala
85 90 95

Val Arg Gln Ile Phe Gly Asp Tyr Lys Thr Thr Ile Cys Gly Lys Gly
100 105 110

Leu Ser Ala Thr Val Thr Gly Gly Gln Lys Gly Arg Gly Ser Arg Gly
115 120 125

Gln His Gln Ala His Ser Leu Glu Arg Val Cys His Cys Leu Gly Lys
130 135 140

Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe Val Gly Ile Thr Tyr Ala Leu Thr
145 150 155 160

Val Val Trp Leu Leu Val Phe Ala Cys Ser Ala Val Pro Val Tyr Ile
165 170 175

Tyr Phe Asn Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys
180 185 190

Thr Ser Ala Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly
195 200 205

Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn Leu
210 215 220

Leu Ser Ile Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met Thr Phe His Leu Phe
225 230 235 240

Ile Ala Ala Phe Val Gly Ala Ala Ala Thr Leu Val Ser Leu Leu Thr
245 250 255

Phe Met Ile Ala Ala Thr Tyr Asn Phe Ala Val Leu Lys Leu Met Gly
260 265 270

Arg Gly Thr Lys Phe
275

<210> 12
<211> 588
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 12

atgggaaacc actctggaag gagagaatta tctgctgaga aggccagtaa ggatggagag 60
attcaccgag gagaggctgg aaagaagaga agcgtgggca agctttctca gacggcctca 120

ES 2 814 280 T3

gaggacagtg atgtgtttgg ggaggcagat gcgatccaga acaatgggac ctcggtgag 180
gacacggcgg tgacagactc caagcacaca gcagacccaa agaataactg gcaaggcgcc 240
caccagctg acccagggaa ccgccccac ttgatccgcc tcttttcccg agatgccccg 300
ggaagggagg acaacacctt caaagacagg ccctcagagt ccgacgagct tcagaccatc 360
caagaagacc ccacagcagc ttccggaggc ctggatgtga tggcatcaca gaagagaccc 420
tcacagcgat ccaagtacct ggccacagca agtaccatgg accatgccag gcatggcttc 480
ctcccaaggc acagagacac gggcatcctt gactccatcg ggcgcttctt tagcggtgac 540
aggggtgcgc ccaagcgggg ctctggcaag gtgagctccg agccgtag 588

<210> 13

<211> 195

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 13

Met Gly Asn His Ser Gly Lys Arg Glu Leu Ser Ala Glu Lys Ala Ser
1 5 10 15

Lys Asp Gly Glu Ile His Arg Gly Glu Ala Gly Lys Lys Arg Ser Val
20 25 30

Gly Lys Leu Ser Gln Thr Ala Ser Glu Asp Ser Asp Val Phe Gly Glu
35 40 45

Ala Asp Ala Ile Gln Asn Asn Gly Thr Ser Ala Glu Asp Thr Ala Val
50 55 60

Thr Asp Ser Lys His Thr Ala Asp Pro Lys Asn Asn Trp Gln Gly Ala
65 70 75 80

His Pro Ala Asp Pro Gly Asn Arg Pro His Leu Ile Arg Leu Phe Ser
85 90 95

Arg Asp Ala Pro Gly Arg Glu Asp Asn Thr Phe Lys Asp Arg Pro Ser
100 105 110

Glu Ser Asp Glu Leu Gln Thr Ile Gln Glu Asp Pro Thr Ala Ala Ser
115 120 125

Gly Gly Leu Asp Val Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg Ser
130 135 140

Lys Tyr Leu Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe
145 150 155 160

5

10

ES 2 814 280 T3

Leu Pro Arg His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe
165 170 175

Phe Ser Gly Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Val Ser
180 185 190

Ser Glu Pro
195

<210> 14
<211> 744
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

atggcaagct tatcgagacc ctctctgccc agctgcctct gctccttcct cctcctcctc 60
ctcctccaag tgtcttccag ctatgcaggg cagttcagag tgataggacc aagacaccct 120
atccgggctc tggtcgggga tgaagtggaa ttgccatgtc gcatatctcc tgggaagaac 180
gctacaggca tggaggtggg gtggtaccgc ccccccttct ctaggggtggg tcatctctac 240
agaaatggca aggaccaaga tggagaccag gcacctgaat atcggggccg gacagagctg 300
ctgaaagatg ctattggtga gggaaaggtg actctcagga tccggaatgt aaggttctca 360
gatgaaggag gtttcacctg cttcttccga gatcattctt accaagagga ggcagcaatg 420
gaattgaaag tagaagatcc tttctactgg gtgagccctg gagtgtgtgt tctcctcgcg 480
gtgctgcctg tgctcctcct gcagatcact gttggcctcg tcttcctctg cctgcagtac 540
agactgagag gaaaacttcg agcagagata gagaatctcc accggacttt tgatccccac 600
tttctgaggg tgccctgctg gaagataacc ctgtttgtaa ttgtgccggt tcttggaacc 660
ttggttgctt tgatcatctg ctacaactgg ctacatcgaa gactagcagg gcaattcctt 720
gaagagctac gaaatccctt ctga 744

<210> 15
<211> 247
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Met Ala Ser Leu Ser Arg Pro Ser Leu Pro Ser Cys Leu Cys Ser Phe
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Ser Tyr Ala Gly Gln Phe
20 25 30

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

ES 2 814 280 T3

Val Glu Leu Pro Cys Arg Ile Ser Pro Gly Lys Asn Ala Thr Gly Met
50 55 60

Glu Val Gly Trp Tyr Arg Pro Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr
65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Asp Gln Asp Gly Asp Gln Ala Pro Glu Tyr Arg Gly
85 90 95

Arg Thr Glu Leu Leu Lys Asp Ala Ile Gly Glu Gly Lys Val Thr Leu
100 105 110

Arg Ile Arg Asn Val Arg Phe Ser Asp Glu Gly Gly Phe Thr Cys Phe
115 120 125

Phe Arg Asp His Ser Tyr Gln Glu Glu Ala Ala Met Glu Leu Lys Val
130 135 140

Glu Asp Pro Phe Tyr Trp Val Ser Pro Gly Val Leu Val Leu Leu Ala
145 150 155 160

Val Leu Pro Val Leu Leu Leu Gln Ile Thr Val Gly Leu Val Phe Leu
165 170 175

Cys Leu Gln Tyr Arg Leu Arg Gly Lys Leu Arg Ala Glu Ile Glu Asn
180 185 190

Leu His Arg Thr Phe Asp Pro His Phe Leu Arg Val Pro Cys Trp Lys
195 200 205

Ile Thr Leu Phe Val Ile Val Pro Val Leu Gly Pro Leu Val Ala Leu
210 215 220

Ile Ile Cys Tyr Asn Trp Leu His Arg Arg Leu Ala Gly Gln Phe Leu
225 230 235 240

Glu Glu Leu Arg Asn Pro Phe
245

<210> 16
<211> 915
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

atgggaaacc acgcaggcaa acgagaatta aatgccgaga aggccagtac gaatagttaa 60
actaacagag gagaatctga aaaaaagaga aacctgggtg aactttcacg gacaacctca 120

gaggacaacg aagtgttcgg agaggcagat gcgaaccaga acaatgggac ctctctcag 180
gacacagcgg tgactgactc caagcgcaca gcggaccgga agaatgcctg gcaggatgcc 240
caccagctg acccagggag ccgccccac ttgatccgcc tcttttcccg agatgccccg 300
gggagggagg acaacacctt caaagacagg ccctctgagt ccgacgagct ccagaccatc 360
caagaagaca gtgcagccac ctccgagagc ctggatgtga tggcgtcaca gaagagaccc 420
tcccagaggc acggatccaa gtacctggcc acagcaagta ccatggacca tgccaggcat 480
ggcttcctcc caaggcacag agacacgggc atccttgact ccatcgggcg cttctttggc 540
ggtgacaggg gtgcgcccaa gcggggctct ggcaaggact cacaccaccc ggcaagaact 600
gctcactacg gctccctgcc ccagaagtca cacggccgga cccaagatga aaaccccgta 660
gtccacttct tcaagaacat tgtgacgcct cgcacaccac ccccgtcgca gggaaagggg 720
agaggactgt ccctgagcag atttagctgg ggggccgaag gccagagacc aggatttggc 780
tacggaggca gagcgtccga ctataaatcg gctcacaagg gattcaaggg agtcgatgcc 840
cagggcacgc ttccaaaat ttttaagctg ggaggaagag atagtcgctc tggatcaccc 900
atggctagac gctga 915

<210> 17
<211> 304
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Met	Gly	Asn	His	Ala	Gly	Lys	Arg	Glu	Leu	Asn	Ala	Glu	Lys	Ala	Ser
1				5					10					15	
Thr	Asn	Ser	Glu	Thr	Asn	Arg	Gly	Glu	Ser	Glu	Lys	Lys	Arg	Asn	Leu
			20					25					30		
Gly	Glu	Leu	Ser	Arg	Thr	Thr	Ser	Glu	Asp	Asn	Glu	Val	Phe	Gly	Glu
		35					40					45			
Ala	Asp	Ala	Asn	Gln	Asn	Asn	Gly	Thr	Ser	Ser	Gln	Asp	Thr	Ala	Val
	50					55					60				
Thr	Asp	Ser	Lys	Arg	Thr	Ala	Asp	Pro	Lys	Asn	Ala	Trp	Gln	Asp	Ala
65					70					75					80
His	Pro	Ala	Asp	Pro	Gly	Ser	Arg	Pro	His	Leu	Ile	Arg	Leu	Phe	Ser
				85					90					95	
Arg	Asp	Ala	Pro	Gly	Arg	Glu	Asp	Asn	Thr	Phe	Lys	Asp	Arg	Pro	Ser
			100					105					110		

ES 2 814 280 T3

Glu Ser Asp Glu Leu Gln Thr Ile Gln Glu Asp Ser Ala Ala Thr Ser
115 120 125

Glu Ser Leu Asp Val Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His
130 135 140

Gly Ser Lys Tyr Leu Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His
145 150 155 160

Gly Phe Leu Pro Arg His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly
165 170 175

Arg Phe Phe Gly Gly Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys
180 185 190

Asp Ser His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln
195 200 205

Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe
210 215 220

Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly
225 230 235 240

Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe Ser Trp Gly Ala Glu Gly Gln Arg
245 250 255

Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His
260 265 270

Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe
275 280 285

Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg
290 295 300

<210> 18
<211> 594
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

atggcgctcac	agaagagacc	ctcccagagg	cacggatcca	agtacctggc	cacagcaagt	60
accatggacc	atgccaggca	tggcttcctc	ccaaggcaca	gagacacggg	catccttgac	120
tccatcgggc	gcttccttgg	cggtgacagg	ggtgcgccca	agcggggctc	tggcaaggta	180
ccctgggctaa	agccggggccg	gagccctctg	ccctctcatg	cccgcagcca	gcctgggctg	240

ES 2 814 280 T3

tgcaacatgt acaaggactc acaccacccg gcaagaactg ctcactacgg ctccctgccc	300
cagaagtcac acggccggac ccaagatgaa aaccccgtag tccacttctt caagaacatt	360
gtgacgcctc gcacaccacc cccgtcgcag ggaaagggga gaggactgtc cctgagcaga	420
tttagctggg gggccgaagg ccagagacca ggatttggct acggaggcag agcgtccgac	480
tataaatcgg ctcacaaggg attcaaggga gtcgatgccc agggcacgct ttccaaaatt	540
tttaagctgg gaggaagaga tagtcgctct ggatcaccca tggctagacg ctga	594

<210> 19
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 19

ES 2 814 280 T3

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu
1 5 10 15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg
20 25 30

His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly
35 40 45

Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Val Pro Trp Leu Lys
50 55 60

Pro Gly Arg Ser Pro Leu Pro Ser His Ala Arg Ser Gln Pro Gly Leu
65 70 75 80

Cys Asn Met Tyr Lys Asp Ser His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr
85 90 95

Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro
100 105 110

Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro
115 120 125

Ser Gln Gly Lys Gly Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe Ser Trp Gly
130 135 140

Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Asp
145 150 155 160

Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln Gly Thr
165 170 175

Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser
180 185 190

Pro Met Ala Arg Arg
195

5 <210> 20
<211> 561
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 20

ES 2 814 280 T3

```

atggcggtcac agaagagacc ctcccagagg cacggatcca agtacctggc cacagcaagt      60
accatggacc atgccaggca tggcttcctc ccaaggcaca gagacacggg catccttgac      120
tccatcgggc gcttcttttg cggtgacagg ggtgcgcccc agcgggggctc tggcaaggta      180
ccctggctaa agccggggccg gagccctctg ccctctcatg cccgcagcca gcctgggctg      240
tgcaacatgt acaaggactc acaccacccg gcaagaactg ctactacgg ctccctgccc      300
cagaagtcac acggccggac ccaagatgaa aaccccgtag tccacttctt caagaacatt      360
gtgacgcctc gcacaccacc cccgtcgagc ggaaaggggg ccgaaggcca gagaccagga      420
tttggctacg gaggcagagc gtccgactat aaatcggctc acaagggatt caaggagtc      480
gatgccagcagg gcacgctttc caaaattttt aagctgggag gaagagatag tcgctctgga      540
tcacccatgg ctagacgctg a                                          561

```

<210> 21
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

```

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu
1          5          10          15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg
          20          25          30

His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly
          35          40          45

Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Val Pro Trp Leu Lys
          50          55          60

Pro Gly Arg Ser Pro Leu Pro Ser His Ala Arg Ser Gln Pro Gly Leu
65          70          75          80

```

ES 2 814 280 T3

Cys Asn Met Tyr Lys Asp Ser His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr
85 90 95

Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro
100 105 110

Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro
115 120 125

Ser Gln Gly Lys Gly Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly Tyr Gly
130 135 140

Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly Val
145 150 155 160

Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg Asp
165 170 175

Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg
180 185

<210> 22
<211> 516
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

atggcgctcac agaagagacc ctcccagagg cacggatcca agtacctggc cacagcaagt 60
accatggacc atgccaggca tggcttcctc ccaaggcaca gagacacggg catccttgac 120
tccatcgggc gcttcttttg cggtgacagg ggtgcgcccc agcgggggctc tggcaaggac 180
tcacaccacc cggcaagaac tgctcactac ggctccctgc ccagaagtc acacggccgg 240
acccaagatg aaaaccccgt agtccacttc ttcaagaaca ttgtgacgcc tcgcacacca 300
ccccgctcgc agggaaagg gagaggactg tccctgagca gatttagctg gggggccgaa 360
ggccagagac caggatttg ctacggaggc agagcgtccg actataaatc ggctcacaag 420
ggattcaagg gagtcgatgc ccagggcacg ctttccaaaa tttttaagct gggaggaaga 480
gatagtcgct ctggatcacc catggctaga cgctga 516

<210> 23
<211> 171
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 23

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu
1 5 10 15

ES 2 814 280 T3

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg
20 25 30

His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly
35 40 45

Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Asp Ser His His Pro
50 55 60

Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg
65 70 75 80

Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr
85 90 95

Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly Arg Gly Leu Ser Leu
100 105 110

Ser Arg Phe Ser Trp Gly Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly Tyr
115 120 125

Gly Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly
130 135 140

Val Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg
145 150 155 160

Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg
165 170

<210> 24
<211> 483
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 24

atggcgtcac agaagagacc ctcccagagg cacggatcca agtacctggc cacagcaagt 60
accatggacc atgccaggca tggcttcctc ccaaggcaca gagacacggg catccttgac 120
tccatcgggc gcttcttttg cggtgacagg ggtgcgcccc agcgggggctc tggcaaggac 180
tcacaccacc cggcaagaac tgctcactac ggctccctgc ccagaaagtc acacggccgg 240
acccaagatg aaaaccccggt agtcacttc ttcaagaaca ttgtgacgcc tcgcacacca 300
ccccgctcgc agggaaaagg ggccgaaggc cagagaccag gatttggtta cggaggcaga 360
gcgtccgact ataaatcggc tcacaaggga ttcaaggag tcgatgcccc gggcacgctt 420
tccaaaattt ttaagctggg aggaagagat agtcgctctg gatcacccat ggctagacgc 480

tga

483

5
<210> 25
<211> 160
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu
1 5 10 15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg
20 25 30

His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly
35 40 45

Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Asp Ser His His Pro
50 55 60

Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg
65 70 75 80

Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr
85 90 95

Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly Ala Glu Gly Gln Arg
100 105 110

Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His
115 120 125

Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe
130 135 140

10 Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg
145 150 155 160

15
<210> 26
<211> 594
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

atgggaaacc acgcaggcaa acgagaatta aatgccgaga aggccagtac gaatagtgaa 60

actaacagag gagaatctga aaaaaagaga aacctgggtg aactttcacg gacaacctca 120

gaggacaacg aagtgttcgg agaggcagat gcgaaccaga acaatgggac ctctctcag 180

20

ES 2 814 280 T3

gacacagcgg tgactgactc caagcgcaca gcggacccga agaatgcctg gcaggatgcc	240
caccagctg acccagggag ccgccccac ttgatccgcc tcttttcccg agatgccccg	300
gggagggagg acaacacctt caaagacagg ccctctgagt ccgacgagct ccagaccatc	360
caagaagaca gtgcagccac ctccgagagc ctggatgtga tggcgtcaca gaagagaccc	420
tcccagaggg acggatccaa gtacctggcc acagcaagta ccatggacca tgccaggcat	480
ggcttcctcc caaggcacag agacacgggc atccttgact ccatcgggcg cttctttggc	540
ggtgacaggg gtgcgcccaa gcggggctct ggcaaggtga gctctgagga gtag	594

<210> 27
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 27

5

ES 2 814 280 T3

Met	Gly	Asn	His	Ala	Gly	Lys	Arg	Glu	Leu	Asn	Ala	Glu	Lys	Ala	Ser	1	5	10	15
Thr	Asn	Ser	Glu	Thr	Asn	Arg	Gly	Glu	Ser	Glu	Lys	Lys	Arg	Asn	Leu	20	25	30	
Gly	Glu	Leu	Ser	Arg	Thr	Thr	Ser	Glu	Asp	Asn	Glu	Val	Phe	Gly	Glu	35	40	45	
Ala	Asp	Ala	Asn	Gln	Asn	Asn	Gly	Thr	Ser	Ser	Gln	Asp	Thr	Ala	Val	50	55	60	
Thr	Asp	Ser	Lys	Arg	Thr	Ala	Asp	Pro	Lys	Asn	Ala	Trp	Gln	Asp	Ala	65	70	75	80
His	Pro	Ala	Asp	Pro	Gly	Ser	Arg	Pro	His	Leu	Ile	Arg	Leu	Phe	Ser	85	90	95	
Arg	Asp	Ala	Pro	Gly	Arg	Glu	Asp	Asn	Thr	Phe	Lys	Asp	Arg	Pro	Ser	100	105	110	
Glu	Ser	Asp	Glu	Leu	Gln	Thr	Ile	Gln	Glu	Asp	Ser	Ala	Ala	Thr	Ser	115	120	125	
Glu	Ser	Leu	Asp	Val	Met	Ala	Ser	Gln	Lys	Arg	Pro	Ser	Gln	Arg	His	130	135	140	
Gly	Ser	Lys	Tyr	Leu	Ala	Thr	Ala	Ser	Thr	Met	Asp	His	Ala	Arg	His	145	150	155	160
Gly	Phe	Leu	Pro	Arg	His	Arg	Asp	Thr	Gly	Ile	Leu	Asp	Ser	Ile	Gly	165	170	175	
Arg	Phe	Phe	Gly	Gly	Asp	Arg	Gly	Ala	Pro	Lys	Arg	Gly	Ser	Gly	Lys	180	185	190	
Val	Ser	Ser	Glu	Glu	195														

5 <210> 28
 <211> 834
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 28

ES 2 814 280 T3

```

atgggcttgt tagagtgtg tgcaagatgt ctggtagggg cccctttgc ttcctggtg      60
gccactggat tgtgtttctt tggggtggca ctgttctgtg gctgtggaca tgaagccctc    120
actggcacag aaaagctaata tgagacctat ttctccaaaa actaccaaga ctatgagtat    180
ctcatcaatg tgatccatgc cttccagtat gtcattctat gaactgcctc tttcttcttc    240
ctttatgggg ccctcctgct ggctgagggc ttctacacca cgggcgcagt caggcagatc    300
tttggcgact acaagaccac catctgcggc aagggcctga gcgcaacggt aacagggggc    360
cagaagggga ggggttccag aggccaatat caagctcatt ctttggagcg ggtgtgtcat    420
tgtttgggaa aatggctagg acatcccgac aagtttgtgg gcatcaccta tgccctgacc    480
gttgtgtggc tcctggtggt tgcctgctct gctgtgcctg tgtacattta cttcaacacc    540
tggaaccact gccagtctat tgccttcccc agcaagacct ctgccagtat aggcagtctc    600
tgtgtgatg ccagaatgta tgggtgttct ccatggaatg ctttccctgg caaggtttgt    660
ggctccaacc ttctgtccat ctgcaaaaca gctgagttcc aaatgacctt ccacctgttt    720
attgctgcat ttgtgggggc tgcagctaca ctggtttccc tgcacacctt catgattgct    780
gccacttaca actttgcgct ccttaaactc atgggccgag gcaccaagtt ctga          834

```

<210> 29
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 29

```

Met Gly Leu Leu Glu Cys Cys Ala Arg Cys Leu Val Gly Ala Pro Phe
 1              5              10              15

```

```

Ala Ser Leu Val Ala Thr Gly Leu Cys Phe Phe Gly Val Ala Leu Phe
      20              25              30

```

```

Cys Gly Cys Gly His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu
 35              40              45

```

ES 2 814 280 T3

[illegible]

<210> 30
<211> 729

<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 30

5

```

atgggcttgt tagagtgctg tgcaagatgt ctggtagggg ccccttttgc ttccctggtg      60
gccactggat tgtgtttctt tggggtggca ctgttctgtg gctgtggaca tgaagccctc      120
actggcacag aaaagctaata tgagacctat ttctccaaaa actaccaaga ctatgagtat      180
ctcatcaatg tgatccatgc cttccagtat gtcattctatg gaactgcctc tttcttcttc      240
ctttatgggg ccctcctgct ggctgagggc ttctacacca ccggcgagct caggcagatc      300
tttggcgact acaagaccac catctgcggc aagggcctga gcgcaacgtt tgtgggcac      360
acctatgccc tgaccgttgt gtggctcctg gtgtttgcct gctctgctgt gcctgtgtac      420
atttacttca acacctggac cacctgccag tctattgcct tccccagcaa gacctctgcc      480
agtataggca gtctctgtgc tgatgccaga atgtatggtg ttctcccatg gaatgctttc      540
cctggcaagg tttgtggctc caaccttctg tccatctgca aaacagctga gttccaaatg      600
accttccacc tgtttattgc tgcatttctg ggggctgcag ctacactggt ttccctgctc      660
accttcatga ttgctgccac ttacaacttt gccgtcctta aactcatggg ccgaggcacc      720
aagttctga                                         729

```

<210> 31
<211> 242
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 31

```

Met Gly Leu Leu Glu Cys Cys Ala Arg Cys Leu Val Gly Ala Pro Phe
 1              5              10              15

Ala Ser Leu Val Ala Thr Gly Leu Cys Phe Phe Gly Val Ala Leu Phe
      20              25              30

Cys Gly Cys Gly His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu
      35              40              45

Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile Asn Val
      50              55              60

Ile His Ala Phe Gln Tyr Val Ile Tyr Gly Thr Ala Ser Phe Phe Phe
65              70              75              80

Leu Tyr Gly Ala Leu Leu Leu Ala Glu Gly Phe Tyr Thr Thr Gly Ala
      85              90              95

```

15

ES 2 814 280 T3

Val Arg Gln Ile Phe Gly Asp Tyr Lys Thr Thr Ile Cys Gly Lys Gly
100 105 110

Leu Ser Ala Thr Phe Val Gly Ile Thr Tyr Ala Leu Thr Val Val Trp
115 120 125

Leu Leu Val Phe Ala Cys Ser Ala Val Pro Val Tyr Ile Tyr Phe Asn
130 135 140

Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala
145 150 155 160

Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly Val Leu Pro
165 170 175

Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn Leu Leu Ser Ile
180 185 190

Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met Thr Phe His Leu Phe Ile Ala Ala
195 200 205

Phe Val Gly Ala Ala Ala Thr Leu Val Ser Leu Leu Thr Phe Met Ile
210 215 220

Ala Ala Thr Tyr Asn Phe Ala Val Leu Lys Leu Met Gly Arg Gly Thr
225 230 235 240

Lys Phe

<210> 32
<211> 834
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 32

atgggcttgt tagagtgtg tgcaagatgt ctggtagggg ccccctttgc ttccttggtg 60
gccactggat tgtgtttctt tggggtggca ctgttctgtg gctgtggaca tgaagccctc 120
actggcacag aaaagctaatt tgagacctat ttctccaaaa actaccaaga ctatgagtat 180
ctcatcaatg tgatccatgc cttccagtat gtcattctatg gaactgcctc tttcttcttc 240
ctttatgggg ccctcctgct ggctgagggc ttctacacca ccggcgagc caggcagatc 300
tttggcgact acaagaccac catctgcggc aagggcctga gcgcaacggt aacagggggc 360
cagaagggga ggggttccag aggccaacat caagctcatt ctttggagcg ggtgtgtcat 420
tgtttgggaa aatggctagg acatcccgac aagtttgtgg gcatcaccta tgccctgacc 480
gttgtgtggc tcctggtggt tgccctgctct gctgtgcctg tgtacattta cttcaacacc 540

ES 2 814 280 T3

tggaccacct gccagtctat tgccttcccc agcaagacct ctgccagtat aggcagtctc 600
 tgtgctgatg ccagaatgta tgggtgttctc ccatggaatg ctttccctgg caagggttgt 660
 ggctccaacc ttctgtccat ctgcaaaaca gctgagttcc aaatgacctt ccacctgttt 720
 attgctgcat ttgtgggggc tgcagctaca ctggtttccc tgctcacctt catgattgct 780
 gccacttaca actttgccgt ccttaaactc atgggccgag gcaccaagtt ctga 834

<210> 33
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 33

Met Gly Leu Leu Glu Cys Cys Ala Arg Cys Leu Val Gly Ala Pro Phe
 1 5 10 15
 Ala Ser Leu Val Ala Thr Gly Leu Cys Phe Phe Gly Val Ala Leu Phe
 20 25 30
 Cys Gly Cys Gly His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu
 35 40 45
 Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile Asn Val
 50 55 60
 Ile His Ala Phe Gln Tyr Val Ile Tyr Gly Thr Ala Ser Phe Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Tyr Gly Ala Leu Leu Leu Ala Glu Gly Phe Tyr Thr Thr Gly Ala
 85 90 95
 Val Arg Gln Ile Phe Gly Asp Tyr Lys Thr Thr Ile Cys Gly Lys Gly
 100 105 110
 Leu Ser Ala Thr Val Thr Gly Gly Gln Lys Gly Arg Gly Ser Arg Gly
 115 120 125
 Gln His Gln Ala His Ser Leu Glu Arg Val Cys His Cys Leu Gly Lys
 130 135 140
 Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe Val Gly Ile Thr Tyr Ala Leu Thr
 145 150 155 160
 Val Val Trp Leu Leu Val Phe Ala Cys Ser Ala Val Pro Val Tyr Ile
 165 170 175

ES 2 814 280 T3

Tyr Phe Asn Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys
180 185 190

Thr Ser Ala Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly
195 200 205

Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn Leu
210 215 220

Leu Ser Ile Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met Thr Phe His Leu Phe
225 230 235 240

Ile Ala Ala Phe Val Gly Ala Ala Ala Thr Leu Val Ser Leu Leu Thr
245 250 255

Phe Met Ile Ala Ala Thr Tyr Asn Phe Ala Val Leu Lys Leu Met Gly
260 265 270

Arg Gly Thr Lys Phe
275

<210> 34
<211> 669
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

atggactatg agtatctcat caatgtgatc catgccttcc agtatgtcat ctatggaact	60
gcctctttct tcttccttta tggggccctc ctgctggctg agggcttcta caccaccggc	120
gcagtcaggc agatctttgg cgactacaag accaccatct gcggcaaggg cctgagcgca	180
acggtaacag ggggccagaa ggggaggggt tccagaggcc aacatcaagc tcattctttg	240
gagcgggtgt gtcattgttt gggaaaatgg ctaggacatc cgcacaagtt tgtgggcatc	300
acctatgccc tgaccgttgt gtggctcctg gtgtttgcct gctctgctgt gcctgtgtac	360
atttacttca acacctggac cacctgccag tctattgcct tccccagcaa gacctctgcc	420
agtataggca gtctctgtgc tgatgccaga atgtatgggtg ttctcccatg gaatgctttc	480
cctggcaagg tttgtggctc caaccttctg tccatctgca aaacagctga gttccaaatg	540
accttccacc tgtttattgc tgcatattgtg ggggctgcag ctacactggg ttccctgctc	600
accttcatga ttgctgccac ttacaacttt gccgtcctta aactcatggg ccgaggcacc	660
aagttctga	669

<210> 35
<211> 222
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 814 280 T3

<400> 35

```

Met Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile Asn Val Ile His Ala Phe Gln Tyr Val
1      5      10      15

Ile Tyr Gly Thr Ala Ser Phe Phe Phe Leu Tyr Gly Ala Leu Leu Leu
      20      25      30

Ala Glu Gly Phe Tyr Thr Thr Gly Ala Val Arg Gln Ile Phe Gly Asp
      35      40      45

Tyr Lys Thr Thr Ile Cys Gly Lys Gly Leu Ser Ala Thr Val Thr Gly
      50      55      60

Gly Gln Lys Gly Arg Gly Ser Arg Gly Gln His Gln Ala His Ser Leu
65      70      75      80

Glu Arg Val Cys His Cys Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys
      85      90      95

Phe Val Gly Ile Thr Tyr Ala Leu Thr Val Val Trp Leu Leu Val Phe
      100      105      110

Ala Cys Ser Ala Val Pro Val Tyr Ile Tyr Phe Asn Thr Trp Thr Thr
      115      120      125

Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys Thr Ser Ala Ser Ile Gly Ser
      130      135      140

Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe
145      150      155      160

Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn Leu Leu Ser Ile Cys Lys Thr Ala
      165      170      175

Glu Phe Gln Met Thr Phe His Leu Phe Ile Ala Ala Phe Val Gly Ala
      180      185      190

Ala Ala Thr Leu Val Ser Leu Leu Thr Phe Met Ile Ala Ala Thr Tyr
      195      200      205

Asn Phe Ala Val Leu Lys Leu Met Gly Arg Gly Thr Lys Phe
      210      215      220

```

5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 814 280 T3

<220>

<223> epítipo de célula T CD4

5 <400> 36

Gly Arg Val Arg Val Asn Ser Ala Tyr
1 5

<210> 37

10 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> péptido de PLP

<400> 37

Asn Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys
1 5 10

20

REIVINDICACIONES

1. Un vector de ácido nucleico vírico adenoasociado recombinante (VAAr) con el serotipo VAA8 que comprende:
un polinucleótido que incluye un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína básica de mielina (MBP) de mamífero de longitud completa, una proteína proteolipídica (PLP) o una glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG), unido operativamente a un promotor que es capaz de expresar el segmento de ácido nucleico en una o más células del hígado de un mamífero.
2. El vector de ácido nucleico de VAAr de la reivindicación 1, en el que la MBP, PLP o MOG son de origen humano.
3. El vector de ácido nucleico de VAAr de la reivindicación 1, en el que el segmento de ácido nucleico codifica una proteína básica de mielina (MBP), una proteína proteolipídica (PLP) o una glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG), que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1, de SEQ ID NO: 2 o de SEQ ID NO: 3.
4. El vector de ácido nucleico de VAAr de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el segmento de ácido nucleico comprende además un amplificador, una secuencia reguladora postranscripcional, una señal de poliadenilación o cualquier combinación de los mismos, unidos operativamente al segmento de ácido nucleico que codifica la molécula terapéutica.
5. El vector de ácido nucleico de VAAr de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el promotor es específico de células de mamífero o un promotor específico de tejidos de mamífero.
6. El vector de ácido nucleico de VAAr de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el segmento de ácido nucleico además codifica o expresa adicionalmente un polipéptido, un péptido, una ribozima, un ácido nucleico peptídico, un ARNip, un ARNi, un oligonucleótido antisentido, un polinucleótido antisentido, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o cualquier combinación de los mismos.
7. Una partícula de VAAr que comprende el vector de ácido nucleico de VAAr de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. El vector de ácido nucleico de VAAr de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la partícula de VAAr de la reivindicación 7 para su uso en medicina.
9. El vector de ácido nucleico de VAAr de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la partícula de VAAr de la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento o la mejoría de uno o más de los síntomas de una enfermedad autoinmunitaria en un mamífero, en donde el vector de ácido nucleico de VAAr o la partícula de VAAr se administran de manera sistémica al mamífero, en una cantidad y durante un tiempo suficientes para tratar o mejorar el uno o más síntomas de la enfermedad autoinmunitaria en el mamífero, en donde la enfermedad autoinmunitaria es esclerosis múltiple, esclerosis diseminada o encefalomiелitis diseminada.
10. El vector de ácido nucleico de VAAr o la partícula de VAAr para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el mamífero es un recién nacido, un lactante, un joven o un adulto joven.
11. El vector de ácido nucleico de VAAr o la partícula de VAAr para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde la producción de la molécula terapéutica en el mamífero reduce la inflamación del SNC, inhibe la desmielinización, restablece la tolerancia inmunitaria frente a una o más neuroproteínas, estimula la producción de células T reguladoras específicas de antígenos endógenos o cualquier combinación de estos.
12. El vector de ácido nucleico de VAAr o la partícula de VAAr para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el vector VAAr codifica además un agonista, un antagonista, un factor anti apoptosis, un inhibidor, un receptor, una citocina, una citotoxina, un agente eritropoyético, una glucoproteína, un factor de crecimiento, un receptor del factor de crecimiento, una hormona, un receptor hormonal, un interferón, una interleucina, un receptor de interleucina, un factor de crecimiento nervioso, un péptido neuroactivo, un receptor de péptido neuroactivo, una proteasa, un inhibidor de proteasa, una proteína descarboxilasa, una proteína cinasa, un inhibidor de proteína cinasa, una enzima, una proteína de unión al receptor, una proteína de transporte o un inhibidor de la misma, un receptor de serotonina, o un inhibidor de captación de la misma, una serpina, un receptor de serpina, un supresor tumoral, un quimioterapéutico o cualquier combinación de los mismos.
13. El vector de ácido nucleico de VAAr de la reivindicación 2, en el que el segmento de ácido nucleico codifica una proteína básica de mielina (MBP), una proteína proteolipídica (PLP) o una glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG), que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 17, de SEQ ID NO: 29 o de SEQ ID NO: 15.
14. El vector de ácido nucleico de VAAr de la reivindicación 2, en el que el segmento de ácido nucleico codifica una proteína básica de mielina (MBP), una proteína proteolipídica (PLP) o una glicoproteína oligodendrocítica de mielina

(MOG), que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 29 o la SEQ ID NO: 15.

Utilizado para estudiar la patogénesis de la autoinmunidad, la inflamación del SNC, la desmielinización, el tráfico celular y la inducción de la tolerancia.

Se caracteriza por parálisis, inflamación del SNC y desmielinización, mediadas por células T CD⁺ específicas de mielina, aunque las células CD8⁺ y las células B también tienen un papel en algunos modelos de EAE.

Se utilizan varias neuroproteínas o péptidos para inducir la EAE incluyendo:

Proteína básica de mielina (MBP)
Proteína proteolipídica (PLP)
Glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG)



FIG. 1

Péptido/CFA

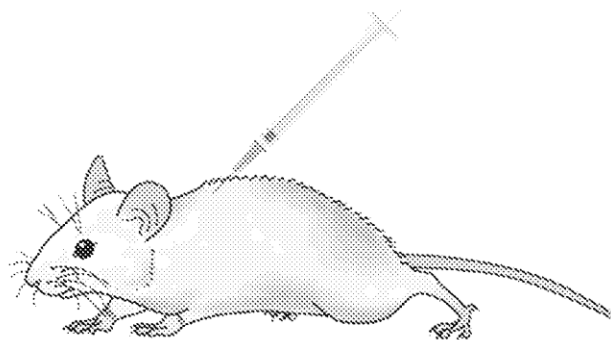


FIG. 2A

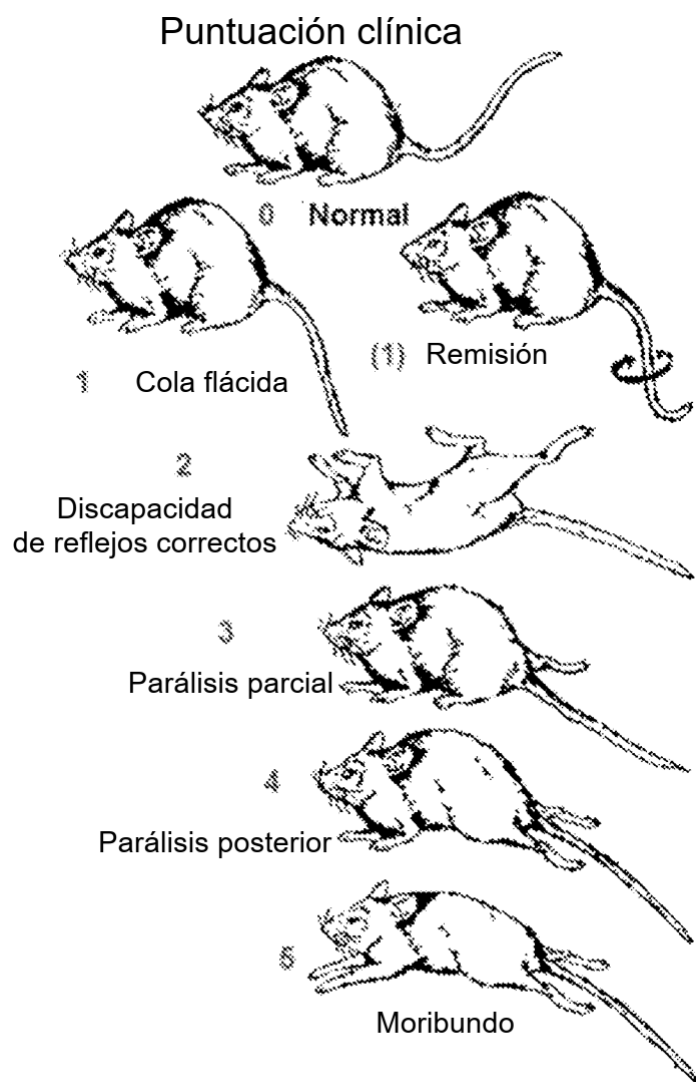


FIG. 2B

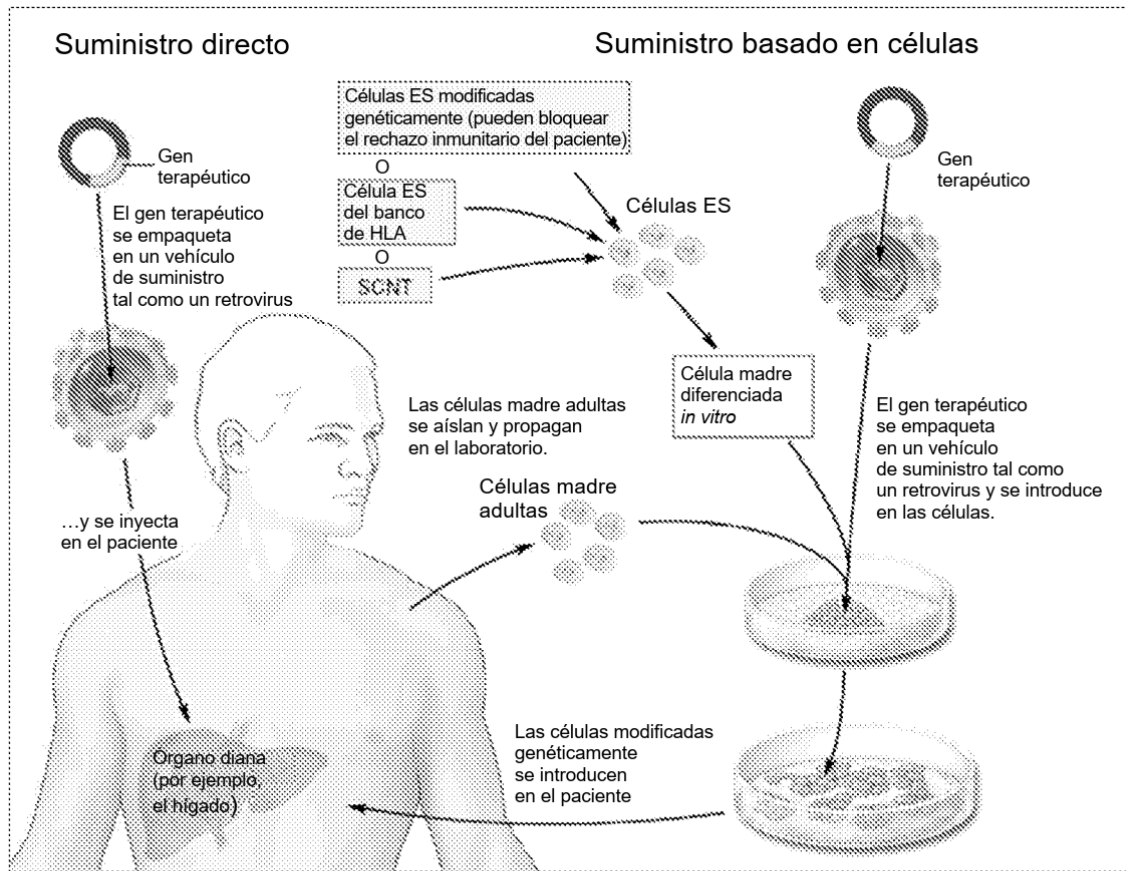


FIG. 3

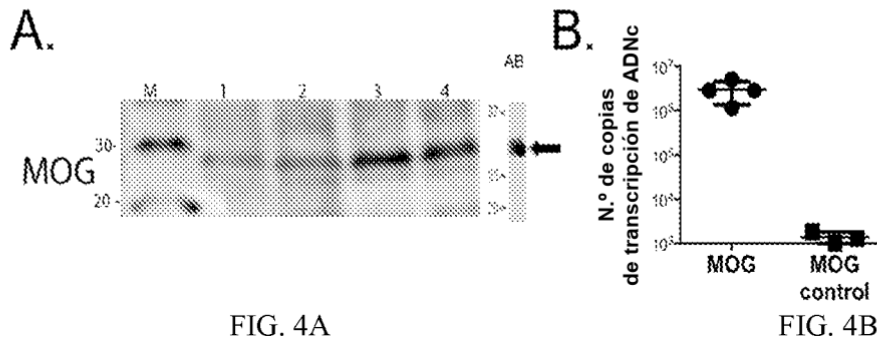


FIG. 4A

FIG. 4B

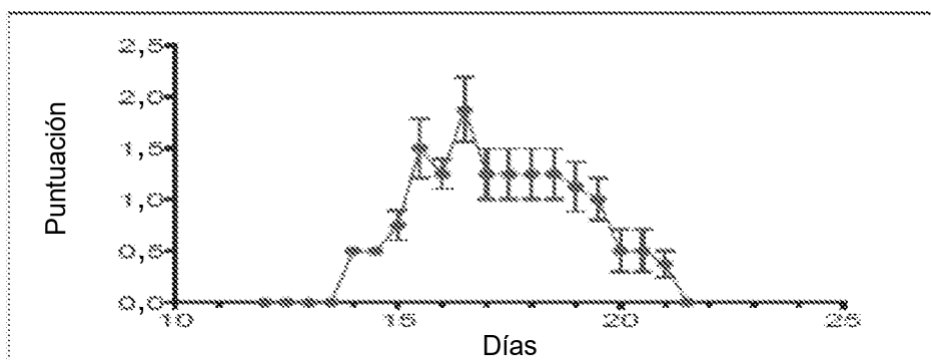


FIG. 5A

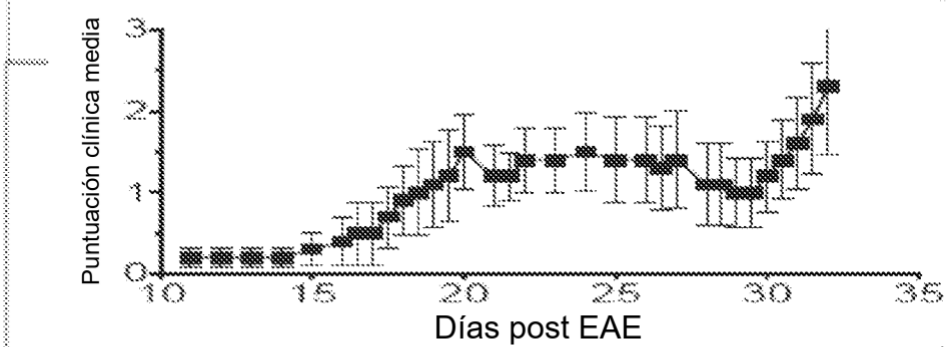


FIG. 5B

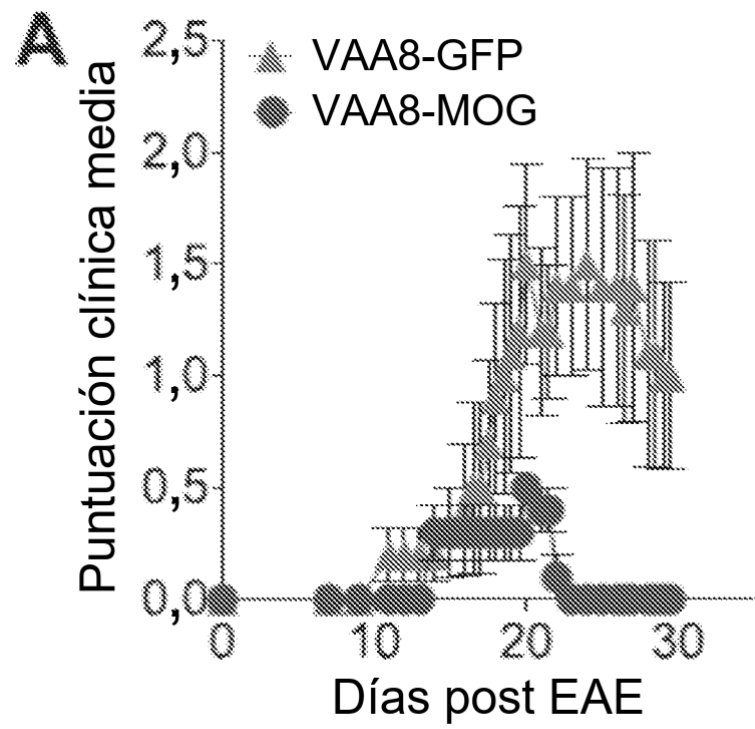


FIG. 6A

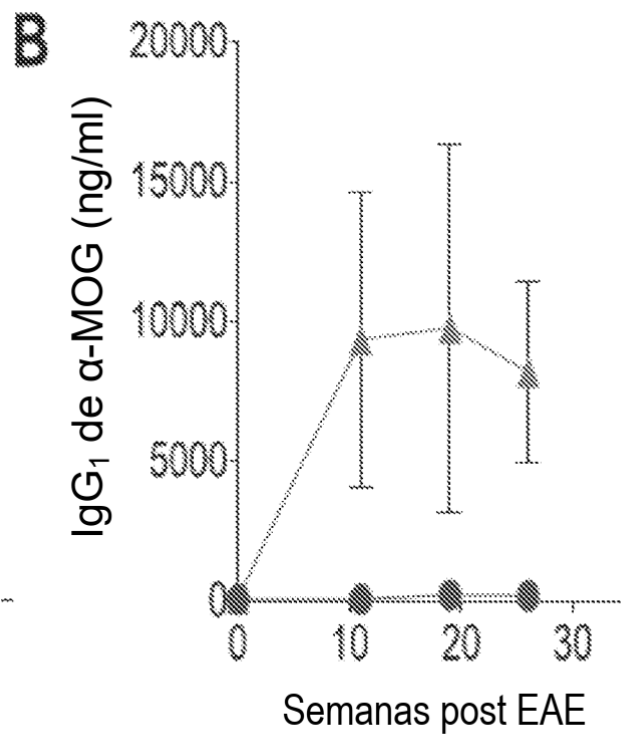


FIG. 6B

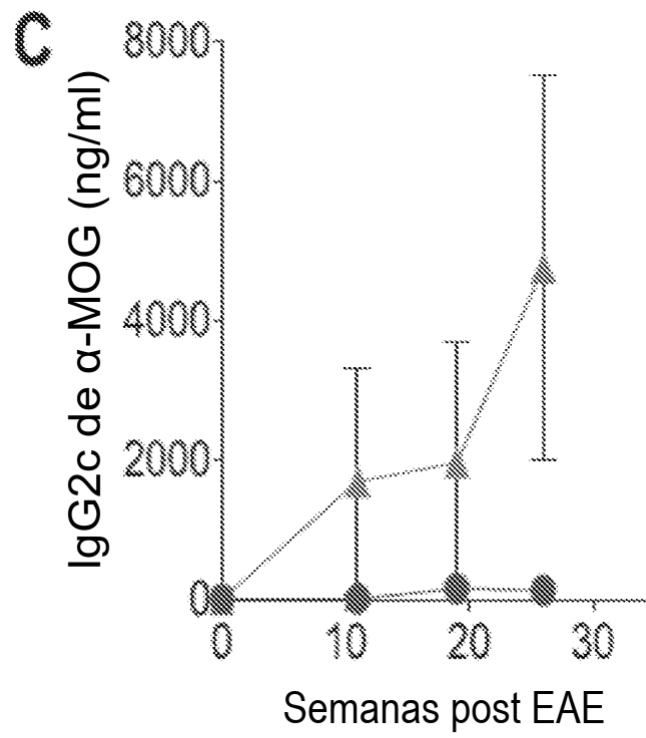


FIG. 6C

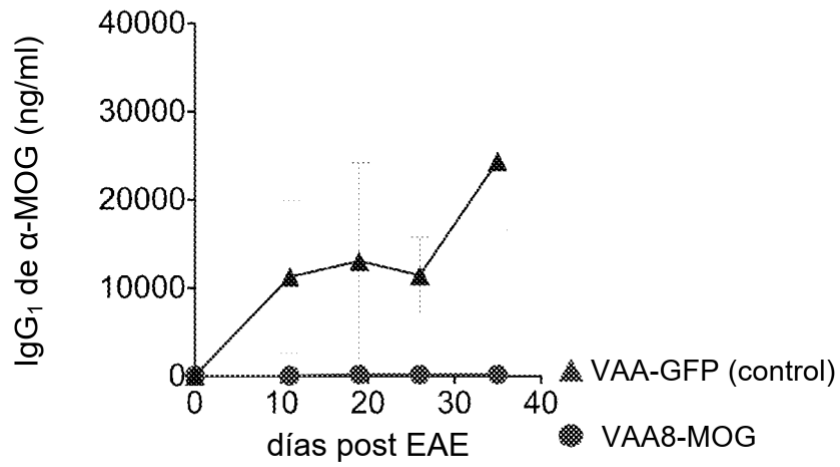


FIG. 7A

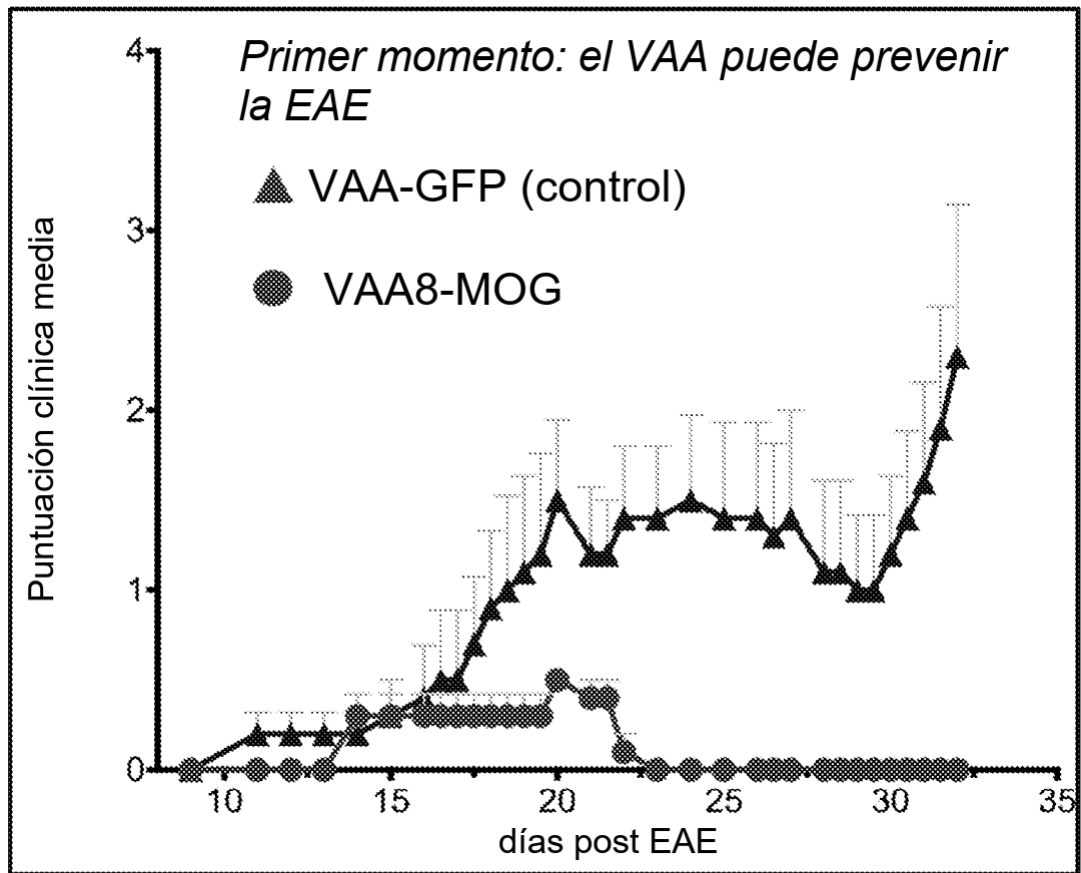


FIG. 7B

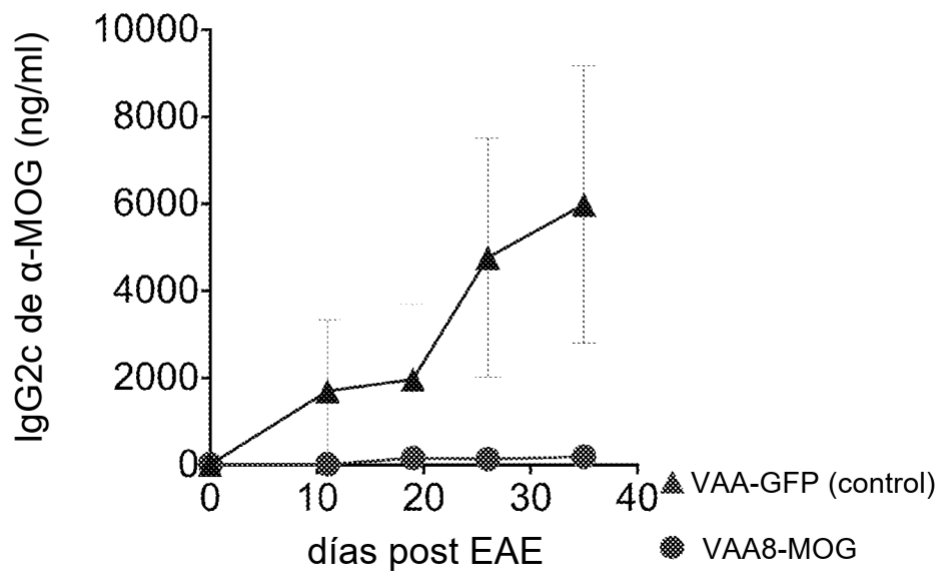


FIG. 7C

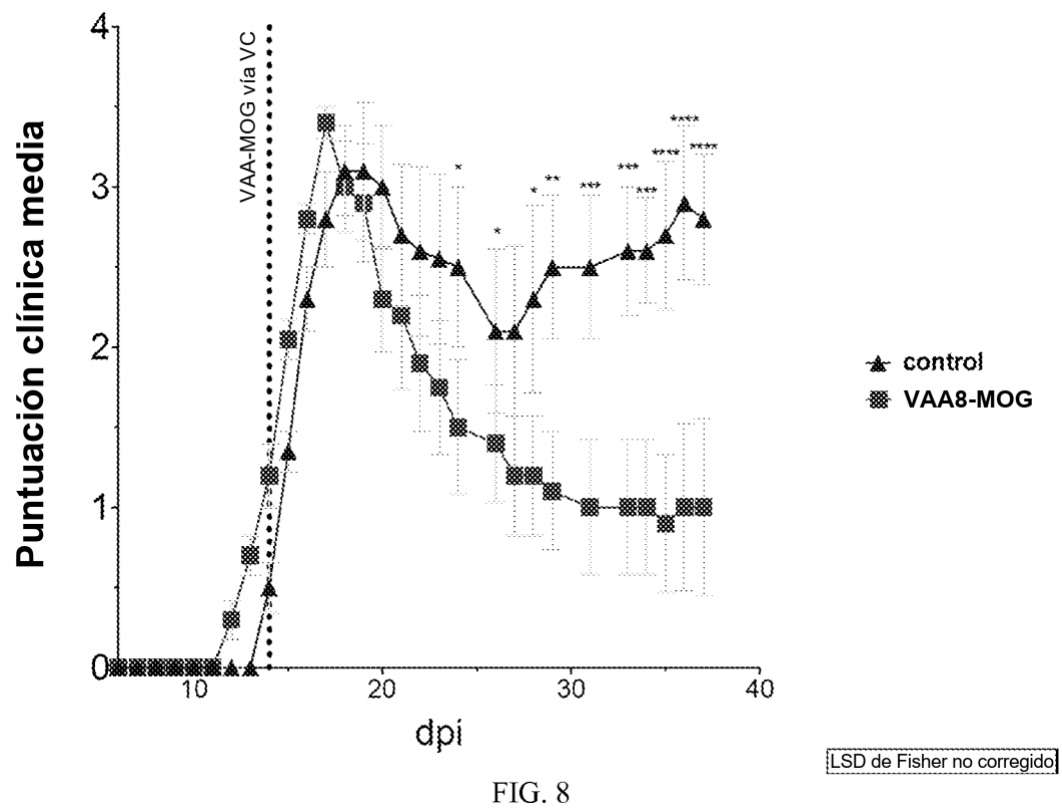


FIG. 8

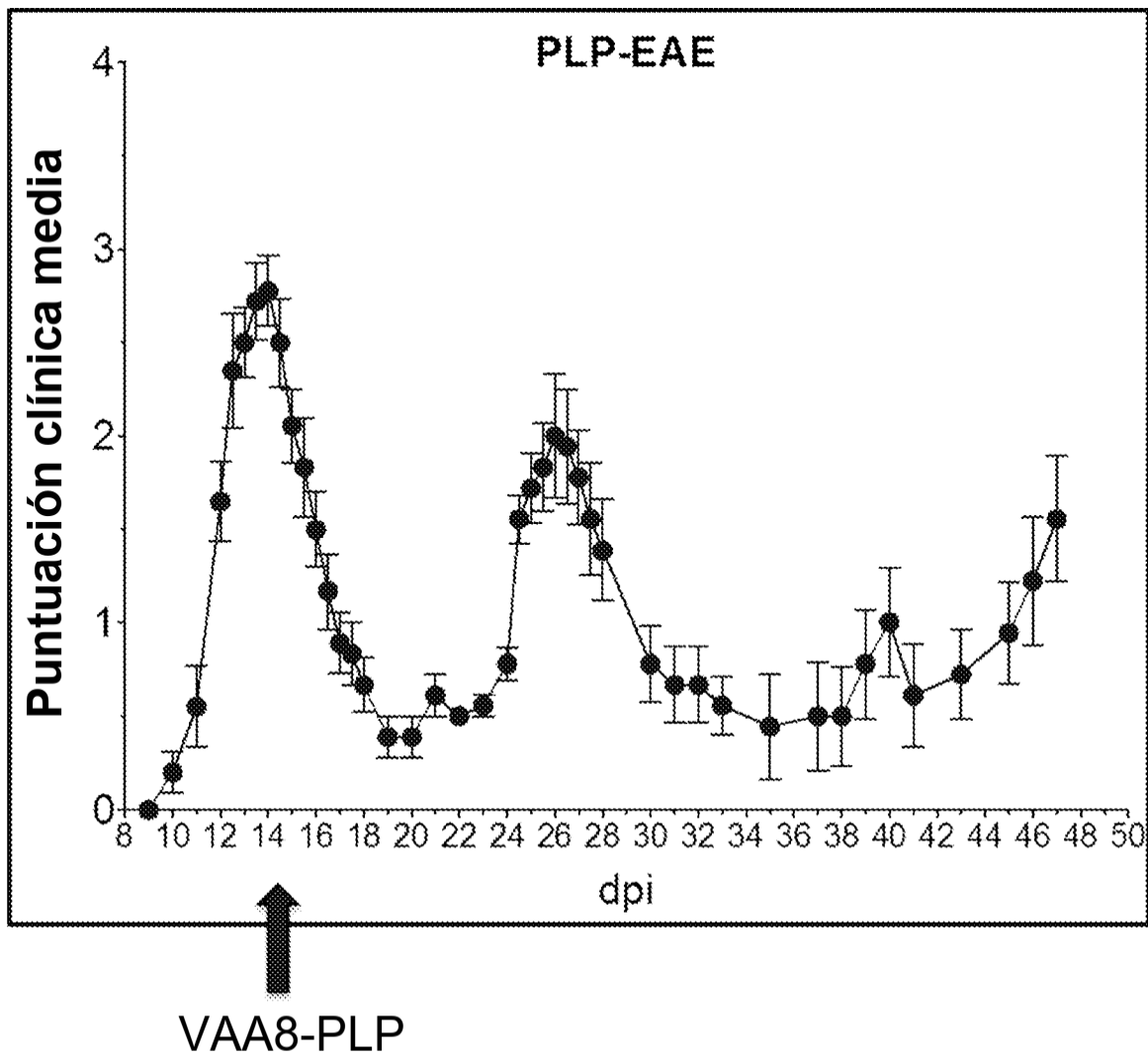


FIG. 9

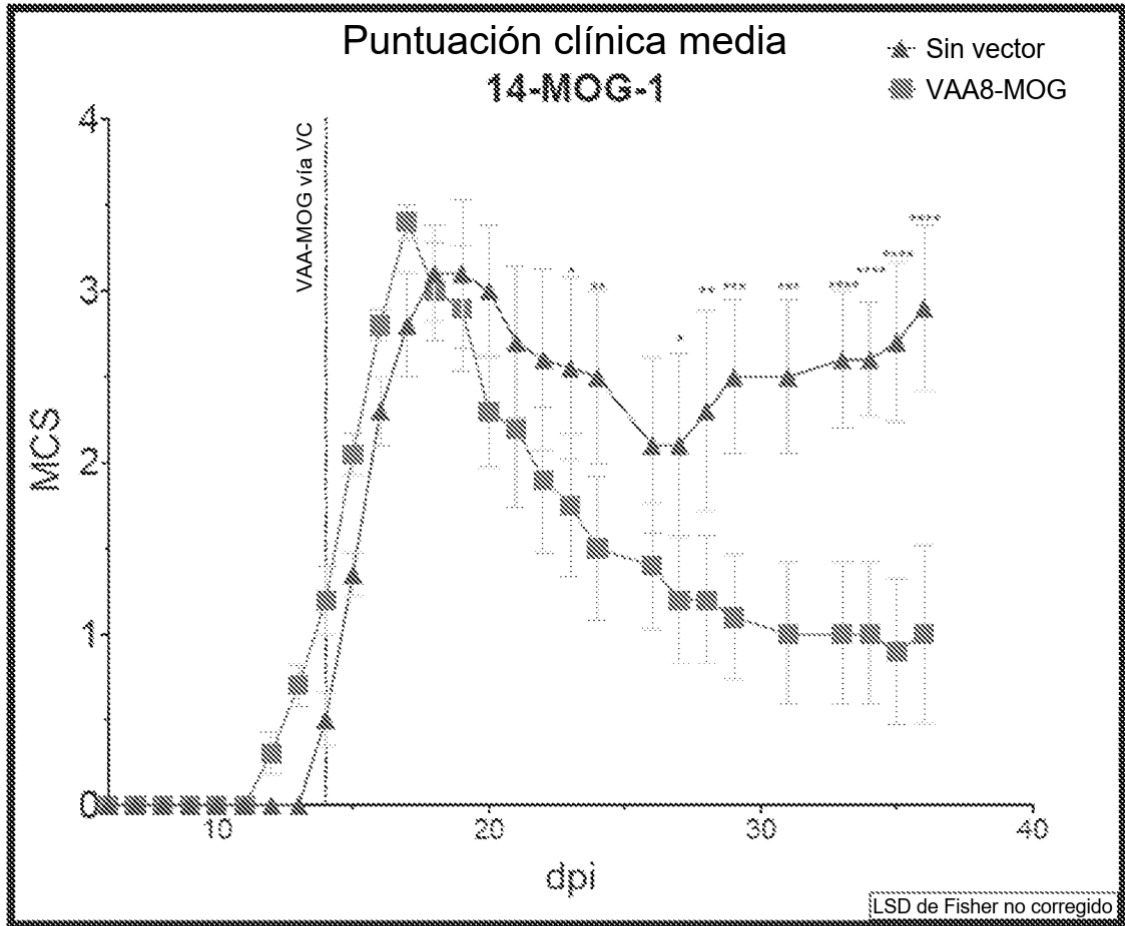


FIG. 10

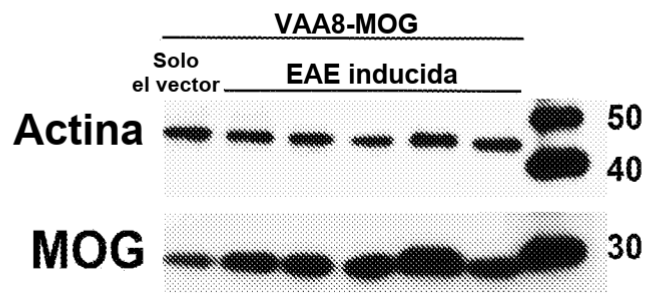
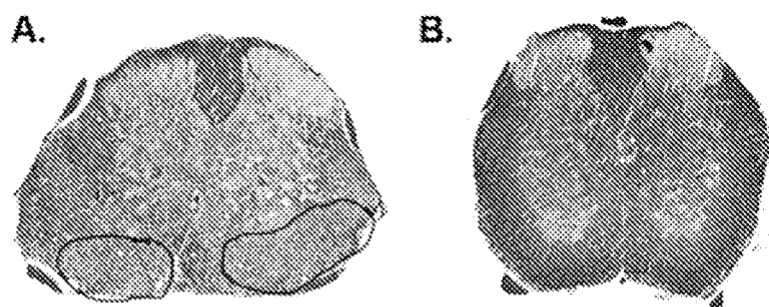
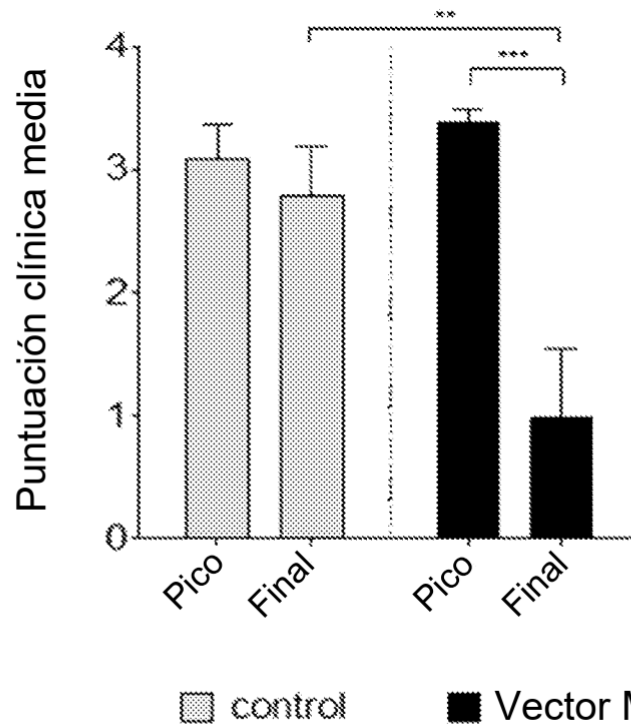
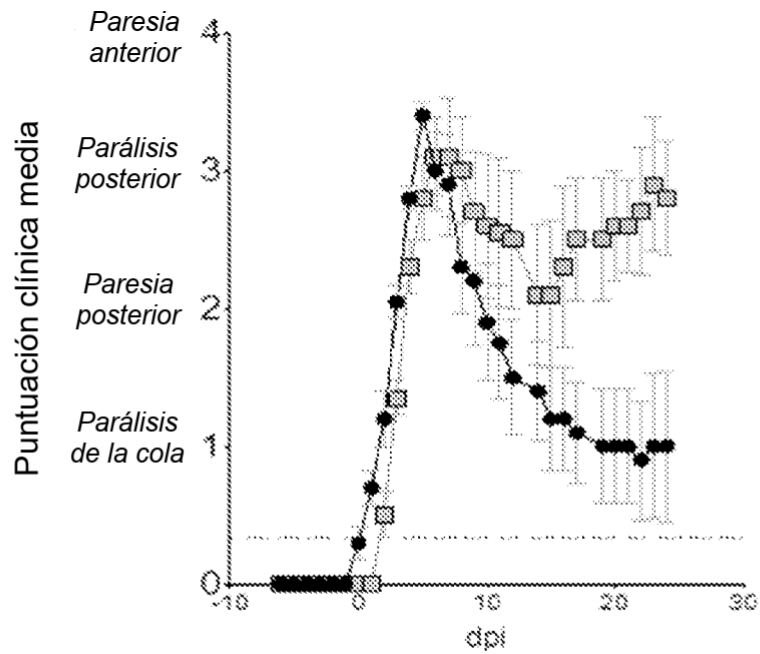


FIG. 11



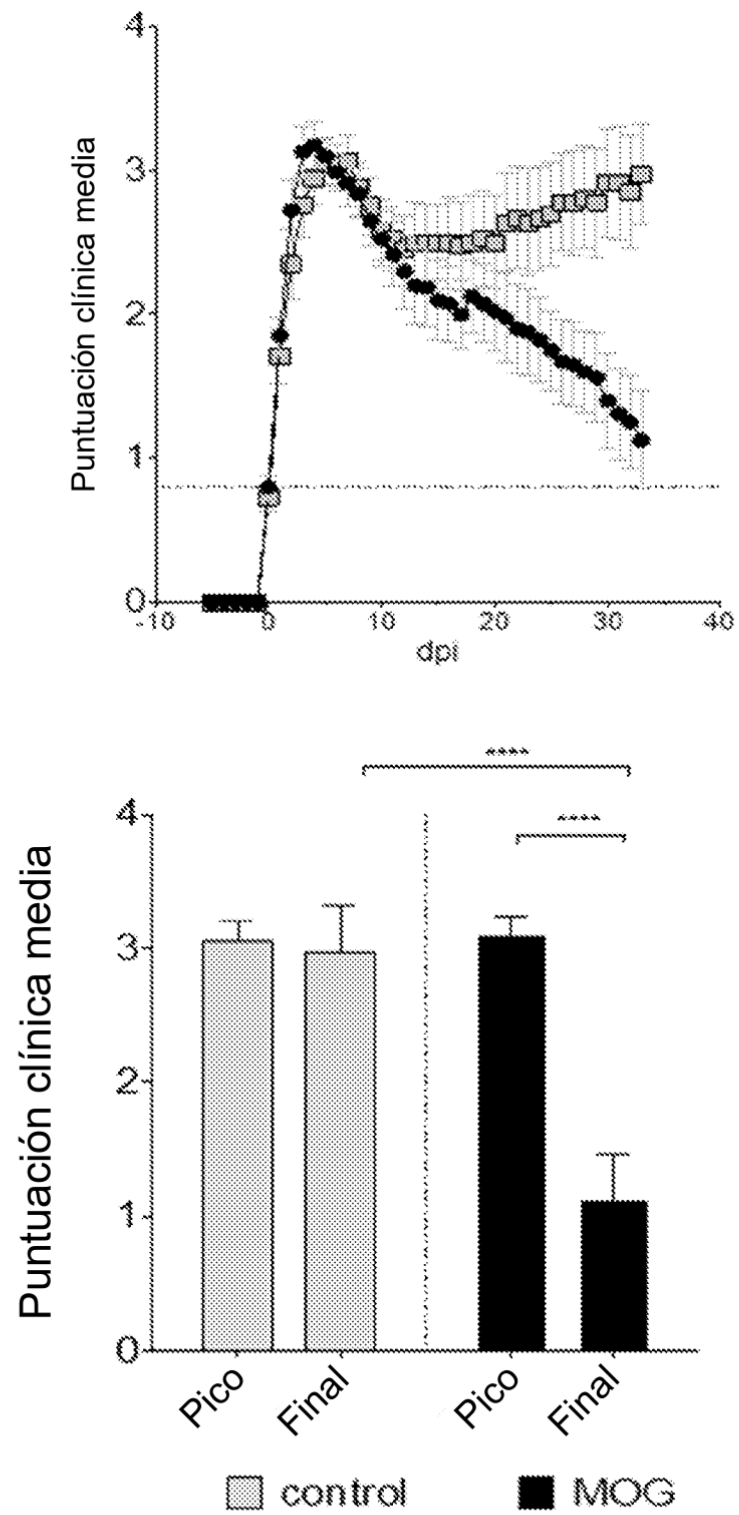
EAE inducida	+	-
Vector de control	+	+
MCS	3,25	0

FIG. 12



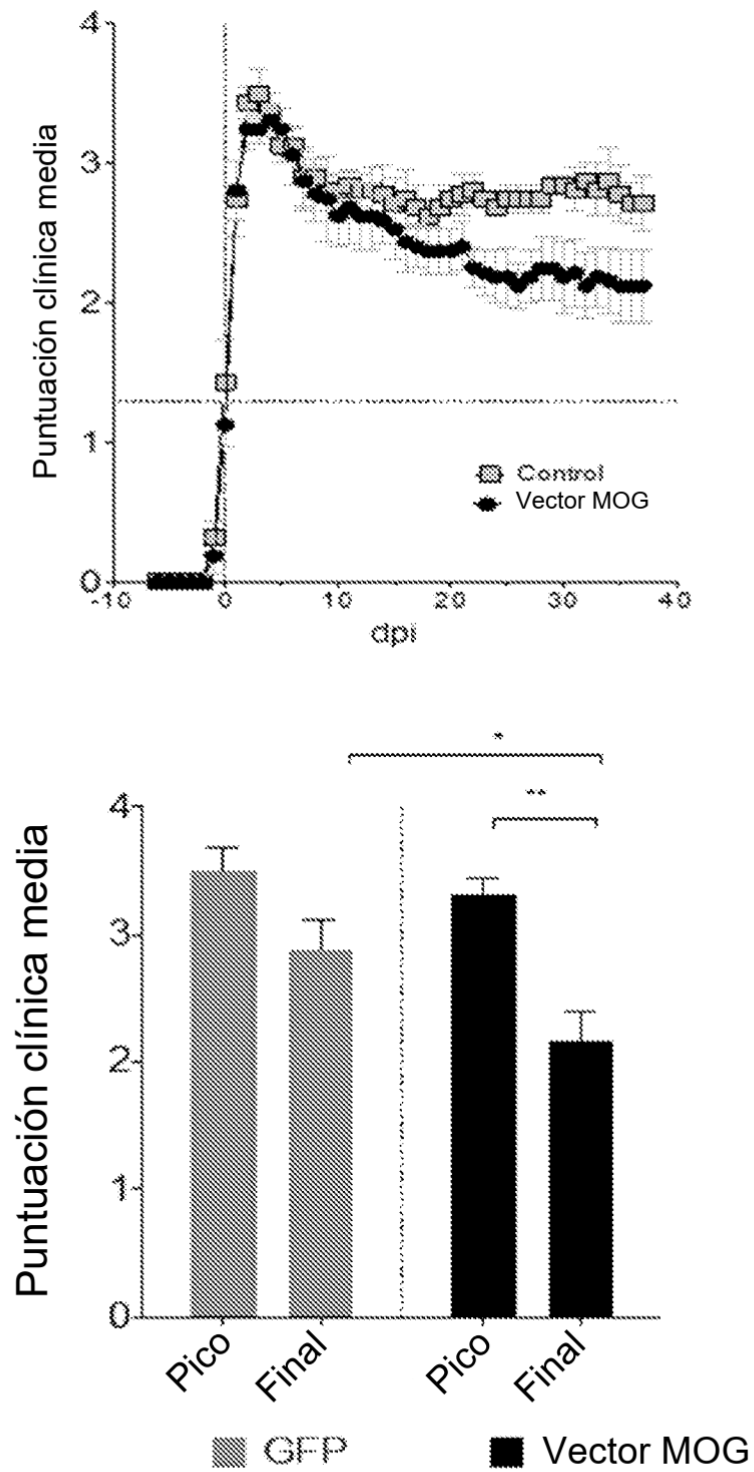
Puntuación Clínica Media en el momento de la inyección 0,3

FIG. 13A



Puntuación Clínica Media en el momento de la inyección 0,8

FIG. 13B



Puntuación Clínica Media en el momento de la inyección 1,3

FIG. 13C

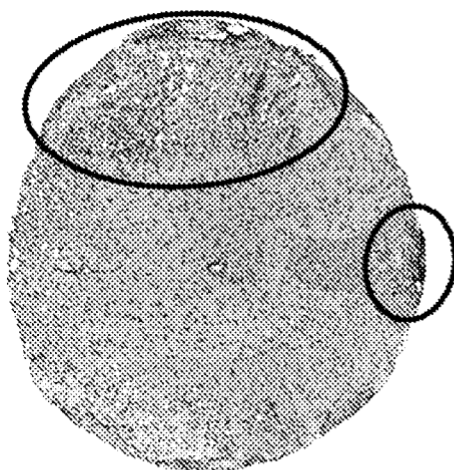


FIG. 14A

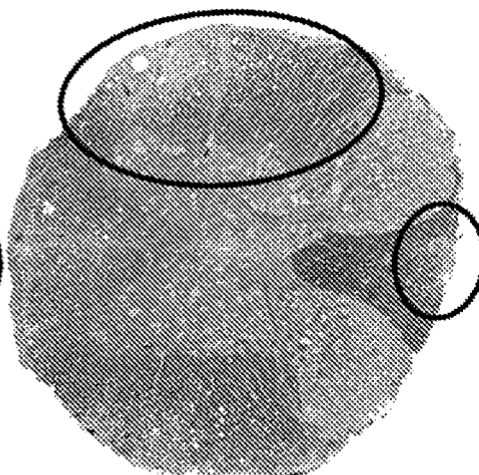


FIG. 14B

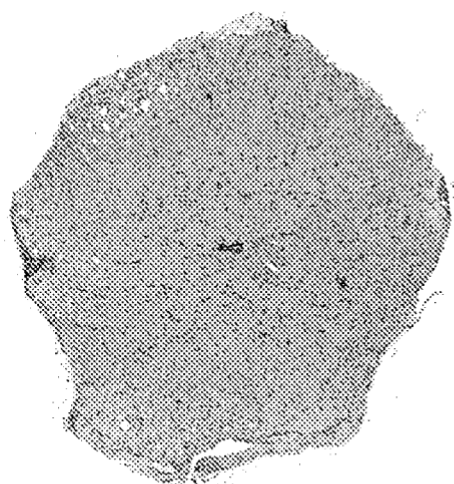


FIG. 15A

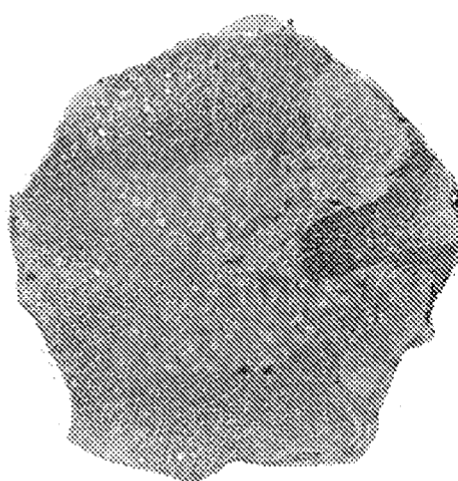


FIG. 15B

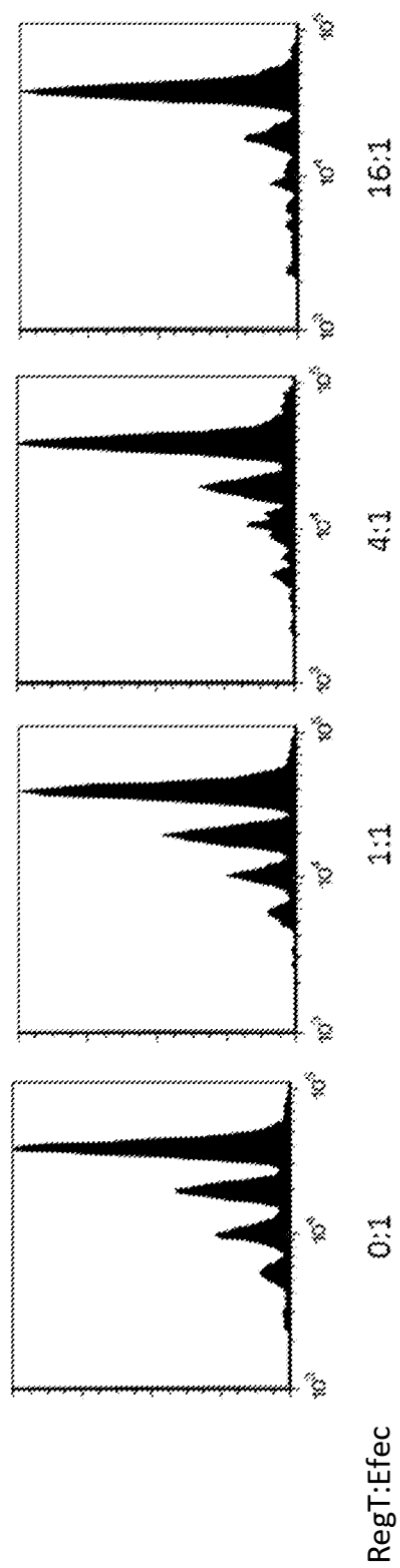


FIG. 16A

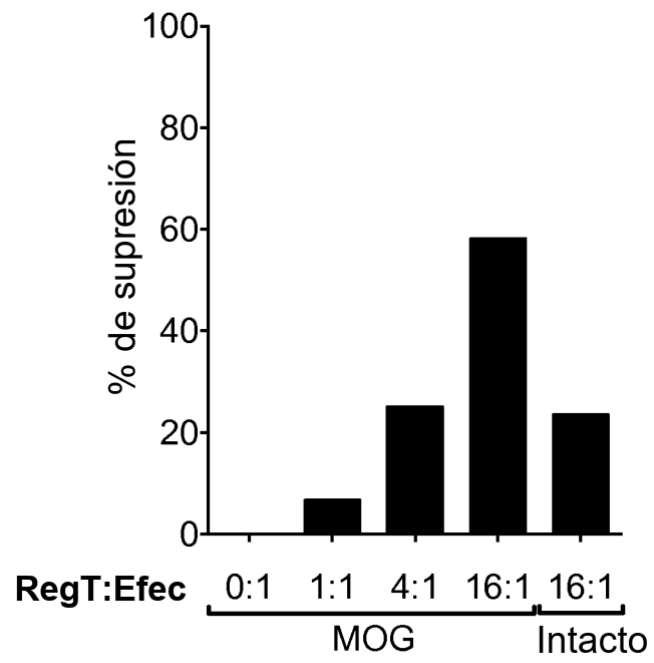


FIG. 16B

Separados sobre CD4+ vivos

FIG. 17A

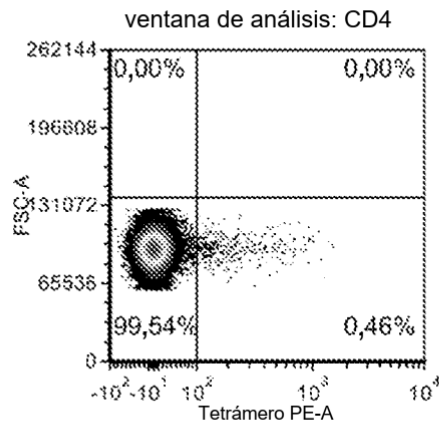
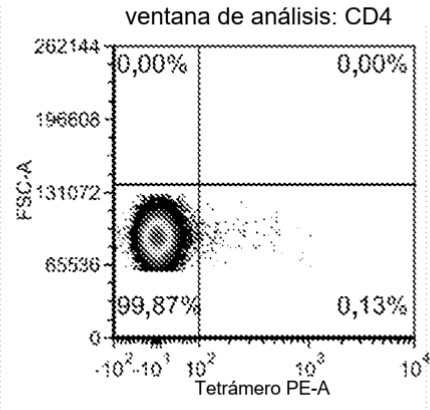


FIG. 17B



Separados sobre CD4+FoxP3+CD25+ (Reg T)

FIG. 17C

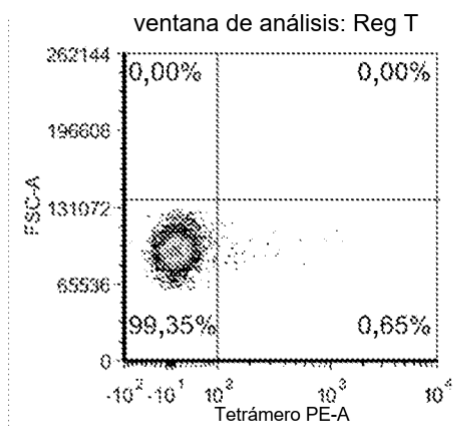
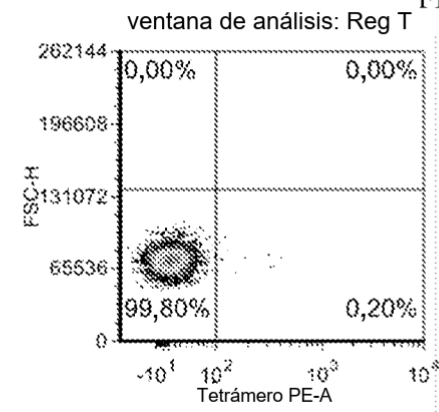


FIG. 17D



Tetrámero MOG

Tetrámero de control

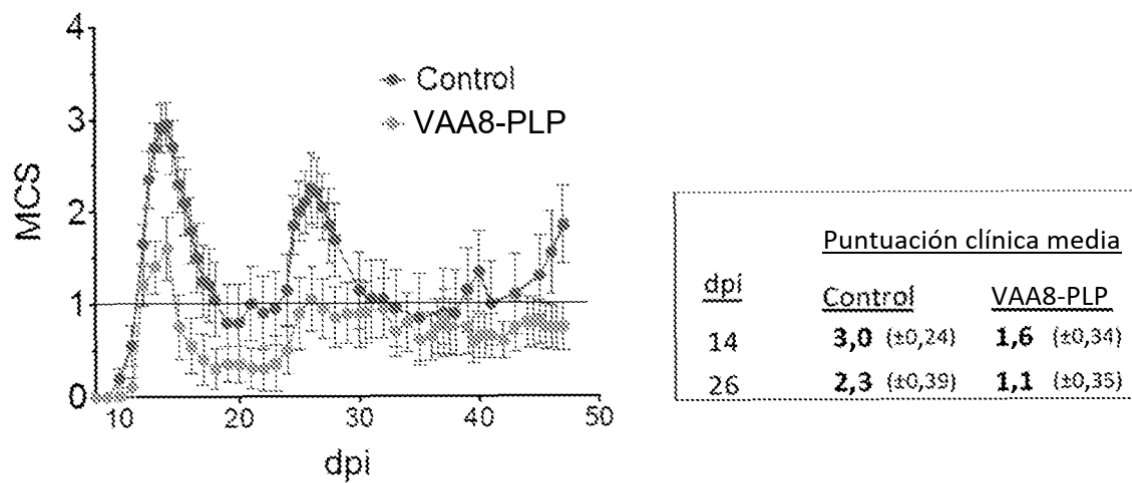


FIG. 18

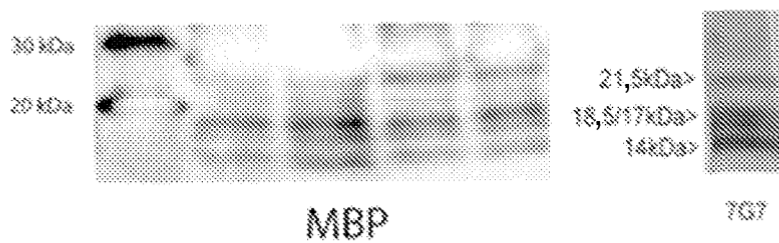


FIG. 19A

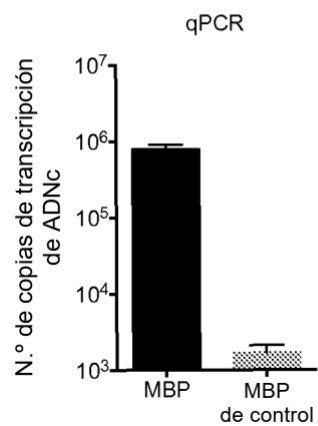


FIG. 19B