

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 814 901**

51 Int. Cl.:

C07K 14/015	(2006.01)	A61P 25/00	(2006.01)
C12N 15/86	(2006.01)		
C12N 15/35	(2006.01)		
C12N 15/63	(2006.01)		
C12N 15/19	(2006.01)		
C12N 15/09	(2006.01)		
C12N 7/00	(2006.01)		
C12N 5/10	(2006.01)		
A61K 48/00	(2006.01)		
A61K 35/76	(2015.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2013 PCT/US2013/062240**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14052789**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2013 E 13841643 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 2900686**

54 Título: **Vectores de AAV dirigidos a oligodendrocitos**

30 Prioridad:

28.09.2012 US 201261707108 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.03.2021

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (100.0%)
308 Bynum Hall, Campus Box 4105
Chapel Hill, NC 27599-4105, US**

72 Inventor/es:

**MCCOWN, THOMAS y
GRAY, STEVEN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 814 901 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vectores de AAV dirigidos a oligodendrocitos

5 Campo de la invención

La invención se refiere a cápsides de AAV quiméricas dirigidas a oligodendrocitos, a vectores de virus que las comprenden y a métodos de uso de los vectores para dirigirse a los oligodendrocitos.

10 Antecedentes de la invención

Hace más de diez años se documentó por primera vez que el virus adenoasociado (AAV) transducía el músculo de manera eficaz (Xiao *et al.*, (1996) J. Virol. 70:8098-8108). El genoma de AAV recombinante (rAAV) compuesto por un casete de expresión extraña y secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV existe en células eucariotas en una forma episomal que es responsable de la expresión transgénica persistente (Schnepp *et al.*, (2003) J. Virol. 77:3495-3504). Los vectores de AAV tienen un buen perfil de seguridad. No se ha asociado ninguna enfermedad humana con la infección por AAV de tipo silvestre y se observa una baja toxicidad en sujetos humanos después de la transducción por rAAV (Manno *et al.*, (2003) Blood 101:2963-2972).

20 En el cerebro, la gran mayoría de los vectores de AAV presentan una preferencia dominante por neuronas con una eficacia muy baja para otros tipos de células, tales como los oligodendrocitos. Los avances recientes en la ingeniería genética de AAV y la evolución dirigida han ampliado la capacidad de desarrollar nuevos serotipos de AAV, incluyendo vectores con tropismo alterado (Gray *et al.*, (2010) Mol. Ther. 18:570-578). Sin embargo, en el sistema nervioso central, todos los vectores y quimeras de AAV, excepto AAV4, presentan un tropismo neuronal dominante. No se han desarrollado vectores de AAV que se dirijan de forma eficaz a los oligodendrocitos.

Sumario de la invención

30 La presente invención se basa, en parte, en el desarrollo de una secuencia de cápside de AAV quimérico que presenta un tropismo dominante para los oligodendrocitos. La cápside quimérica se puede usar para crear vectores de AAV que transducen oligodendrocitos en el sistema nervioso central (SNC) de los sujetos.

35 Por tanto, un aspecto de la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica una cápside de AAV, comprendiendo el ácido nucleico una secuencia codificante de la cápside de AAV que es al menos el 96 % idéntica a: (a) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1; o (b) una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las SEQ ID NO: 2-4, junto con células y partículas víricas que comprenden el ácido nucleico.

40 Otro aspecto de la invención se refiere a una cápside de AAV que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 96 % idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 2-4, junto con partículas de AAV que comprenden un genoma de vector de AAV y la cápside de AAV de la invención.

45 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para producir una partícula de AAV recombinante que comprende una cápside de AAV, comprendiendo el método: proporcionar una célula *in vitro* con un ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, una secuencia de codificación de rep AAV, un genoma de vector de AAV que comprende un ácido nucleico heterólogo y funciones auxiliares para generar una infección de AAV productiva; y permitir el ensamblaje de la partícula de AAV recombinante que comprende la cápside de AAV y que encapsula el genoma del vector de AAV.

50 Un aspecto adicional de la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, la partícula de virus de la reivindicación 5, la cápside de AAV según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, o la partícula de AAV según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para administrar un ácido nucleico de interés a un oligodendrocito *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto el oligodendrocito con la partícula de AAV *in vitro*.

60 Un aspecto adicional de la invención se refiere a dicha partícula de AAV o formulación farmacéutica para su uso en un método de administración de un ácido nucleico de interés a un oligodendrocito en un sujeto mamífero, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de la partícula de AAV o de formulación farmacéutica de la invención a un sujeto mamífero.

65 Un aspecto adicional de la invención se refiere a dicha partícula de AAV o formulación farmacéutica para su uso en un método de administración de un ácido nucleico de interés a un área del SNC que bordea un área comprometida de la barrera hematoencefálica en un sujeto mamífero, comprendiendo el método administrar por vía intravenosa una cantidad eficaz de la partícula de AAV o de formulación farmacéutica de la invención a un sujeto mamífero.

También se desvela un método para tratar un trastorno asociado con la disfunción de oligodendrocitos en un sujeto mamífero que lo necesita, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la partícula de AAV o formulación farmacéutica de la invención a un sujeto mamífero.

5 También se desvela un método para preparar una cápside de AAV que tiene un perfil de tropismo de interés, comprendiendo el método modificar la cápside de AAV de la invención para insertar una secuencia de aminoácidos que proporcione el perfil de tropismo de interés.

10 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la estructura quimérica de los clones de la cápside de AAV BNP61, BNP62 y BNP63.

15 Las Fig. 2A-2C muestran el tropismo de BNP61 por oligodendrocitos en caudado de rata. (A) muestra oligodendrocitos positivos para GFP en el caudado de rata 1 semana después de la infusión de vectores BNP61-CBh-GFP. Téngase en cuenta que no hay neuronas positivas para GFP. (B) muestra un aumento mayor que refleja una clara morfología de oligodendrocitos, y (C) muestra que ninguna de las células positivas para GFP se localiza conjuntamente con el marcador celular de astrocitos, GFAP (rojo).

Las Fig. 3A-3B muestran el tropismo de BNP61 por oligodendrocitos en cultivos de oligodendrocitos primarios.

20 La Fig. 4 muestra la biodistribución de BNP61 (MG001) y cápsides parentales después de la inyección intravenosa en ratones hembra de tipo silvestre, determinado por PCR cuantitativa. El eje Y son copias de GFP por genoma de ratón diploide.

La Fig. 5 muestra que BNP61 atraviesa la barrera hematoencefálica comprometida después de la administración periférica.

25 La Fig. 6 muestra el tropismo de BNP63 por los oligodendrocitos en la corteza piriforme de rata.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se basa, en parte, en el desarrollo de una secuencia de cápside de AAV quimérico que presenta un tropismo para los oligodendrocitos. La cápside quimérica se puede usar para crear vectores de AAV que transducen oligodendrocitos en el SNC de los sujetos.

35 A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. La terminología usada en la descripción de la invención en el presente documento únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares y no debe considerarse limitante de la invención.

40 Las secuencias de nucleótidos se presentan en el presente documento como una sola cadena, en la dirección 5' a 3', de izquierda a derecha, salvo que se indique específicamente otra cosa. Los nucleótidos y aminoácidos se representan en el presente documento de la manera recomendada por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB, o (para los aminoácidos) mediante el código de una letra o el código de tres letras, ambos de acuerdo con 37 CFR §1.822 y el uso establecido.

45 Excepto que se indique lo contrario, se pueden usar métodos estándar conocidos por los expertos en la materia para la producción de polipéptidos recombinantes y sintéticos, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, manipulación de secuencias de ácidos nucleicos, producción de células transformadas, la construcción de construcciones rAAV, proteínas de la cápside modificadas, vectores de empaquetamiento que expresan las secuencias rep y/o cap de AAV, y células de empaquetamiento transfectadas de manera transitoria y estable. Dichas técnicas se conocen por parte de los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, SAMBROOK *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2^a Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989); F. M. AUSUBEL *et al.* CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley y Sons, Inc., Nueva York).

I. Definiciones.

55 La designación de todas las posiciones de los aminoácidos en las subunidades de la cápside de AAV en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas se refiere a la numeración de las subunidades de la cápside de VP1.

60 Como se usa en la descripción de la invención y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/una" y "el" o "la" pretenden incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

65 Como se usa en el presente documento, "y/o" se refiere y abarca todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").

Adicionalmente, el término "aproximadamente", tal como se usa en el presente documento cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad de un compuesto o agente de la presente invención, la dosis, el tiempo, la temperatura, y similares, pretende abarcar variaciones de \pm el 20 %, \pm el 10 %, \pm el 5 %, \pm el 1 %, \pm el 0,5 %, o incluso \pm el 0,1 % de la cantidad especificada.

La expresión "que consiste esencialmente en" tal como se usa en el presente documento en relación con la estructura de un ácido nucleico, proteína o cápside significa que la estructura del ácido nucleico, proteína o de cápside no contiene ningún elemento que no sea el(los) elemento(s) mencionado(s) que alteran significativamente (por ejemplo, más de aproximadamente el 1 %, el 5 % o el 10 %) la función de interés de la estructura del ácido nucleico, proteína o cápside, por ejemplo, perfil de tropismo de la proteína o cápside o una proteína o cápside codificada por el ácido nucleico.

La expresión "virus adenoasociado" (AAV) en el contexto de la presente invención incluye, sin limitación, AAV tipo 1, AAV tipo 2, AAV tipo 3 (incluidos los tipos 3A y 3B), AAV tipo 4, AAV tipo 5, AAV tipo 6, AAV tipo 7, AAV tipo 8, AAV tipo 9, AAV tipo 10, AAV tipo 11, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino y AAV ovino y cualquier otro AAV ahora conocido o descubierto posteriormente. Véase, por ejemplo, BERNARD N. FIELDS *et al.*, VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (4ª ed., Lippincott-Raven Publishers). Se han identificado varios serotipos y clados adicionales de AAV. (véase, por ejemplo, Gao *et al.*, (2004) J. Virol. 78:6381-6388 y Tabla 1), que también están englobados por el término "AAV".

Las secuencias genómicas de varios AAV y parvovirus autónomos, así como las secuencias de las ITR, las proteínas rep y la subunidades de cápside se conocen en la materia. Estas secuencias se pueden encontrar en la bibliografía o en bases de datos públicas como la base de datos GenBank®. Véase, por ejemplo, los números de referencia de GenBank® NC 002077, NC 001401, NC 001729, NC 001863, NC 001829, NC 001862, NC 000883, NC 001701, NC 001510, AF063497, U89790, AF043303, AF028705, AF028704, J02275, J01901, J02275, X01457, AF288061, AH009962, AY028226, AY028223, NC 001358, NC 001540, AF513851, AF513852, AY530579, AY631965, AY631966. Véase también, por ejemplo, Srivistava *et al.*, (1983) J. Virol. 45:555; Chiorini *et al.*, (1998) J. Virol. 71:6823; Chiorini *et al.*, (1999) J. Virol. 73:1309; Bantel-Schaal *et al.*, (1999) J. Virol. 73:939; Xiao *et al.*, (1999) J. Virol. 73:3994; Muramatsu *et al.*, (1996) Virology 221:208; Shade *et al.*, (1986) J. Virol. 58:921; Gao *et al.*, (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 99:11854; las publicaciones de patentes internacionales WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; la patente de Estados Unidos N.º 6.156.303. Véase también la Tabla 1. Una descripción temprana de las secuencias de repetición terminal AAV1, AAV2 y AAV3 se proporciona por Xiao, X., (1996), "Characterization of Adeno-associated virus (AAV) DNA replication and integration," Tesis doctoral, Universidad de Pittsburgh, Pittsburgh, PA.

Tabla 1

	Número de referencia de GenBank		Número de referencia de GenBank		Número de referencia de GenBank
Genomas completos		Hu T88	AY695375	Hu42	AY530605
Virus adenoasociado 1	NC_002077,AF063497	Hu T71	AY695374	Hu67	AY530627
Virus adenoasociado 2	NC_001401	Hu T70	AY695373	Hu40	AY530603
Virus adenoasociado 3	NC_001729	Hu T40	AY695372	Hu41	AY530604
Virus adenoasociado 3B	NC_001863	Hu T32	AY695371	Hu37	AY530600
Virus adenoasociado 4	NC_001829	Hu T17	AY695370	Rh40	AY530559
Virus adenoasociado 5	Y18065, AF085716	Hu LG15	AY695377	Rh2	AY243007
Virus adenoasociado 6	NC_001862	Clado C		Bb1	AY243023

(continuación)

Genomas completos	Número de referencia de GenBank		Número de referencia de GenBank		Número de referencia de GenBank
		Hu T88	AY695375		Hu42 AY530605
AAV aviar ATCC VR-865	AY186198, AY629583, NC_004828	Hu9	AY530629		Bb2 AY243022
AAV aviar cepa DA-1	NC_006263, AY629583	Hu10	AY530576		Rh10 AY243015
AAV bovino	NC_005889, AY388617	Hu11	AY530577		Hu17 AY530582
Clado A		Hu53	AY530615		Hu6 AY530621
AAV1	NC_002077, AF063497	Hu55	AY530617		Rh25 AY530557
AAV6	NC_001862	Hu54	AY530616		Pi2 AY530554
Hu.48	AY530611	Hu7	AY530628		Pi1 AY530553
Hu 43	AY530606	Hu18	AY530583		Pi3 AY530555
Hu 44	AY530607	Hu15	AY530580		Rh57 AY530569
Hu 46	AY530609	Hu16	AY530581		Rh50 AY530563
Clado B		Hu25	AY530591		Rh49 AY530562
Hu. 19	AY530584	Hu60	AY530622		Hu39 AY530601
Hu. 20	AY530586	Ch5	AY243021		Rh58 AY530570
Hu 23	AY530589	Hu3	AY530595		Rh61 AY530572
Hu22	AY530588	Hu1	AY530575		Rh52 AY530565
Hu24	AY530590	Hu4	AY530602		Rh53 AY530566
Hu21	AY530587	Hu2	AY530585		Rh51 AY530564
Hu27	AY530592	Hu61	AY530623		Rh64 AY530574
Hu28	AY530593	Clado D			Rh43 AY530560
Hu 29	AY530594	Rh62	AY530573		AAV8 AF513852
Hu63	AY530624	Rh48	AY530561		Rh8 AY242997
Hu64	AY530625	Rh54	AY530567		Rh1 AY530556
Hu13	AY530578	Rh55	AY530568		Clado F
Hu56	AY530618	Cy2	AY243020		Hu14 (AAV9) AY530579
Hu57	AY530619	AAV7	AF513851		Hu31 AY530596
Hu49	AY530612	Rh35	AY243000		Hu32 AY530597
Hu58	AY530620	Rh37	AY242998		Aislamiento clonal
Hu34	AY530598	Rh36	AY242999		AAV5 Y18065,AF085716
Hu35	AY530599	Cy6	AY243016		AAV 3 NC_001729
AAV2	NC_001401	Cy4	AY243018		AAV3B NC_001863
Hu45	AY530608	Cy3	AY243019		AAV4 NC_001829
Hu47	AY530610	Cy5	AY243017		Rh34 AY243001
Hu51	AY530613	Rh13	AY243013		Rh33 AY243002
Hu52	AY530614	Clado E			Rh32 AY243003
Hu T41	AY695378	Rh38	AY530558		
Hu S17	AY695376	Hu66	AY530626		

Una secuencia codificante de cápside de ácido nucleico de AAV "quimérica" o proteína de cápside de AAV es una que combina porciones de dos o más secuencias de cápside. Un virión o partícula de AAV "quimérico" comprende una proteína de la cápside de AAV quimérica.

5

El término "tropismo" tal como se usa en el presente documento se refiere a la entrada preferencial del virus en

ciertos tipos de células o tejidos y/o interacción preferencial con la superficie celular que facilita la entrada en ciertos tipos de células o tejidos, opcional y preferentemente seguido de expresión (por ejemplo, transcripción y, opcionalmente, traducción) de secuencias transportadas por el genoma vírico en la célula, por ejemplo, para un virus recombinante, la expresión de la(s) secuencia(s) de nucleótidos heterólogas. Los expertos en la técnica apreciarán que la transcripción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga del genoma vírico puede no iniciarse en ausencia de factores de acción trans, por ejemplo, para un promotor inducible o una secuencia de ácido nucleico regulada de otro modo. En el caso de un genoma de rAAV, la expresión génica del genoma vírico puede provenir de un provirus integrado de manera estable y/o de un episoma no integrado, así como cualquier otra forma que pueda tomar el ácido nucleico del virus dentro de la célula.

La expresión "perfil de tropismo" se refiere al patrón de transducción de una o más células diana, tejidos y/u órganos. Los ejemplos representativos de cápsides quiméricas de AAV tienen un perfil de tropismo caracterizado por una transducción eficaz de oligodendrocitos con solo una baja transducción de neuronas, astrocitos y otras células del SNC.

La expresión "específico para oligodendrocitos" tal como se usa en el presente documento se refiere a un vector vírico que, cuando se administra directamente en el SNC, transduce preferentemente oligodendrocitos sobre neuronas, astrocitos y otros tipos de células del SNC. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 80 % de las células transducidas son oligodendrocitos, por ejemplo, al menos aproximadamente el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o más de oligodendrocitos.

La expresión "trastorno asociado con la disfunción de oligodendrocitos" tal como se usa en el presente documento se refiere a una enfermedad, trastorno o lesión en la que los oligodendrocitos se dañan, se pierden o funcionan incorrectamente. El término incluye enfermedades, trastornos y lesiones en las que los oligodendrocitos se ven directamente afectados, así como enfermedades, trastornos y lesiones en las que los oligodendrocitos se vuelven disfuncionales debido al daño a otras células (por ejemplo, lesión de la médula espinal).

La expresión "bordeando un área comprometida de la barrera hematoencefálica" tal como se usa en el presente documento se refiere a células del SNC que están adyacentes a una parte de la barrera hematoencefálica en la que la función de barrera se ha visto comprometida.

Como se usa en el presente documento, "transducción" de una célula por un vector de virus (por ejemplo, un vector de AAV) significa la entrada del vector en la célula y la transferencia de material genético a la célula mediante la incorporación de ácido nucleico en el vector de virus y la posterior transferencia a la célula a través del vector del virus.

A menos que se indique otra cosa, "transducción eficaz" o "tropismo eficaz", o términos similares, puede determinarse por referencia a un control positivo o negativo adecuado (por ejemplo, al menos aproximadamente el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o más de la transducción o tropismo, respectivamente, de un control positivo o al menos alrededor del 110 %, el 120 %, el 150 %, el 200 %, el 300 %, el 500 %, el 1000 % o más de la transducción o tropismo, respectivamente, de un control negativo).

De forma similar, se puede determinar si un virus "no transduce eficazmente" o "no tiene tropismo eficaz" para un tejido diana, o términos similares, por referencia a un control adecuado. En realizaciones particulares, el vector del virus no transduce eficazmente (es decir, no tiene tropismo eficaz) para el hígado, el riñón, las gónadas y/o las células germinales. En realizaciones particulares, la transducción indeseable de tejido(s) (por ejemplo, hígado) es del 20 % o menos, el 10 % o menos, el 5 % o menos, el 1 % o menos, el 0,1 % o menos del nivel de transducción de los tejidos diana deseados (por ejemplo, músculo esquelético, músculo diafragma y/o músculo cardíaco).

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" abarca tanto péptidos como proteínas, a menos que se indique lo contrario.

Un "ácido nucleico" o "secuencia de nucleótidos" es una secuencia de bases de nucleótidos, y puede ser ARN, ADN o secuencias híbridas de ADN-ARN (incluidos los nucleótidos de origen natural y no natural), pero preferentemente son secuencias de ADN monocatenarias o bicatenarias.

Como se usa en el presente documento, un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos "aislado" (por ejemplo, un "ADN aislado" o un "ARN aislado") significa un ácido nucleico o secuencia de nucleótidos separada o sustancialmente libre de al menos algunos de los otros componentes del organismo o virus de origen natural, por ejemplo, los componentes estructurales celulares o víricos u otros polipéptidos o ácidos nucleicos que se encuentran comúnmente asociados con el ácido nucleico o la secuencia de nucleótidos.

Del mismo modo, un polipéptido "aislado" significa un polipéptido que está separado o sustancialmente libre de al menos algunos de los otros componentes del organismo o virus de origen natural, por ejemplo, los componentes estructurales celulares o víricos u otros polipéptidos o ácidos nucleicos que se encuentran comúnmente asociados con el polipéptido.

Por los términos "tratar", "que trata", o "tratamiento de" (o términos gramaticalmente equivalentes) significa que la gravedad de la afección del sujeto se reduce o al menos se mejora o mejora parcialmente y/o que se alivia de alguna manera, se logra la mitigación o disminución en al menos un síntoma clínico y/o hay un retraso en la progresión de la afección y/o prevención o retraso del inicio de una enfermedad o trastorno. El término "tratar", "trata", "que trata", o "tratamiento de" y similares también incluyen el tratamiento profiláctico del sujeto (por ejemplo, para prevenir la aparición de una infección o cáncer o un trastorno). Como se usa en el presente documento, el término "prevenir", "previene", o "prevención" (y sus equivalentes gramaticales) no pretenden implicar la abolición completa de la enfermedad y abarca cualquier tipo de tratamiento profiláctico que reduzca la incidencia de la afección, retrase la aparición y/o la progresión de la enfermedad y/o reduzca los síntomas asociados con la enfermedad. Por tanto, a menos que el contexto lo indique de otro modo, el término "tratar", "que trata", o "tratamiento de" (o las expresiones gramaticalmente equivalentes) se refieren tanto a regímenes de tratamiento tanto profilácticos como terapéuticos.

Una cantidad "eficaz" o "terapéuticamente eficaz" tal como se usa en el presente documento es una cantidad que es suficiente para proporcionar alguna mejora o beneficio para el sujeto. Como alternativa, se establece que, una cantidad "eficaz" o "terapéuticamente eficaz" es una cantidad que proporcionará algún alivio, mitigación o disminución de al menos un síntoma clínico en el sujeto. Los expertos en la materia apreciarán que los efectos terapéuticos no necesitan ser completos o curativos, siempre y cuando se brinde algún beneficio al sujeto.

Una "secuencia de nucleótidos heteróloga" o "ácido nucleico heterólogo" es una secuencia que no se encuentra naturalmente en el virus. Generalmente, el ácido nucleico o secuencia de nucleótidos heteróloga comprende un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido y/o un ARN no traducido.

Un "polipéptido terapéutico" puede ser un polipéptido que puede aliviar o reducir los síntomas que resultan de una ausencia o defecto en una proteína en una célula o sujeto. Asimismo, un "polipéptido terapéutico" puede ser un polipéptido que de otro modo confiere un beneficio a un sujeto, por ejemplo, efectos anticancerígenos o mejora de la supervivencia al trasplante.

Como se usa en el presente documento, el término "vector", "vector de virus", "vector de administración" (y términos similares) generalmente se refiere a una partícula de virus que funciona como un vehículo de administración de ácido nucleico y que comprende el ácido nucleico vírico (es decir, el genoma del vector) empaquetado dentro del virión. Los vectores de virus según la presente invención comprenden una cápside quimérica de AAV según la invención y pueden empaquetar un genoma de AAV o rAAV o cualquier otro ácido nucleico, incluidos los ácidos nucleicos víricos. De manera alternativa, en algunos contextos, el término "vector", "vector de virus", "vector de administración" (y términos similares) puede usarse para referirse al genoma del vector (por ejemplo, ADNv) en ausencia del virión y/o a una cápside vírica que actúa como un transportador para administrar moléculas atadas a la cápside o empaquetadas dentro de la cápside.

Un "genoma de vector de AAV recombinante" o "genoma de rAAV" es un genoma de AAV (es decir, ADNv) que comprende al menos una repetición terminal invertida (por ejemplo, una, dos o tres repeticiones terminales invertidas) y una o más secuencias de nucleótidos heterólogas. Los vectores rAAV generalmente retienen las 145 repeticiones de terminales base (TR(s)) en *cis* para generar virus; sin embargo, las TR de AAV modificadas y las TR que no son de AAV que incluyen secuencias parcial o completamente sintéticas también pueden servir para este propósito. Todas las demás secuencias víricas son prescindibles y se pueden administrar en *trans* (Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158:97). El vector rAAV comprende opcionalmente dos TR (por ejemplo, TR de AAV), que generalmente estarán en los extremos 5' y 3' de la(s) secuencia(s) de nucleótidos heteróloga(s), pero no es necesario que sea contiguo a la(s) misma(s). Las TR pueden ser iguales o diferentes entre sí. El genoma del vector también puede contener una sola ITR en su extremo 3' o 5'.

El término "repetición terminal" o "TR" incluye cualquier repetición terminal vírica o secuencia sintética que forma una estructura de horquilla y funciona como una repetición terminal invertida (es decir, media las funciones deseadas tales como la replicación, el empaquetamiento vírico, la integración y/o el rescate de provirus, y similares). La TR puede ser una TR de AAV o una TR no de AAV. Por ejemplo, una secuencia de TR no de AAV como las de otros parvovirus (por ejemplo, parvovirus canino (CPV), parvovirus de ratón (MVM), parvovirus humano B-19) o la horquilla SV40 que sirve como origen de la replicación de SV40 se puede utilizar como TR, que se puede modificar aún más mediante truncamiento, sustitución, delección, inserción y/o adición. Además, la TR puede ser parcial o completamente sintética, tal como la "secuencia de doble D" tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.478.745 de Samulski *et al.*

Una "repetición terminal de AAV" o "TR de AAV" puede ser de cualquier AAV, incluidos, entre otros, los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 o cualquier otro AAV ahora conocido o descubierto posteriormente (véase, por ejemplo, la Tabla 1). Una repetición terminal de AAV no necesita tener la secuencia de repetición terminal natural (por ejemplo, una secuencia de TR de AAV natural puede ser alterada por inserción, delección, truncamiento y/o mutaciones sin sentido), siempre que la repetición terminal medie las funciones deseadas, por ejemplo, replicación, el empaquetamiento vírico, la integración y/o el rescate de provirus, y similares.

Los términos "partícula de rAAV" y "virión de rAAV" se utilizan en el presente documento de forma intercambiable. Una "partícula de rAAV" o "virión de rAAV" comprende un genoma de vector de rAAV empaquetado dentro de una cápside de AAV.

5 La estructura de la cápside AAV se describe con más detalle en BERNARD N. FIELDS *et al.*, VIROLOGY, volumen 2, capítulos 69 y 70 (4^a ed., Lippincott-Raven Publishers).

10 Al "conservar sustancialmente" una propiedad, significa que al menos alrededor del 75 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de la propiedad (por ejemplo, actividad u otra característica medible) se conserva.

II. Cápsides quiméricas de AAV dirigidas a oligodendrocitos.

15 Los inventores han identificado estructuras de cápside de AAV quiméricas capaces de transducir preferentemente oligodendrocitos sobre neuronas y otras células del SNC. Por tanto, un aspecto de la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica una cápside de AAV, los ácidos nucleicos que comprenden, que consisten esencialmente en, o que consisten en una secuencia codificante de la cápside de AAV que es al menos el 96 % idéntica a: (a) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1; o (b) una secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO:2; y virus que comprenden las cápsides quiméricas de AAV. En algunas realizaciones, la secuencia codificante de la cápside de AAV es al menos del 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de (a) o (b). En otra realización, la secuencia codificante de la cápside de AAV comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la secuencia de nucleótidos de (a) o (b).

Secuencia de nucleótidos de la cápside de AAV de BNP61 (SEQ ID NO: 1)

25

```

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca ctctctctga 50
aggaataaga cagtggtgga agctcaaacc tggcccacca ccaccaaacg 100
ccgcagagcg gcataaggac gacagcaggg gtcttgtgct tcctgggtac 150
aagtacctcg gacccttcaa cggactcgac aagggagagc cgggtcaacga 200
ggcagacgcc gcggccctcg agcacgacaa agcctacgac cggcagctcg 250
acagcggaga caaccggtac ctcaagtaca accacgccga cgcggagttt 300
caggagcgcc ttaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggagagc 350
agtctccag gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggc ctggttgagg 400
aagcggctaa gacggctcct ggaagaaga ggcctgtaga gcagtctcct 450
caggaaccgg actcctcctc gggcatcggc aagacaggcc agcagcccgc 500
taaaaagaga ctcaatttct gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag 550
accctcaacc aatcggagaa cctcccgcag cccctcagg tgtgggatct 600
cttacaatgg cttcaggtgg tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg 650
    
```

ES 2 814 901 T3

```

tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattcccaat 700
ggctggggga cagagtcac accaccagca cccgaacctg ggcctgccc 750
acctacaaca atcacctcta caagcaaate tccaacggga catcgggagg 800
agccaccaac gacaacacct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt 850
ttgactttaa cagattccac tgccactttt caccacgtga ctggcagcga 900
ctcatcaaca acaactgggg attccggccc aagagactca gcttcaagct 950
cttcaacatc caggtcaagg aggtcacgca gaatgaaggc accaagacca 1000
tcgccaataa ccttaccagc acgggtccagg tcttcacgga ctcggagtac 1050
cagctgccgt acgttctcgg ctctgcccac cagggctgcc tgccctccgtt 1100
cccggcggac gtgttcatga ttccccagta cggctaccta aactcaaca 1150
acggtagtca ggccgtggga cgctcctcct tctactgcct ggaatacttt 1200
ccttcgcaga tgctgagaac cggcaacaac ttccagttta cttacacctt 1250
cgaggacgtg cttttccaca gcagctacgc ccacagccag agcttggacc 1300
ggctgatgaa tcctctgatt gaccagtacc tgtactactt gtctcggact 1350
caaacaacag gaggcacggc aaatacgcag actctgggct tcagccaagg 1400
tgggcctaata acaatggcca atcaggcaaa gaactggctg ccaggacctt 1450
gttaccgcca acaacgcgct tcaacgacaa ccgggcaaaa caacaatagc 1500
aactttgcct ggactgctgg gaccaaatac catctgaatg gaagaaattc 1550
attggctaata cctggcatcg ctatggcaac acacaaagac gacaaggagc 1600
gtttttttcc cagtaacggg atcctgattt ttggcaaaaa aaatgctgcc 1650
agagacaatg cggattacag cgatgtcatg ctcaccagcg aggaagaaat 1700
caaaaccact aaccctgtgg ctacagagga atacggtatc gtggcagata 1750
acttcagca gcaaaacacg gctcctcaaa ttggaactgt caacagccag 1800
ggggccttac ccggtatggt ttggcagaac cgggacgtgt acctgcaggg 1850
tcccattctgg gccaagattc ctcacacgga cggcaacttc caccgctctc 1900
cgctgatggg cggttttggc ctgaaacatc ctccgctca gatcctgatc 1950
aagaacacgc ctgtacctgc ggatcctccg accaccttca accagtcaaa 2000
gctgaactct ttcattcacgc aatacagcac cggacaggtc agcgtggaaa 2050
ttgaatggga gctgcagaag gaaaacagca agcgtggaa ccccgagatc 2100
cagtacacct ccaactacta caaatctaca agtgtggact ttgctgtaa 2150
tacagaaggc gtgtactctg aaccccacc cattggcacc cgttacctca 2200
ccgctcccct gtaa

```

Secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV de BNP61 (SEQ ID NO: 2)

```

MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLPKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPY 50
KYLGFNGLD KGEPVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADAEF 100
QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKKRPVEQSP 150
QEPDSSSGIG KTGQQPAKKR LNFGQTGDTE SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS 200
LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRVI TTSTRTWALP 250
TYNNHLYKQI SNGTSGGATN DNTYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 300
LINNNWGFRP KRLSFKLFNI QVKEVTQNEG TKTIANNLTS TVQVETDSEY 350
QLPYVLGSAH QGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNNGSQAVG RSSFYCLEYF 400
PSQMLRTGNN FQFTYTFEDV PFHSSYAHSQ SLDRMLNPLI DQYLYLSRT 450
QTTGGTANTQ TLGFSQGGPN TMANQAKNWL PGPCYRQQRV STTTGQNNNS 500
NFAWTAGTKY HLNGRNSLAN PGIAMATHKD DKERFFPSNG ILIFGKQNAA 550
RDNADYSDVM LTSEEEIKTT NPVATEEYGI VADNLQQQNT APQIGTVNSQ 600
GALPGMVWQN RDVYLQGIW AKIPHTDGNF HPSPLMGGFG LKHPPPQILI 650
KNTVPVADPP TTFNQSKLNS FITQYSTGQV SVEIEWELQK ENSKRWNPEI 700
QYTSNYYKST SVDFAVNTEG VYSEPHPIGT RYLTRPL

```

5

10

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica una cápside de AAV comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia codificante de la cápside de AAV que es al menos el 96 % idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica las SEQ ID NO: 3 o 4; y virus que comprenden las cápsides quiméricas de AAV. En algunas realizaciones, la secuencia codificante de la cápside de AAV es al menos del 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia de nucleótidos que codifica las SEQ ID NO: 3 o 4. En otra realización, la secuencia

ES 2 814 901 T3

codificante de la cápside de AAV comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, la secuencia de nucleótidos que codifica las SEQ ID NO:3 o 4.

Secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV de BNP62 (SEQ ID NO: 3)

5

MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKP GAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY 50
KYLGPENGLD KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADA EF 100
QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLEPLG LVEEGAKTAP GKKRPVEQSP 150
QEPDSSSGIG KTGQQPAKKR LNFGQTDGTE SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS 200
LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRVI TTSTRTWALP 250
TYNNHLYKQI SSASTGASND NHYFGYSTPW GYFDFNRFHC HFSPRDWQRL 300
INNNWGFPRK RLNFKLFNIQ VKEVTDNNGV KTIANNLTST VQVFTDSDYQ 350
LPYVLGSAHQ GCLPPFPADV FMIPQYGYLT LNNGSQAVGR SSFYCLEYFP 400
SQMLRTGNNF QFTYTFEDVP FHSSYAHSQS LDRLMNPLID QYLYYLSRTQ 450
TTGGTANTQT LGFSQGGPNT MANQAKNWLP GPCYRQQRVS TTTGQNNNSN 500
FAWTAGTKYH LNGRNSLANP GIAMATHKDD KERFFPSNGI LIFGKQNAAR 550
DNADYSDVML TSEEEIKTTN PVATEEYGIV ADNLQQQNTA PQIGTVNSQG 600
ALPGMVWQNR DVYLQGP IWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGL KHPPPQILIK 650
NTPVPADPPT TFNQSKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ 700
YTSNYYKSTS VDFAVNTEGV YSEPHPIGTR YLTRPL

Secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV de BNP63 (SEQ ID NO: 4)

10

MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY 50
KYLGPENGLD KGEPVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF 100
QERLQGDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLEPLG LVEEGAKTAP GKKRPVEQSP 150
QEPDSSSGIG ETGQQPAKKR LNFGQTDGSE SVPDPQPLGE PPATPAAVGP 200
TTMASGGGAP MADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRVI TTSTRTWALP 250
TYNNHLYKQI SSASTGASND NHYFGYSTPW GYFDFNRFHC HFSPRDWQRL 300
INNNWGFPRK RLSFKLFNIQ VKEVTDNNGV KTIANNLTST VQVFTDSEYQ 350
LPYVLGSAHQ GCLPPFPADV FMIPQYGYLT LNNGSQAVGR SSFYCLEYFP 400
SQMLRTGNNF TFSYTFEDVP FHSSYAHSQS LDRLMNPLID QYLYYLSRTQ 450
TTGGTANTQT LGFSQGGPNT MANQAKNWLP GPCYRQQRVS TTTGQNNNSN 500
FAWTAGTKYH LNGRNSLANP GIAMATHKDD KERFFPSNGI LIFGKQNAAR 550
DNADYSDVML TSEEEIKTTN PVATEEYGIV ADNLQQQNTA PQIGTVNSQG 600
ALPGMVWQNR DVYLQGP IWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGL KHPPPQILIK 650
NTPVPADPPT TFNQSKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ 700
YTSNYYKSTS VDFAVNTEGV YSEPHPIGTR YLTRPL

15

Las SEQ ID NO: 2-4 muestran ejemplos de las secuencias de la proteína de la cápside VP1 de la invención. La designación de todas las posiciones de aminoácidos en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas es con respecto a la numeración VP1. Los expertos en la técnica entenderán que la cápside de AAV generalmente

- 5 contiene también las proteínas de la cápside VP2 y VP3 más pequeñas. Debido a la superposición de las secuencias codificantes de las proteínas de la cápside de AAV, las secuencias codificantes de ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la cápside VP2 y VP3 serán evidentes a partir de las secuencias de VP1 mostradas en las SEQ ID NO:1-4. En particular, VP2 comienza en el nucleótido 412 (acg) de la SEQ ID NO:1 y la treonina 148 de la SEQ ID NO:2. VP3 comienza en el nucleótido 607 (atg) de la SEQ ID NO:1 y la metionina 203 de la SEQ ID NO:2. En determinadas realizaciones, se contemplan las proteínas de la cápside VP2 y VP3 aisladas que comprenden la secuencia de las SEQ ID NO:2-4 y los ácidos nucleicos aislados que codifican las proteínas VP2 o VP3, o ambas.
- 10 La invención también proporciona proteínas de cápside quiméricas de AAV y cápsides quiméricas, en donde la proteína de la cápside comprende, consisten esencialmente en, o consisten en una secuencia de aminoácidos tal como se expone en una de las SEQ ID NO:2-4, en donde 1, 2 o menos, 3 o menos, 4 o menos, 5 o menos, 6 o menos, 7 o menos, 8 o menos, 9 o menos, 10 o menos, 12 o menos, 15 o menos, 20 o menos, 25 o menos, 30 o menos, 40 o menos, o 50 o menos de los aminoácidos dentro de la secuencia codificante de la proteína de la cápside de una de las SEQ ID NO: 2-4 está sustituido por otro aminoácido (de origen natural, modificado y/o sintético), opcionalmente una sustitución de aminoácidos conservativa, y/o se eliminan y/o hay inserciones (incluidas las extensiones N-terminal y C-terminal) de 1, 2 o menos, 3 o menos, 4 o menos, 5 o menos, 6 o menos, 7 o menos, 8 o menos, 9 o menos, 10 o menos, 12 o menos, 15 o menos, 20 o menos, 25 o menos, 30 o menos, 40 o menos, o 50 o menos aminoácidos o cualquier combinación de sustituciones, deleciones y/o inserciones, en donde las sustituciones, las deleciones y/o las inserciones no deterioran indebidamente la estructura y/o la función de un virión (por ejemplo, un virión de AAV) que comprende la proteína o cápside variante de la cápside. Por ejemplo, en realizaciones representativas de la invención, un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside quimérica conserva sustancialmente al menos una propiedad de un virión quimérico que comprende una proteína de la cápside quimérica tal como se muestra en una de las SEQ ID NO: 2-4. Por ejemplo, el virión que comprende la proteína de la cápside quimérica puede conservar sustancialmente el perfil de tropismo de oligodendrocitos de un virión que comprende la proteína de la cápside de AAV quimérica tal como se muestra en una de las SEQ ID NO: 2-4. Los métodos para evaluar propiedades biológicas tales como la transducción de virus son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, los Ejemplos).
- 20 Las sustituciones conservativas de aminoácidos son conocidas en la técnica. En realizaciones particulares, una sustitución conservativa de aminoácidos incluye sustituciones dentro de uno o más de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y/o fenilalanina, tirosina.
- 30 Será evidente para los expertos en la técnica que las secuencias de aminoácidos de la proteína de la cápside de AAV quimérica de las SEQ ID NO:2-4 pueden modificarse adicionalmente para incorporar otras modificaciones conocidas en la técnica para impartir las propiedades deseadas. Como posibilidades no limitantes, la proteína de la cápside se puede modificar para incorporar secuencias de direccionamiento (por ejemplo, RGD) o secuencias que faciliten la purificación y/o detección. Por ejemplo, la proteína de la cápside se puede fusionar con toda o una parte de la glutatión-S-transferasa, proteína de unión a maltosa, un dominio de unión de heparina/heparán sulfato, poli-His, un ligando y/o una proteína reportera (por ejemplo, proteína fluorescente verde, β -glucuronidasa, β -galactosidasa, luciferasa, *etc.*), un fragmento de inmunoglobulina Fc, un anticuerpo de cadena sencilla, hemaglutinina, c-myc, epítipo FLAG y similares para formar una proteína de fusión. Los métodos para insertar péptidos de direccionamiento en la cápside de AAV son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, publicación de patente internacional WO 00/28004; Nicklin *et al.*, (2001) *Mol. Ther.* 474-181; White *et al.*, (2004) *Circulation* 109:513-319; Muller *et al.*, (2003) *Nature Biotech.* 21:1040-1046).
- 40 Los virus de la invención pueden comprender además un genoma vírico duplicado tal como se describe en la publicación de patente internacional WO 01/92551 y en la patente de EE.UU. N.º 7.465.583.
- 50 La invención también proporciona cápsides de AAV que comprenden las proteínas de la cápside de AAV quiméricas de la invención y partículas de virus (es decir, viriones) que comprenden el mismo, en donde las partículas de virus empaquetan (es decir, encapsidan) un genoma de vector, opcionalmente, un genoma de vector de AAV. En realizaciones particulares, la invención proporciona una partícula de AAV que comprende una cápside de AAV que comprende una proteína de la cápside de AAV de la invención, en donde la cápside de AAV empaqueta un genoma de vector de AAV. La invención también proporciona una partícula de AAV que comprende una cápside de AAV o una proteína de la cápside de AAV codificada por las secuencias codificantes de la cápside de ácido nucleico quimérico de la invención.
- 55 En realizaciones particulares, el virión es un vector recombinante que comprende un ácido nucleico heterólogo de interés, por ejemplo, para administrarlo a una célula. Por tanto, la presente invención es útil para el suministro de ácidos nucleicos a las células *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo*. En realizaciones representativas, el vector recombinante de la invención se puede emplear ventajosamente para administrar o transferir ácidos nucleicos a células animales (por ejemplo, de mamífero).
- 60 Cualquier secuencia o secuencias de nucleótidos heterólogas se pueden administrar mediante un vector de virus de

la presente invención. Los ácidos nucleicos de interés incluyen ácidos nucleicos que codifican polipéptidos, polipéptidos opcionalmente terapéuticos (por ejemplo, para usos médicos o veterinarios) y/o inmunogénicos (por ejemplo, para vacunas).

5 En algunas realizaciones, el polipéptido es uno que estimula el crecimiento y/o la diferenciación de oligodendrocitos. Los ejemplos incluyen, sin limitación, factor de crecimiento similar a la insulina 1, factor neurotrófico derivado de la glía, neurotrofina-3, artemina, factor de crecimiento transformante alfa, factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor inhibidor de la leucemia, prolactina, transportador monocarboxilato 1, o factor nuclear 1A.

10 Los polipéptidos terapéuticos incluyen, pero sin limitación, proteína reguladora transmembrana de fibrosis quística (CFTR), distrofina (incluido el producto proteico de minigenes o microgenes de distrofina, véanse, por ejemplo, Vincent *et al.*, (1993) *Nature Genetics* 5:130; la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2003017131; Wang *et al.*, (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 97:13714-9 [minidistrofina]; Harper *et al.*, (2002) *Nature Med.* 8:253-61 [microdistrofina]); mini-agrina, una laminina- $\alpha 2$, un sarcoglicano (α , β , γ o δ), proteína relacionada con la fukutina, propéptido de miostatina, follistatina, miostatina negativa dominante, un factor angiogénico (por ejemplo, VEGF, angiopoyetina-1 o 2), un factor anti-apoptótico (por ejemplo, hemo-oxigenasa-1, TGF- β , inhibidores de señales proapoptóticas tales como caspasas, proteasas, quinasas, receptores de muerte [por ejemplo, CD-095], moduladores de la liberación de citocromo C, inhibidores de la apertura e hinchazón de los poros mitocondriales); receptor soluble de activina tipo II, polipéptidos antiinflamatorios tales como el mutante dominante Ikappa B, sarcospan, utrofina, mini-utrofina, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra miostatina o propéptido de miostatina, moduladores del ciclo celular, moduladores de rho quinasa como Cetrina, que es una exoenzima bacteriana C3 modificada [disponible en BioAxone Therapeutics, Inc., Saint-Lauren, Quebec, Canadá], BCL-xL, BCL2, XIAP, FLICEc-s, caspasa dominante-negativa-8, caspasa negativa dominante-9, SPI-6 (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 20070026076), factor de transcripción PGC- $\alpha 1$, gen Pinch, gen ILK y gen timosina $\beta 4$), factores de coagulación (por ejemplo, Factor VIII, Factor IX, Factor X, *etc.*), eritropoyetina, angiostatina, endostatina, catalasa, tirosina hidroxilasa, una superóxido dismutasa intracelular y/o extracelular, leptina, el receptor de LDL, neprilisina, lipoproteína lipasa, ornitina transcarbamilasa, β -globina, α -globina, espectrina, α_1 -antitripsina, adenosina desaminasa, hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, β -glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa A lisosomal, cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, proteína RP65, una citocina (por ejemplo, α -interferón, β -Interferón, interferón- γ , interleucinas-1 a -14, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, linfotóxina y similares), factores de crecimiento peptídicos, factores neurotróficos y hormonas (por ejemplo, somatotropina, insulina, factores de crecimiento similares a la insulina, incluidos IGF-1 e IGF-2, GLP-1, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico -3 y -4, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor de crecimiento derivado de la glía, factor de crecimiento transformante - α y - β , y similares), proteínas morfológicas óseas (incluidas RANKL y VEGF), una proteína lisosomal, un receptor de glutamato, una linfocina, CD4 soluble, un receptor Fc, un receptor de linfocitos T, ApoE, ApoC, inhibidor 1 de la proteína fosfatasa inhibidor 1 (I-1), fosfolamban, serca2a, α -glucosidasa ácida lisosomal, α -galactosidasa A, Barkct, receptor $\beta 2$ -adrenérgico, quinasa del receptor $\beta 2$ -adrenérgico (BARK), fosfoinositido-3 quinasa (PI3 quinasa), calsarcina, un receptor (por ejemplo, el factor de crecimiento de necrosis tumoral, un receptor soluble), un factor antiinflamatorio como IRAP, Pim-1, PGC-1 α , SOD-1, SOD-2, ECF-SOD, calicreína, timosina- $\beta 4$, factor de transcripción inducible por hipoxia [HIF], un factor angiogénico, S100A1, parvalbúmina, adenilil ciclasa tipo 6, una molécula que efectúa la desactivación del receptor quinasa de tipo 2 acoplado a proteína G tal como un bARKct constitutivamente activo truncado; moléculas inhibidoras de fosfolambán o dominantes-negativas como fosfolambán S16E, un anticuerpo monoclonal (incluidos los anticuerpos monoclonales de cadena sencilla) o un producto del gen suicida (por ejemplo, timidina cinasa, citosina desaminasa, toxina diftérica y factores de necrosis tumoral tales como TNF- α) y cualquier otro polipéptido que tenga un efecto terapéutico en un sujeto que lo necesite.

50 Las secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican polipéptidos incluyen aquellas que codifican polipéptidos reporteros (por ejemplo, una enzima). Los polipéptidos reporteros son conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, proteína fluorescente verde, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, luciferasa y cloranfenicol acetiltransferasa.

55 De manera alternativa, el ácido nucleico heterólogo puede codificar un oligonucleótido antisentido, una ribozima (por ejemplo, tal como se describe en la patente de EE.UU. N.º 5.877.022), los ARN que efectúan el corte y empalme en *trans* mediado por los espliceosomas (véase, Puttaraju *et al.*, (1999) *Nature Biotech.* 17:246; Patente de Estados Unidos N.º 6.013.487; Patente de Estados Unidos N.º 6.083.702), los ARN de interferencia (ARNi) que incluyen los ARN de interferencia pequeños (ARNip) que median el silenciamiento génico (véase, Sharp *et al.*, (2000) *Science* 287:2431), microARN u otros ARN "funcionales" no traducidos, tales como los ARN "guía" (Gorman *et al.*, (1998) *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 95:4929; la Patente de Estados Unidos N.º 5.869.248 para Yuan *et al.*), y similares. Los ejemplos de ARN no traducidos incluyen ARNi o ARN antisentido contra el producto del gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR) (por ejemplo, para tratar tumores y/o para administración al corazón para prevenir daños por quimioterapia), el ARNi o el ARN antisentido contra la miostatina (distrofia muscular de Duchenne o Becker), el ARNi o el ARN antisentido contra VEGF o un inmunógeno tumoral que incluye, entre otros, los inmunógenos tumorales descritos específicamente en el presente documento (para tratar tumores), el ARNi u oligonucleótidos antisentido dirigidos a distrofinas mutadas (distrofia muscular de Duchenne o Becker), el ARNi o el ARN antisentido

5 contra el gen del antígeno de superficie de la hepatitis B (para prevenir y/o tratar la infección por hepatitis B), el ARNi o el ARN antisentido contra los genes tat y/o rev del VIH (para prevenir y/o tratar el VIH) y/o el ARNi o el ARN antisentido contra cualquier otro inmunógeno de un patógeno (para proteger a un sujeto del patógeno) o un producto génico defectuoso (para prevenir o tratar una enfermedad). También puede emplearse como reactivo de investigación el ARNi o el ARN antisentido contra las dianas descritas anteriormente o cualquier otra diana.

10 Como se conoce en la técnica, se pueden usar secuencias de ácidos nucleicos antisentido (por ejemplo, ADN o ARN) y ARN inhibidor (por ejemplo, microARN y ARNi como ARNip o ARNhc) para inducir "salto de exón" en pacientes con distrofia muscular que surge de defectos en el gen de la distrofina. Por tanto, el ácido nucleico heterólogo puede codificar un ácido nucleico antisentido o un ARN inhibidor que induce un salto de exón apropiado. Los expertos en la técnica apreciarán que el enfoque particular para el salto del exón depende de la naturaleza del defecto subyacente en el gen de la distrofina, y se conocen numerosas estrategias de este tipo en la técnica. Los ácidos nucleicos antisentido ejemplares y las secuencias de ARN inhibidor se dirigen al punto de ramificación cadena arriba y/o al sitio de corte y empalme del donante cadena abajo y/o secuencia potenciadora de empalme interno de uno o más de los exones de distrofina (por ejemplo, exones 19 o 23). Por ejemplo, en realizaciones particulares, el ácido nucleico heterólogo codifica un ácido nucleico antisentido o ARN inhibidor dirigido contra el punto de ramificación corriente arriba y el sitio donante de corte y empalme corriente abajo del exón 19 o 23 del gen de la distrofina. Dichas secuencias se pueden incorporar en un vector de AAV que libera un ARNrn U7 modificado y el ácido nucleico antisentido o ARN inhibidor (véase, por ejemplo, Goyenvalle *et al.*, (2004) Science 306:1796-1799).
 20 Como otra estrategia, se puede incorporar un ARNnn U1 modificado en un vector AAV junto con ARNip, microARN o ARN antisentido complementario con los sitios de corte y empalme aguas arriba y aguas abajo de un exón de distrofina (por ejemplo, exón 19 o 23) (véase, por ejemplo, Denti *et al.*, (2006) Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 103:3758-3763). Además, los ácidos nucleicos antisentido y el ARN inhibidor pueden dirigirse a las secuencias potenciadoras de corte y empalme dentro de los exones 19, 43, 45 o 53 (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 6.653.467; la Patente de Estados Unidos N.º 6.727.355; y la Patente de EE.UU. N.º 6.653.466).

30 Las ribozimas son complejos de ARN-proteína que escinden los ácidos nucleicos de una manera específica de sitio. Las ribozimas tienen dominios catalíticos específicos que poseen actividad endonucleasa (Kim *et al.*, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84:8788; Gerlach *et al.*, (1987) Nature 328:802; Forster y Symons, (1987) Cell 49:211). Por ejemplo, una gran cantidad de ribozimas aceleran las reacciones de transferencia de fosfoéster con un alto grado de especificidad, a menudo escindiendo solo uno de varios fosfoésteres en un sustrato oligonucleotídico (Michel y Westhof, (1990) J. Mol. Biol. 216:585; Reinhold-Hurek y Shub, (1992) Nature 357:173). Esta especificidad se ha atribuido al requisito de que el sustrato se una a través de interacciones específicas de emparejamiento de bases a la secuencia guía interna ("IGS") de la ribozima antes de la reacción química.

35 La catálisis de ribozimas se ha observado principalmente como parte de reacciones de escisión/ligación específicas de secuencia que implican ácidos nucleicos (Joyce, (1989) Nature 338:217). Por ejemplo, la Patente de EE.UU. 5.354.855 informa de que ciertas ribozimas pueden actuar como endonucleasas con una especificidad de secuencia mayor que la de las ribonucleasas conocidas y que se aproxima a la de las enzimas de restricción de ADN. Por tanto, la inhibición de la expresión de ácidos nucleicos mediada por ribozimas específicas de secuencia puede ser particularmente adecuada para aplicaciones terapéuticas (Scanlon *et al.*, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88:10591; Sarver *et al.*, (1990) Science 247:1222; Sioud *et al.*, (1992) J. Mol. Biol. 223:831).

45 Los microARN (mir) son moléculas de ARN celular naturales que pueden regular la expresión de múltiples genes controlando la estabilidad del ARNm. La sobreexpresión o disminución de un microARN particular se puede usar para tratar una disfunción y se ha demostrado que es eficaz en una serie de estados patológicos y modelos animales de enfermedad. (véase, por ejemplo, Couzin, (2008) Science 319:1782-4). El AAV quimérico se puede utilizar para administrar microARN a las células, tejidos y sujetos para el tratamiento de enfermedades genéticas y adquiridas, o para mejorar la funcionalidad y promover el crecimiento de ciertos tejidos. Por ejemplo, mir-1, mir-133, mir-206 y/o mir-208 se pueden usar para tratar enfermedades cardíacas y del músculo esquelético (véase, por ejemplo, Chen *et al.*, (2006) Genet. 38:228-33; van Rooij *et al.*, (2008) Trends Genet. 24:159-66). El microARN también se puede usar para modular el sistema inmunológico después de la entrega de genes (Brown *et al.*, (2007) Blood 110:4144-52).

55 El término "oligonucleótido antisentido" (que incluye "ARN antisentido") como se usa en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico que es complementario y se hibrida específicamente con una secuencia de ADN o ARN especificada. Los oligonucleótidos antisentido y los ácidos nucleicos que los codifican se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5.023.243 de Tullis; la Patente de Estados Unidos N.º 5.149.797 de Pederson *et al.*

60 Los expertos en la técnica apreciarán que no es necesario que el oligonucleótido antisentido sea completamente complementario a la secuencia diana siempre que el grado de similitud de secuencia sea suficiente para que la secuencia de nucleótidos antisentido hibride específicamente con su diana (tal como se define anteriormente) y reducir la producción del producto proteico (por ejemplo, al menos aproximadamente el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o más).

65 Para determinar la especificidad de la hibridación, la hibridación de tales oligonucleótidos con secuencias diana se

puede llevar a cabo en condiciones de rigurosidad reducida, condiciones de rigurosidad media o incluso rigurosas. Las condiciones adecuadas para lograr condiciones de hibridación reducidas, medias y rigurosas son las descritas en el presente documento.

5 También se describen oligonucleótidos antisentido que tienen al menos aproximadamente el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o más de identidad de secuencia con el complemento de la secuencia diana y reducir la producción del producto proteico (tal como se definió anteriormente). En algunos ejemplos, la secuencia antisentido contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 emparejamientos incorrectos en comparación con la secuencia diana.

10 Los métodos para determinar el porcentaje de identidad de las secuencias de ácido nucleico se describen con más detalle en otra parte del presente documento.

15 La longitud del oligonucleótido antisentido no es crítica siempre que hibride específicamente con la diana pretendida y reduzca la producción del producto proteico (como se definió anteriormente) y se pueda determinar de acuerdo con procedimientos de rutina. En general, el oligonucleótido antisentido es al menos aproximadamente ocho, diez o doce o quince nucleótidos de longitud y/o menos de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 o 150 nucleótidos de longitud.

20 El ARN de interferencia (ARNi) es otro enfoque útil para reducir la producción de un producto proteico (por ejemplo, ARNhc o ARNip). El ARNi es un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional en el que se introduce en una célula u organismo ARN bicatenario (ARNdc) correspondiente a una secuencia diana de interés, dando como resultado la degradación del ARNm correspondiente. El mecanismo por el cual el ARNi logra el silenciamiento génico ha sido revisado en Sharp *et al.*, (2001) Genes Dev 15: 485-490; y Hammond *et al.*, (2001) Nature Rev. Gen. 2:110-119). El efecto del ARNi persiste durante múltiples divisiones celulares antes de que se recupere la expresión génica. Por lo tanto, el ARNi es un método poderoso para hacer supresiones génicas o "atenuaciones génicas" dirigidas a nivel de ARN. El ARNi ha demostrado su eficacia en células humanas, incluyendo riñón embrionario humano y células HeLa (véase, por ejemplo, Elbashir *et al.*, Nature (2001) 411:494-8).

30 Los intentos iniciales de usar ARNi en células de mamíferos dieron como resultado mecanismos de defensa antivíricos que implican a PKR en respuesta a las moléculas de ARNdc (véase, por ejemplo, Gil *et al.*, (2000) Apoptosis 5:107). Desde entonces se ha demostrado que el ARNdc sintético corto de aproximadamente 21 nucleótidos, conocido como "ARN de interferencia cortos" (ARNip) pueden mediar el silenciamiento en células de mamíferos sin desencadenar la respuesta antivírica (véase, por ejemplo, Elbashir *et al.*, Nature (2001) 411:494-8; Caplen *et al.*, (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 98:9742).

40 La molécula de ARNi (incluida una molécula de ARNip) puede ser un ARN en horquilla corto (ARNhc; véase Paddison *et al.*, (2002), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99:1443-1448), que se cree que se procesa en la célula mediante la acción de la enzima Dicer, similar a la ribonucleasa III, en moléculas de ARNip de 20-25meros. Los ARNhc generalmente tienen una estructura de tallo-bucle en la que dos secuencias repetidas invertidas están separadas por una secuencia espaciadora corta que forma un bucle. Ha habido informes de ARNhc con bucles que varían de 3 a 23 nucleótidos de longitud. La secuencia de bucle generalmente no es crítica. Las secuencias de bucle ejemplares incluyen los siguientes motivos: AUG, CCC, UUCG, CCACC, CTCGAG, AAGCUU, CCACACC y UUCAAGAGA.

45 El ARNi puede comprender además una molécula circular que comprende regiones sentido y antisentido con dos regiones de bucle a cada lado para formar una estructura en forma de "pesa de gimnasia" tras la formación del ARNdc entre las regiones sentido y antisentido. Esta molécula se puede procesar *in vitro* o *in vivo* para liberar la porción de ARNdc, por ejemplo, un ARNip.

50 La publicación de patente internacional WO 01/77350 describe un vector para la transcripción bidireccional para generar transcripciones tanto sentido como antisentido de una secuencia heteróloga en una célula eucariota. Esta técnica se puede emplear para producir ARNi para su uso de acuerdo con la divulgación en el presente documento.

55 Shinagawa *et al.*, (2003) Genes Dev. 17:1340 documentó un método para expresar ARNdc largos a partir de un promotor de CMV (un promotor de pol II), cuyo método también es aplicable a promotores de pol II específicos de tejido. Del mismo modo, el enfoque de Xia *et al.*, (2002) Nature Biotech. 20:1006, evita la formación de colas de poli(A) y se puede usar en conexión con promotores específicos de tejido.

60 Los métodos para generar ARNi incluyen la síntesis química, la transcripción *in vitro*, digestión de ARNdc largo por Dicer (*in vitro* o *in vivo*), la expresión *in vivo* de un vector de entrega y la expresión *in vivo* de un casete de expresión de ARNi derivado de PCR (véase, por ejemplo, TechNotes 10(3) "Five Ways to Produce siRNAs," from Ambion, Inc., Austin TX; disponible en www.ambion.com).

65 Hay pautas disponibles para diseñar moléculas de ARNip (véase, por ejemplo, la referencia de Ambion, Inc., Austin TX; disponible en www.ambion.com). En realizaciones particulares, la secuencia de ARNip tiene aproximadamente un 30-50 % de contenido de G/C. Además, los tramos largos de más de cuatro restos de T o A generalmente se

evitan si se usa ARN polimerasa III para transcribir el ARN. Los buscadores de dianas de ARNi en línea están disponibles, por ejemplo, from Ambion, Inc. (www.ambion.com), a través del Instituto Whitehead de Investigación Biomédica (www.jura.wi.mit.edu) o de Dharmacon Research, Inc. (www.dharmacon.com).

5 La región antisentido de la molécula de ARNi puede ser completamente complementaria a la secuencia diana, pero no necesita ser tan larga ya que hibrida específicamente con la secuencia diana (como se definió anteriormente) y reduce la producción del producto proteico (por ejemplo, en al menos aproximadamente el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o más). En algunas realizaciones, la hibridación de tales oligonucleótidos con secuencias diana se puede llevar a cabo en condiciones de rigurosidad reducida, condiciones de rigurosidad media o incluso rigurosas, como se ha definido anteriormente.

10 En otras realizaciones, la región antisentido del ARNi tiene al menos alrededor del 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o más de identidad de secuencia con el complemento de la secuencia diana y reduce la producción del producto proteico (por ejemplo, en al menos el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o más). En algunas realizaciones, la región antisentido contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 emparejamientos incorrectos en comparación con la secuencia diana. Los emparejamientos incorrectos generalmente se toleran mejor en los extremos del ARNdc que en la parte central.

15 En realizaciones particulares, el ARNi se forma mediante la formación de complejos intermoleculares entre dos moléculas con sentido y antisentido separadas. El ARNi comprende una región de cadena doble formada por el emparejamiento de bases intermolecular entre las dos cadenas separadas. En otras realizaciones, el ARNi comprende una región ds formada por emparejamiento de bases intramolecular dentro de una única molécula de ácido nucleico que comprende regiones tanto sentido como antisentido, típicamente como una repetición invertida (por ejemplo, un ARNh_c u otra estructura de bucle de tallo, o una molécula circular de ARNi). El ARNi puede comprender además una región espaciadora entre las regiones sentido y antisentido.

20 Generalmente, las moléculas de ARNi son muy selectivas. Si se desea, los expertos en la técnica pueden eliminar fácilmente el ARNi candidato que probablemente interfiera con la expresión de ácidos nucleicos distintos de la diana buscando en bases de datos relevantes para identificar secuencias de ARNi que no tengan una homología de secuencia sustancial con otras secuencias conocidas, por ejemplo, usando BLAST (disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

25 Los kits para la producción de ARNi están disponibles comercialmente, por ejemplo, de New England Biolabs, Inc. y Ambion, Inc.

30 El vector de virus recombinante también puede comprender una secuencia de nucleótidos heteróloga que comparte homología y se recombina con un locus en el cromosoma hospedador. Este enfoque se puede utilizar para corregir un defecto genético en la célula hospedadora.

35 La presente divulgación también proporciona vectores de virus recombinantes que expresan un polipéptido inmunogénico, por ejemplo, para vacunación. El ácido nucleico heterólogo puede codificar cualquier inmunógeno de interés conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, inmunógenos del virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la gripe, proteínas gag, antígenos tumorales, antígenos de cáncer, antígenos bacterianos, antígenos víricos y similares. De manera alternativa, el inmunógeno se puede presentar en la cápside del virus (por ejemplo, incorporado en ella) o anclado a la cápside del virus (por ejemplo, mediante modificación covalente).

40 El uso de parvovirus como vacunas es conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Miyamura *et al.*, (1994) Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 91:8507; la Patente de Estados Unidos N.º 5.916.563 de Young *et al.*, 5.905.040 de Mazzara *et al.*, la Patente de Estados Unidos N.º 5.882.652, la Patente de Estados Unidos N.º 5.863.541 de Samulski *et al.*). El antígeno puede presentarse en la cápside del virus. De manera alternativa, el antígeno puede expresarse a partir de un ácido nucleico heterólogo introducido en un genoma de vector recombinante.

45 Un polipéptido inmunogénico o inmunógeno, puede ser cualquier polipéptido adecuado para proteger al sujeto contra una enfermedad, incluyendo pero no limitado a enfermedades microbianas, bacterianas, protozoarias, de parásitos, fúngicas y víricas. Por ejemplo, el inmunógeno puede ser un inmunógeno de ortomixovirus (por ejemplo, un inmunógeno del virus de la gripe, tal como la proteína de superficie de hemaglutinina (HA) del virus de la gripe o el gen de la nucleoproteína del virus de la gripe, o un inmunógeno del virus de la gripe equina), o un inmunógeno de lentivirus (por ejemplo, un inmunógeno del virus de la anemia infecciosa equina, un inmunógeno del virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS) o un inmunógeno del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tal como la proteína GP160 de la envoltura del VIH o VIS, las proteínas de la cápside/matriz del VIH o VIS, y los productos génicos de *gag*, *pol* y *env* del VIH o VIS). El inmunógeno también puede ser un inmunógeno de arenavirus (por ejemplo, inmunógeno del virus de la fiebre de Lassa, tal como el gen de la proteína de nucleocápside del virus de la fiebre de Lassa y el gen de la glicoproteína de la envoltura de la fiebre de Lassa), un inmunógeno de poxvirus (por ejemplo, vaccinia, tal como los genes vaccinia L1 o L8), un inmunógeno de flavivirus (por ejemplo, un inmunógeno del virus de la fiebre amarilla o un inmunógeno del virus de la encefalitis japonesa), un inmunógeno de filovirus (por ejemplo, un inmunógeno del virus del ébola o un inmunógeno del virus de Marburg, tal como los genes NP y GP), un

inmunógeno de bunyavirus (por ejemplo, los virus RVFV, CCHF y SFS), o un inmunógeno de coronavirus (por ejemplo, un inmunógeno de coronavirus humano infeccioso, tal como el gen de la glicoproteína de la envoltura del coronavirus humano, o un inmunógeno del virus de la gastroenteritis transmisible porcina, o un inmunógeno del virus de la bronquitis infecciosa aviar, o un inmunógeno del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) tal como una proteína S [S1 o S2], M, E, o N o un fragmento inmunogénico de la misma). El inmunógeno puede ser además un inmunógeno de polio, inmunógeno del herpes (por ejemplo, inmunógenos de CMV, EBV, HSV) inmunógeno de las paperas, inmunógeno del sarampión, inmunógeno de rubéola, toxina diftérica u otro inmunógeno diftérico, antígeno de tos ferina, inmunógeno de hepatitis (por ejemplo, hepatitis A, hepatitis B o hepatitis C), o cualquier otro inmunógeno de vacuna conocido en la técnica.

De manera alternativa, el inmunógeno puede ser cualquier antígeno tumoral o de célula cancerosa. Opcionalmente, el antígeno tumoral o canceroso se expresa en la superficie de la célula cancerosa. Los antígenos de células cancerosas y tumorales ejemplares se describen en S. A. Rosenberg, (1999) *Immunity* 10:281). Los antígenos tumorales y de cáncer ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa: el producto del gen BRCA1, el producto del gen BRCA2, gp100, tirosinasa, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, β -catenina, MUM-1, caspasa-8, KIAA0205, HPVE, SART-1, PRAME, p15, antígenos tumorales de melanoma (Kawakami *et al.*, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91:3515; Kawakami *et al.*, (1994) *J. Exp. Med.*, 180:347; Kawakami *et al.*, (1994) *Cancer Res.* 54:3124) incluido MART-1 (Coulie *et al.*, (1991) *J. Exp. Med.* 180:35), gp100 (Wick *et al.*, (1988) *J. Cutan. Pathol.* 4:201) y antígeno MAGE (MAGE-1, MAGE-2 y MAGE-3) (Van der Bruggen *et al.*, (1991) *Science*, 254:1643), CEA, TRP-1; TRP-2; P15 y tirosinasa (Brichard *et al.*, (1993) *J. Exp. Med.* 178:489); producto del gen HER-2/neu (Patente de Estados Unidos N.º 4.968.603); CA 125; HE4; LK26; FB5 (endosialina); TAG 72; AFP; CA19-9; NSE; DU-PAN-2; CA50; Span-1; CA72-4; HCG; STN (antígeno sialil Tn); proteínas c-erbB-2; PSA; L-CanAg; receptor de estrógenos; globulina grasa de la leche; proteína supresora de tumores p53 (Levine, (1993) *Ann. Rev. Biochem.* 62:623); antígenos de mucina (publicación de patente internacional WO 90/05142); telomerasas; proteínas de la matriz nuclear; fosfatasa ácida prostática; antígenos del virus del papiloma; y antígenos asociados con los siguientes cánceres: melanomas, adenocarcinoma, timoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, cáncer de riñón, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello y otros (véase, por ejemplo, Rosenberg, (1996) *Annu. Rev. Med.* 47:481-91).

De manera alternativa, la secuencia de nucleótidos heteróloga puede codificar cualquier polipéptido que se produzca deseablemente en una célula *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por ejemplo, los vectores de virus pueden introducirse en células cultivadas y el producto proteico expresado puede aislarse de ellas.

Los expertos en la técnica entenderán que el o los ácidos nucleicos heterólogos de interés pueden asociarse operativamente con secuencias de control apropiadas. Por ejemplo, el ácido nucleico heterólogo puede estar asociado operativamente con elementos de control de expresión, tales como señales de control de transcripción/traducción, orígenes de replicación, señales de poliadenilación, sitios de entrada de ribosomas internos (IRES), promotores, potenciadores y similares.

Los expertos en la técnica apreciarán además que se puede usar una variedad de elementos promotores/potenciadores dependiendo del nivel y la expresión específica de tejido deseada. El promotor/potenciador puede ser constitutivo o inducible, dependiendo del patrón de expresión deseado. El promotor/potenciador puede ser natural o extraño y puede ser una secuencia natural o sintética. Por extraña, se pretende que la región de inicio de la transcripción no se encuentre en el hospedador de tipo silvestre en el que se introduce la región de inicio de la transcripción.

Los elementos promotores/potenciadores pueden ser naturales de la célula diana o sujetos a ser tratados y/o naturales de la secuencia de ácido nucleico heteróloga. El elemento promotor/potenciador se elige generalmente de modo que funcione en la(s) célula(s) diana de interés. En realizaciones representativas, el elemento promotor/potenciador es un elemento promotor/potenciador de mamífero. El elemento promotor/potenciador puede ser constitutivo o inducible.

Los elementos de control de la expresión inducible se usan generalmente en aquellas aplicaciones en las que es deseable proporcionar regulación sobre la expresión de la secuencia o secuencias heterólogas de ácido nucleico. Los elementos promotores/potenciadores inducibles para la administración de genes pueden ser elementos promotores/potenciadores específicos de tejido o preferidos por tejido, e incluyen elementos promotores/potenciadores específicos o preferidos de músculos (incluidos el músculo cardíaco, esquelético y/o liso), específicos o preferidos de tejidos neurales (incluidos los específicos del cerebro), ojo (incluyendo los específicos de retina y específicos de córnea), específicos o preferidos de hígado, específicos o preferidos de médula ósea, específicos o preferidos de páncreas, específicos o preferidos de bazo y específicos o preferidos de pulmón. En una realización, se usa un promotor especificado por oligodendrocitos o preferido por oligodendrocitos. Los ejemplos incluyen, sin limitación, proteína básica de mielina, fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, proteína proteolípida, Gtx y Sox10. El uso de un promotor preferido o específico de oligodendrocito puede aumentar la especificidad lograda por el vector de AAV quimérico limitando adicionalmente la expresión del ácido nucleico heterólogo en

oligodendrocitos. Otros elementos promotores/potenciadores inducibles incluyen elementos inducibles por hormonas e inducibles por metales. Los elementos promotores/potenciadores inducibles ejemplares incluyen, pero sin limitación, un elemento Tet on/off, un promotor inducible por RU486, un promotor inducible por ecdisona, un promotor inducible por rapamicina y un promotor de metalotioneína.

En realizaciones en las que la secuencia o secuencias heterólogas de ácido nucleico se transcriben y luego se traducen en las células diana, generalmente se emplean señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de secuencias codificantes de proteínas insertadas. Estas secuencias de control de traducción exógenas, que pueden incluir el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes, pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos.

La divulgación también proporciona partículas quiméricas de AAV que comprenden una cápside de AAV y un genoma de AAV, en donde el genoma de AAV "se corresponde con" (es decir, codifica) la cápside de AAV. También se proporcionan colecciones o bibliotecas de tales partículas de AAV quiméricas, en donde la colección o biblioteca comprende 2 o más, 10 o más, 50 o más, 100 o más, 1000 o más, 10^4 o más, 10^5 o más, o 10^6 o secuencias más distintas.

La presente divulgación abarca además partículas de cápside "vacías" (es decir, en ausencia de un genoma de vector) que comprenden, que consiste en, o que consisten esencialmente en las proteínas de la cápside de AAV quiméricas de la invención. Las cápsides quiméricas de AAV se pueden utilizar como "vehículos de cápside", tal como se ha descrito en la Patente de Estados Unidos N.º 5.863.541. Las moléculas que pueden estar unidas covalentemente, unidas o empaquetadas por las cápsides del virus y transferidos a una célula incluyen ADN, ARN, un lípido, un hidrato de carbono, un polipéptido, una pequeña molécula orgánica, o combinaciones de las mismas. Además, las moléculas pueden asociarse con (por ejemplo, "atadas a") el exterior de la cápside del virus para la transferencia de las moléculas a las células diana hospedadoras. En un ejemplo, la molécula está unida covalentemente (es decir, conjugada o acoplada químicamente) a las proteínas de la cápside. Los expertos en la técnica conocen métodos de unión covalente de moléculas.

Las cápsides de virus desveladas en el presente documento también encuentran uso para generar anticuerpos contra las nuevas estructuras de la cápside. Como alternativa adicional, se puede insertar una secuencia de aminoácidos exógena en la cápside del virus para la presentación del antígeno a una célula, por ejemplo, para la administración a un sujeto para producir una respuesta inmune a la secuencia de aminoácidos exógena.

La invención también proporciona ácidos nucleicos (por ejemplo, ácidos nucleicos aislados) que codifican las cápsides de virus quiméricas y las proteínas de la cápside quimérica de la invención. Se proporcionan además vectores que comprenden los ácidos nucleicos y células (*in vivo* o en cultivo) que comprende los ácidos nucleicos y/o vectores de la invención. Tales ácidos nucleicos, vectores y células se pueden utilizar, por ejemplo, como reactivos (por ejemplo, construcciones auxiliares o células de empaquetamiento) para la producción de vectores de virus tal como se describe en el presente documento.

En realizaciones ejemplares, la invención proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican la cápside de AAV de las SEQ ID NO: 2-4 o al menos el 96 % idénticas a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1. La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican las variantes de la cápside de AAV, variantes de la proteína de la cápside y proteínas de fusión como se describe anteriormente. En realizaciones particulares, el ácido nucleico hibrida con el complemento de las secuencias de ácido nucleico descritas específicamente en el presente documento en condiciones estándar conocidas por los expertos en la técnica y codifica una variante de cápside y/o proteína de cápside. Opcionalmente, la cápside variante o proteína de la cápside conserva sustancialmente al menos una propiedad de la cápside y/o la cápside o proteína de la cápside codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:1. Por ejemplo, una partícula de virus que comprende la variante de cápside o la variante de proteína de cápside puede conservar sustancialmente el perfil de tropismo de oligodendrocitos de una partícula de virus que comprende una cápside o proteína de cápside codificada por una secuencia codificante de ácido nucleico de la SEQ ID NO:1.

Por ejemplo, la hibridación de tales secuencias se puede llevar a cabo en condiciones de rigurosidad reducida, condiciones de rigurosidad media o incluso rigurosas. Las condiciones ejemplares para la hibridación reducida, media y rigurosa son las siguientes: (por ejemplo, condiciones representadas por una rigurosidad de lavado de formamida al 35-40 % con solución de Denhardt 5x, SDS al 0,5 % y SSPE 1x a 37 °C; las condiciones representadas por una rigurosidad de lavado de formamida al 40-45 % con solución de Denhardt a 5x, SDS al 0,5 % y SSPE 1x a 42 °C; y las condiciones representadas por una rigurosidad de lavado de formamida al 50 % con solución de Denhardt a 5x, SDS al 0,5 % y SSPE 1x a 42 °C, respectivamente). Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2ª Ed. 1989) (Cold Spring Harbor Laboratory).

En otras realizaciones, las secuencias de ácido nucleico que codifican una variante de la cápside o proteína de la cápside de la invención tienen al menos aproximadamente el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o mayor identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:1 y opcionalmente codifica una variante de cápside o proteína de cápside que conserva sustancialmente al menos una propiedad de la cápside o proteína de la cápside

codificada por un ácido nucleico de la SEQ ID NO:1.

Como se conoce en la técnica, se pueden usar varios programas diferentes para identificar si un ácido nucleico o polipéptido tiene identidad de secuencia con una secuencia conocida. El porcentaje de identidad tal como se usa en el presente documento significa que un ácido nucleico o un fragmento del mismo comparte un porcentaje de identidad especificado con otro ácido nucleico, cuando se alinean de forma óptima con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), utilizando BLASTN. Para determinar el porcentaje de identidad entre dos ácidos nucleicos diferentes, el porcentaje de identidad se determinará usando el programa de BLASTN "secuencias BLAST 2". Este programa está disponible para uso público en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) a través de Internet (Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402). Los parámetros que se utilizarán son cualquier combinación de lo siguiente que produzca el porcentaje de identidad calculado más alto (como se calcula a continuación) con los parámetros predeterminados que se muestran entre paréntesis: Programa - blastn Matrix-0 BLOSUM62 Recompensa por un emparejamiento correcto-0 o 1 (1) Penalización por un emparejamiento incorrecto-0, -1, -2 o -3 (-2) Penalización de espacio abierto-0, 1, 2, 3, 4 o 5 (5) Penalización de espacio de extensión-0 o 1 (1) Espacio x_dropoff-0 o 50 (50) Espera-10.

El porcentaje de identidad o similitud cuando se refiere a polipéptidos, indica que el polipéptido en cuestión presenta un porcentaje específico de identidad o similitud cuando se compara con otra proteína o una porción de la misma en las longitudes comunes determinadas usando BLASTP. Este programa también está disponible para uso público en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) a través de Internet (Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402). El porcentaje de identidad o similitud de los polipéptidos se mide típicamente usando el programa informático de análisis de secuencias. Véase, por ejemplo, el paquete de programa informático de análisis de secuencias del Genetics Computer Group, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, 910 University Avenue, Madison, Wis. 53705. El programa informático de análisis de proteínas empareja secuencias similares usando medidas de homología asignadas a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones. Las sustituciones conservativas incluyen generalmente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina.

En realizaciones particulares, el ácido nucleico puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en un vector que incluye pero no se limita a un plásmido, fago, vector vírico (por ejemplo, vector de AAV, un vector adenovírico, un vector de herpesvirus, o un vector de baculovirus), cromosoma artificial bacteriano (BAC) o cromosoma artificial de levadura (YAC). Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en un vector de AAV que comprende una repetición terminal en 5' y/o 3' (por ejemplo, repetición terminal en 5' y/o 3' de AAV).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la proteína de la cápside de AAV quimérica comprende además una secuencia codificante rep de AAV. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser una construcción auxiliar para producir reservorios víricos.

La divulgación también proporciona células de empaquetamiento que comprenden de manera estable un ácido nucleico de la invención. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede incorporar de manera estable en el genoma de la célula o se puede mantener de manera estable en una forma episomal (por ejemplo, un "episoma nuclear basado en EBV").

El ácido nucleico se puede incorporar a un vector de administración, tal como un vector de administración vírica. Para ilustración, el ácido nucleico de la invención se puede empaquetar en una partícula de AAV, una partícula de adenovirus, una partícula de herpesvirus, una partícula de baculovirus o cualquier otra partícula de virus adecuada.

Además, el ácido nucleico se puede asociar operativamente con un elemento promotor. Los elementos promotores se describen con más detalle en el presente documento.

La presente invención proporciona además métodos para producir los vectores de virus de la invención. En una realización representativa, la presente invención proporciona un método para producir un vector de virus recombinante, comprendiendo el método proporcionar a una célula *in vitro*, (a) un molde que comprende (i) un ácido nucleico heterólogo, y (ii) secuencias señal de empaquetamiento suficientes para la encapsidación del molde de AAV en partículas de virus (por ejemplo, una o más (por ejemplo, dos) repeticiones terminales, tales como repeticiones terminales de AAV), y (b) secuencias de AAV suficientes para la replicación y encapsidación del molde en partículas víricas (por ejemplo, las secuencias *rep* de AAV y *cap* de AAV que codifican una cápside de AAV de la invención). El molde y la replicación de AAV y las secuencias de la cápside se proporcionan en condiciones tales que las partículas de virus recombinantes que comprenden el molde empaquetado dentro de la cápside se producen en la célula. El método puede comprender además la etapa de recoger las partículas de virus de la célula. Las partículas de virus se pueden recoger del medio y/o mediante lisado de las células.

En una realización ilustrativa, la invención proporciona un método para producir una partícula de rAAV que comprende una cápside de AAV, comprendiendo el método: proporcionar una célula *in vitro* con un ácido nucleico

que codifica una cápside de AAV quimérico de la invención, una secuencia de codificación de rep AAV, un genoma de vector de AAV que comprende un ácido nucleico heterólogo y funciones auxiliares para generar una infección de AAV productiva; y permitir el ensamblaje de las partículas de AAV que comprenden la cápside de AAV y que encapsulan el genoma del vector de AAV.

5 La célula es típicamente una célula permisiva para la replicación vírica del AAV. Puede emplearse cualquier célula adecuada conocida en la técnica, tal como células de mamíferos. También son adecuadas las líneas celulares de empaquetamiento que se complementan en trans que proporcionan funciones eliminadas de un virus auxiliar defectuoso en la replicación, por ejemplo, células 293 u otras células complementarias trans E1a.

10 La replicación de AAV y las secuencias de la cápside se pueden proporcionar mediante cualquier método conocido en la técnica. Los protocolos actuales suelen expresar los genes *rep/cap* de AAV en un solo plásmido. No es necesario proporcionar juntas las secuencias de replicación y empaquetamiento de AAV, aunque puede resultar conveniente hacerlo. Las secuencias *rep* y/o *cap* de AAV pueden ser proporcionadas por cualquier vector vírico o no vírico. Por ejemplo, las secuencias *rep/cap* pueden ser proporcionadas por un vector de adenovirus o herpesvirus híbrido (por ejemplo, insertado en las regiones E1a o E3 de un vector de adenovirus deleciónado). Los vectores de EBV también se pueden emplear para expresar los genes *cap* y *rep* del AAV. Una ventaja de este método es que los vectores de EBV son episomales, sin embargo, mantendrá un alto número de copias a lo largo de sucesivas divisiones celulares (es decir, están integrados de forma estable en la célula como elementos extracromosómicos, designados como un episoma nuclear basado en EBV).

Como alternativa adicional, las secuencias de *rep/cap* pueden transportarse de manera estable (episomal o integradas) dentro de una célula.

25 Normalmente, las secuencias *rep/cap* del AAV no estarán flanqueadas por las secuencias de empaquetamiento de AAV (por ejemplo, las ITR del AAV), para evitar el rescate y/o el empaquetado de estas secuencias.

30 El molde (por ejemplo, un genoma de vector rAAV) se puede proporcionar a la célula usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el molde puede ser administrado por un vector no vírico (por ejemplo, plásmido) o vírico. En realizaciones particulares, el molde es suministrado por un vector de herpesvirus o adenovirus (por ejemplo, insertado en las regiones E1a o E3 de un adenovirus deleciónado). Como otra ilustración, Palombo *et al.*, (1998) J. Virol. 72:5025, describe un vector de baculovirus que lleva un gen indicador flanqueado por las ITR de AAV. También se pueden emplear vectores de EBV para administrar el molde, tal como se describe anteriormente con respecto a los genes *rep/cap*.

35 En otra realización representativa, el molde se proporciona mediante un rAAV que se replica. En otras realizaciones adicionales, un provirus de AAV está integrado de forma estable en el cromosoma de la célula.

40 Para obtener los títulos máximos de virus, las funciones de virus auxiliares (por ejemplo, adenovirus o herpesvirus) esenciales para una infección por AAV productiva se proporcionan generalmente a la célula. Las secuencias de virus auxiliares necesarias para la replicación de AAV se conocen en la técnica. Normalmente, estas secuencias son proporcionadas por un vector auxiliar de adenovirus o herpesvirus. De manera alternativa, las secuencias de adenovirus o herpesvirus pueden ser proporcionadas por otro vector vírico o no vírico, por ejemplo, como un miniplásmido de adenovirus no infeccioso que lleva todos los genes auxiliares necesarios para la producción eficaz de AAV como lo describe Ferrari *et al.*, (1997) Nature Med. 3:1295, y las Patentes de EE.UU. N.º 6.040.183 y 6.093.570.

45 Además, las funciones del virus auxiliar pueden ser proporcionadas por una célula de empaquetamiento con los genes auxiliares integrados en el cromosoma o mantenidos como un elemento extracromosómico estable. En realizaciones representativas, las secuencias del virus auxiliar no se pueden empaquetar en viriones de AAV, por ejemplo, no están flanqueados por las ITR del AAV.

50 Los expertos en la técnica apreciarán que puede ser ventajoso proporcionar la replicación de AAV y las secuencias de la cápside y las secuencias de virus auxiliares (por ejemplo, secuencias de adenovirus) en una única construcción auxiliar. Esta construcción auxiliar puede ser una construcción vírica o no vírica, pero es opcionalmente un adenovirus híbrido o un herpesvirus híbrido que comprende los genes *rep/cap* de AAV.

55 En una realización particular, las secuencias de *rep/cap* de AAV y las secuencias auxiliares de adenovirus son suministradas por un solo vector auxiliar de adenovirus. Este vector contiene además el molde de rAAV. Las secuencias *rep/cap* de AAV y/o el molde de rAAV se pueden insertar en una región deleciónada (por ejemplo, las regiones E1a o E3) del adenovirus.

60 En una realización adicional, las secuencias de *rep/cap* de AAV y las secuencias auxiliares de adenovirus son suministradas por un solo vector auxiliar de adenovirus. El molde de rAAV se proporciona como un molde de plásmido.

65

En otra realización ilustrativa, las secuencias de *rep/cap* de AAV y las secuencias auxiliares de adenovirus se proporcionan mediante un único vector auxiliar de adenovirus, y el molde de rAAV se integra en la célula como un provirus. De manera alternativa, el molde de rAAV es proporcionado por un vector de EBV que se mantiene dentro de la célula como un elemento extracromosómico (por ejemplo, como un "episoma nuclear basado en EBV", véase Margolski, (1992) Curr. Top. Microbiol. Immun. 158:67).

En una realización ejemplar adicional, las secuencias *rep/cap* del AAV y las secuencias auxiliares de adenovirus las proporciona un único auxiliar de adenovirus. El molde de rAAV se proporciona como un vector vírico de replicación separado. Por ejemplo, el molde de rAAV puede ser proporcionado por una partícula de rAAV o una segunda partícula de adenovirus recombinante.

De acuerdo con los métodos anteriores, el vector de adenovirus híbrido comprende típicamente las secuencias de adenovirus 5' y 3' en *cis* suficientes para la replicación y el empaquetamiento de adenovirus (es decir, las repeticiones terminales de adenovirus y la secuencia PAC). Las secuencias *rep/cap* del AAV y, si está presente, el molde rAAV está embebido en la columna vertebral del adenovirus y está flanqueada por las secuencias 5' y 3' en *cis*, de modo que estas secuencias puedan empaquetarse en cápsides de adenovirus. Como se ha descrito anteriormente, en realizaciones representativas, las secuencias auxiliares de adenovirus y las secuencias *rep/cap* del AAV no están flanqueadas por las secuencias de empaquetamiento de AAV (por ejemplo, las ITR de AAV), de modo que estas secuencias no se empaquetan en los viriones de AAV.

También puede usarse el herpesvirus como virus auxiliar en métodos de empaquetado de AAV. Los herpesvirus híbridos que codifican la proteína o proteínas *rep* de AAV pueden facilitar de forma ventajosa esquemas de producción de vector de AAV más dimensionables. Se ha descrito un vector híbrido del virus herpes simple tipo I (HSV-1) que expresa los genes *rep* y *cap* del AAV-2 (Conway *et al.*, (1999) Gene Therapy 6:986 y el documento WO 00/17377).

Como alternativa adicional, los vectores de virus de la invención se pueden producir en células de insectos usando vectores de baculovirus para administrar los genes *rep/cap* y el molde de rAAV tal como lo describe Urabe *et al.*, (2002) Human Gene Therapy 13:1935-43.

Otros métodos de producción de AAV utilizan células de empaquetamiento transformadas de manera estable (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5.658.785).

Pueden obtenerse reservorios de vectores de AAV libres de virus auxiliares contaminantes mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el AAV y el virus auxiliar se pueden diferenciar fácilmente en función del tamaño. El AAV también se puede separar del virus auxiliar en función de la afinidad por un sustrato de heparina (Zolotukhin *et al.*, (1999) Gene Therapy 6:973). En realizaciones representativas, los virus auxiliares de replicación defectuosos eliminados se utilizan de modo que cualquier virus auxiliar contaminante no sea competente para la replicación. Como alternativa adicional, puede emplearse un auxiliar de adenovirus que carece de expresión génica tardía, ya que solo se requiere la expresión génica temprana de adenovirus para mediar el empaquetamiento del virus AAV. Se conocen en la técnica mutantes de adenovirus defectuosos para la expresión génica tardía (por ejemplo, mutantes de adenovirus ts100K y ts149).

Los métodos de empaquetamiento de la invención se pueden emplear para producir reservorios de partículas víricas con títulos elevados. En realizaciones particulares, el reservorio de virus tiene un título de al menos alrededor de 10^5 unidades transductoras (ut)/ml, al menos alrededor de 10^6 ut/ml, al menos alrededor de 10^7 ut/ml, al menos alrededor de 10^8 ut/ml, al menos alrededor de 10^9 ut/ml, o al menos alrededor de 10^{10} ut/ml.

La nueva proteína de la cápside y las estructuras de la cápside encuentran su uso para generar anticuerpos, por ejemplo, para uso diagnóstico o terapéutico o como reactivo de investigación. Por tanto, la divulgación también proporciona anticuerpos contra las nuevas proteínas de la cápside y cápsides de la invención.

El término "anticuerpo" o "anticuerpos" tal como se usa en el presente documento se refiere a todos los tipos de inmunoglobulinas, incluyendo IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal y puede ser de cualquier especie de origen, incluido (por ejemplo) ratón, rata, conejo, caballo, cabra, oveja o humano, o puede ser un anticuerpo quimérico. Véase, por ejemplo, Walker *et al.*, Mol. Immunol. 26, 403-11 (1989). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales recombinantes, por ejemplo, producidos de acuerdo con los métodos desvelados en la Patente de Estados Unidos N.º 4.474.893 o la Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567. Los anticuerpos también se pueden construir químicamente, por ejemplo, de acuerdo con el método desvelado en la Patente de Estados Unidos N.º 4.676.980.

Los fragmentos de anticuerpos incluidos dentro del alcance de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y fragmentos Fc, y los correspondientes fragmentos obtenidos a partir de anticuerpos distintos de IgG. Tales fragmentos se pueden producir mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ se pueden producir mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y se pueden generar los fragmentos Fab reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. De manera alternativa, Se pueden construir bibliotecas

de expresión de Fab para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos de Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse *et al.*, (1989) Science 254, 1275-1281).

Los anticuerpos policlonales se pueden producir inmunizando un animal adecuado (por ejemplo, conejo, cabra, etc.) con un antígeno al que se une un anticuerpo monoclonal de la diana, recolectando suero inmune del animal y separando los anticuerpos policlonales del suero inmune, de acuerdo con procedimientos conocidos.

Los anticuerpos monoclonales se pueden producir en una línea celular de hibridoma según la técnica de Kohler y Milstein, (1975) Nature 265, 495-97. Por ejemplo, se puede inyectar una solución que contenga el antígeno apropiado en un ratón y, después de un tiempo suficiente, se sacrificó el ratón y se obtuvieron las células del bazo. Las células del bazo se immortalizan luego fusionándolas con células de mieloma o con células de linfoma, típicamente en presencia de polietilenglicol, para producir células de hibridoma. A continuación, las células de hibridoma se cultivan en un medio adecuado y el sobrenadante se criba en busca de anticuerpos monoclonales que tengan la especificidad deseada. Los fragmentos de Fab monoclonales se pueden producir en *E. coli* mediante técnicas recombinantes conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, W. Huse, (1989) Science 246, 1275-81.

También pueden obtenerse anticuerpos específicos para un polipéptido diana mediante técnicas de presentación en fagos conocidas en la técnica.

Se pueden usar diversos inmunoensayos para el cribado para identificar anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Numerosos protocolos para ensayos de unión competitiva o inmunoradiométricos que usan anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidad establecida son bien conocidos en la técnica. Tales inmunoensayos implican típicamente la medición de la formación de complejos entre un antígeno y su anticuerpo específico (por ejemplo, formación de complejos antígeno/anticuerpo). Puede usarse un inmunoensayo de base monoclonal de dos sitios que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítomos que no interfieren, así como un ensayo de unión competitiva.

Los anticuerpos se pueden conjugar con un soporte sólido (por ejemplo, perlas, placas, portaobjetos o pocillos formados a partir de materiales como látex o poliestireno) de acuerdo con técnicas conocidas. Los anticuerpos también se pueden conjugar directa o indirectamente con grupos detectables tales como radiomarcadores (por ejemplo, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹³¹I), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina) y marcadores de fluorescencia (por ejemplo, fluoresceína) de acuerdo con técnicas conocidas. La determinación de la formación de un complejo anticuerpo/antígeno en los métodos descritos en el presente documento puede realizarse mediante la detección de, por ejemplo, precipitación, aglutinación, floculación, radiactividad, desarrollo o cambio de color, fluorescencia, luminiscencia, *etc.*, como se sabe bien en la técnica.

III. Métodos de uso de cápsides de AAV quiméricas.

La presente invención también se refiere a métodos para administrar secuencias de nucleótidos heterólogas en oligodendrocitos. Se pueden emplear los vectores de virus de la invención, por ejemplo, para administrar una secuencia de nucleótidos de interés a un oligodendrocito *in vitro*, por ejemplo, para producir un polipéptido o ácido nucleico *in vitro* o por terapia génica *ex vivo*. Los vectores son además útiles en un método de administración de una secuencia de nucleótidos a un sujeto que lo necesite, por ejemplo, para expresar un polipéptido o ácido nucleico terapéutico o inmunogénico. De esta manera, el polipéptido o ácido nucleico puede producirse de este modo *in vivo* en el sujeto. El sujeto puede necesitar el polipéptido o ácido nucleico porque el sujeto tiene una deficiencia del polipéptido, o porque la producción del polipéptido o ácido nucleico en el sujeto puede impartir algún efecto terapéutico, como método de tratamiento o de otro modo, y como se explica más adelante.

En realizaciones particulares, los vectores son útiles para expresar un polipéptido o ácido nucleico que proporciona un efecto beneficioso a los oligodendrocitos, por ejemplo, para promover el crecimiento y/o diferenciación de oligodendrocitos. La capacidad de dirigir vectores a oligodendrocitos puede ser particularmente útil para tratar enfermedades o trastornos que implican disfunción de oligodendrocitos y/o desmielinización de neuronas. En otras realizaciones, los vectores son útiles para expresar un polipéptido o ácido nucleico que proporciona un efecto beneficioso a las células cercanas a los oligodendrocitos (por ejemplo, neuronas).

Por tanto, un aspecto de la invención se refiere a un método para administrar un ácido nucleico de interés a un oligodendrocito *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto el oligodendrocito *in vitro* con la partícula de AAV de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de la partícula de AAV o formulación farmacéutica en un método para administrar un ácido nucleico de interés a un oligodendrocito en un sujeto mamífero, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de dicha partícula de AAV o formulación farmacéutica a un sujeto mamífero.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de la partícula de AAV o a la formulación farmacéutica en un método para tratar un trastorno asociado con la disfunción de oligodendrocitos en un sujeto que lo necesite,

comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha partícula de AAV al sujeto. En una realización, el trastorno asociado con la disfunción de los oligodendrocitos es una enfermedad desmielinizante. En una realización, el trastorno asociado con la disfunción de los oligodendrocitos es la esclerosis múltiple, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Krabbe, leucodistrofia metacromática, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Canavan, enfermedad de Alexander, leucodistrofia ortocromática, enfermedad de Zellweger, síndrome 18q, parálisis cerebral, lesión de la médula espinal, lesión cerebral traumática, ictus, fenilcetonuria o infección vírica, o cualquier otro trastorno conocido o que se encuentre asociado posteriormente con la disfunción de los oligodendrocitos. En otra realización, la partícula de AAV o la formulación farmacéutica se utilizan en métodos para tratar un trastorno que no está directamente asociado con la disfunción de oligodendrocitos pero que se beneficiaría de la expresión de un polipéptido o ácido nucleico heterólogo en oligodendrocitos además de o en lugar de la expresión en neuronas, astrocitos u otros tipos de células del SNC. Los ejemplos incluyen, sin limitación, trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington, tumores del SNC y otros trastornos del SNC.

Los trastornos del SNC incluyen, pero no se limitan a, trastornos del pensamiento y la cognición tales como esquizofrenia y delirio; trastornos amnésicos; trastornos del estado de ánimo, tales como trastornos afectivos y trastornos de ansiedad (incluido el trastorno de estrés postraumático, el trastorno de ansiedad por separación, mutismo selectivo, trastorno reactivo de la vinculación, trastorno del movimiento estereotipado, trastornos de pánico, agorafobia, fobias específicas, fobia social, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno por estrés agudo, trastorno de ansiedad generalizado, trastorno de ansiedad inducido por sustancias y/o trastorno de ansiedad no especificado de otra manera); trastornos del comportamiento social; trastornos del aprendizaje y la memoria, tales como trastornos del aprendizaje (por ejemplo, dislexia); trastornos de las habilidades motoras; trastornos de la comunicación (por ejemplo, tartamudeo); trastornos generalizados del desarrollo (por ejemplo, trastorno autista, trastorno de Rett, trastorno desintegrativo infantil, trastorno de Asperger y/o trastorno generalizado del desarrollo no especificado de otra manera) y demencia. Por consiguiente, el término "trastorno del sistema nervioso central" abarca los trastornos enumerados anteriormente, así como los trastornos depresivos (incluido el trastorno depresivo mayor, trastorno distímico, trastorno depresivo no especificado de otra manera, depresión posparto); trastorno afectivo estacional; manía; trastornos bipolares (incluido el trastorno bipolar I, el trastorno bipolar II, el trastorno ciclotímico, el trastorno bipolar no especificado de otra manera); trastornos por déficit de atención y de conducta disruptiva (incluido el trastorno por déficit de atención con trastorno de hiperactividad, trastorno de conducta, trastorno de oposición desafiante y/o trastorno de conducta disruptiva no especificado de otra manera); adicción a las drogas/abuso de sustancias (incluido el abuso de opiáceos, anfetaminas, alcohol, alucinógenos, cannabis, inhalantes, fenciclidina, sedantes, hipnóticos, ansiolíticos y/o cocaína); trastornos inducidos por el alcohol; trastornos inducidos por anfetaminas; trastornos inducidos por cafeína; trastornos inducidos por cannabis; trastornos inducidos por cocaína; trastornos inducidos por alucinógenos; trastornos inducidos por inhalantes; trastornos inducidos por la nicotina; trastornos inducidos por opioides; trastornos inducidos por fenciclidina; trastornos inducidos por sedantes, hipnóticos o ansiolíticos; agitación; apatía; psicosis; irritabilidad; desinhibición; trastorno esquizofreniforme; trastorno esquizoafectivo; trastorno delirante; trastorno psicótico breve, trastorno psicótico compartido; trastorno psicótico inducido por sustancias; trastorno psicótico no especificado de otra manera; trastornos unipolares, trastornos del estado de ánimo (por ejemplo, trastorno del estado de ánimo con características psicóticas); trastornos somatomorfos; trastornos facticios; trastornos disociativos; retraso mental; trastornos alimentarios y de la conducta alimentaria de la infancia o la primera infancia; trastornos alimentarios tales como la anorexia nerviosa, bulimia nerviosa y/o trastorno alimentario no especificado de otra manera; trastornos del sueño (por ejemplo, disomnias como insomnio primario, hipersomnia primaria, narcolepsia, trastorno del sueño relacionado con la respiración y trastorno del sueño del ritmo circadiano y/o parasomnias); trastornos del control de impulsos (por ejemplo, cleptomanía, piromanía, tricotilomanía, juego patológico y/o trastorno explosivo intermitente); trastornos de adaptación; trastornos de personalidad (por ejemplo, trastorno de personalidad paranoica, trastorno de personalidad esquizoide, trastorno de personalidad esquizotípico, trastorno de personalidad antisocial, trastorno de personalidad límite, trastorno de personalidad histriónica, trastorno de personalidad narcisista, trastorno de personalidad evasiva, trastorno de personalidad dependiente y/o trastorno de personalidad obsesivo-compulsivo); trastornos de tics (por ejemplo, trastorno de Tourette, trastorno crónico de tic motor o vocal, trastorno de tic transitorio y/o trastorno de tic no especificado de otra manera); trastornos de eliminación; y cualquier combinación de los anteriores, así como cualquier otro trastorno o grupo de trastornos descritos en el Manual diagnóstico y estadístico de trastornos mentales - Cuarta edición (DSM-IV; the American Psychiatric Association, Washington D.C., 1994). Los "trastornos del sistema nervioso central" también incluyen otras afecciones que implican al SNC, incluidos, entre otros, trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer, trastornos del movimiento involuntario tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y similares. Otros trastornos del SNC incluyen, entre otros, epilepsia, esclerosis múltiple, dolor neurogénico, dolor psicógeno y migrañas. En otras realizaciones, el trastorno del SNC abarca cualquier subconjunto de las enfermedades anteriores o excluye una o más de las afecciones anteriores. En realizaciones particulares, el término "trastorno del sistema nervioso central" no incluye tumores benignos y/o malignos del SNC.

En otro aspecto de la divulgación, la cápside quimérica de AAV y los vectores de la invención son vectores completamente o casi completamente desdirigidos que pueden modificarse adicionalmente a un perfil trópico deseable para dirigirse a uno o más órganos o tejidos periféricos tal como se describe a continuación. En este aspecto, la presente divulgación también se refiere a métodos para administrar secuencias de nucleótidos

heterólogas en una amplia gama de células, incluyendo células que se dividen y células que no se dividen. Los vectores de virus de la invención se pueden emplear para administrar una secuencia de nucleótidos de interés a una célula *in vitro*, por ejemplo, para producir un polipéptido *in vitro* o por terapia génica *ex vivo*. Los vectores son además útiles en un método de administración de una secuencia de nucleótidos a un sujeto que lo necesite, por ejemplo, para expresar un polipéptido o ácido nucleico terapéutico o inmunogénico. De esta manera, el polipéptido o ácido nucleico puede producirse de este modo *in vivo* en el sujeto. El sujeto puede necesitar el polipéptido o ácido nucleico porque el sujeto tiene una deficiencia del polipéptido, o porque la producción del polipéptido o ácido nucleico en el sujeto puede impartir algún efecto terapéutico, como método de tratamiento o de otro modo, y como se explica más adelante.

En general, los vectores de virus de la invención se pueden emplear para administrar cualquier ácido nucleico extraño con un efecto biológico para tratar o mejorar los síntomas asociados con cualquier trastorno relacionado con la expresión génica. Además, la partícula de AAV o la formulación farmacéutica se puede usar para tratar cualquier estado de enfermedad para el que sea beneficioso administrar un polipéptido terapéutico. Los estados de enfermedad ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa: fibrosis quística (proteína reguladora transmembrana de fibrosis quística) y otras enfermedades del pulmón, hemofilia A (factor VIII), hemofilia B (factor IX), talasemia (B-globina), anemia (eritropoyetina) y otros trastornos de la sangre, enfermedad de Alzheimer (GDF; neprilisina), esclerosis múltiple (interferón B), enfermedad de Parkinson (factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales [GDNF]), enfermedad de Huntington (ARN inhibidor que incluye, entre otros, ARNi como ARNip o ARNh_c, ARN antisentido o microARN para eliminar repeticiones), esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia (galanina, factores neurotróficos) y otros trastornos neurológicos, cáncer (endostatina, angiostatina, TRAIL, ligando FAS, citocinas que incluyen interferones; ARN inhibidor que incluye, entre otros, ARNi (como ARNip o ARNh_c), ARN antisentido y microARN, incluido ARN inhibidor contra VEGF, el producto del gen de resistencia a múltiples fármacos o un inmunógeno del cáncer), diabetes mellitus (insulina, PGC- α 1, GLP-1, propéptido de miostatina, transportador de glucosa 4), distrofias musculares que incluyen Duchenne y Becker (por ejemplo, la distrofina, mini-distrofina, microdistrofina, factor de crecimiento similar a la insulina I, un sarcoglicano [por ejemplo, α , β , γ], ARN inhibidor [por ejemplo, ARNi, ARN antisentido o microARN] contra miostatina o propéptido de miostatina, laminina-alfa2, proteína relacionada con la fukutina, miostatina negativa dominante, folistatina, receptor soluble de activina tipo II, polipéptidos antiinflamatorios tales como el mutante dominante Ikappa B, sarcospan, utrofina, mini-utrofina, ARN inhibidor [por ejemplo, ARNi, ARN antisentido o microARN] contra las uniones de corte y empalme en el gen de la distrofina para inducir la omisión de exón [véase, por ejemplo, el documento WO/2003/095647], ARN inhibidor (por ejemplo, ARNi, ARN antisentido o microARN] contra ARNnp de U7 para inducir la omisión de exón [véase, por ejemplo, el documento WO/2006/021724], y anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra miostatina o propéptido de miostatina), enfermedad de Gaucher (glucocerebrosidasa), enfermedad de Hurler (α -L-iduronidasa), deficiencia de adenosina desaminasa (adenosina desaminasa), enfermedades por almacenamiento de glucógeno (por ejemplo, enfermedad de Fabry [α -galactosidasa] y enfermedad de Pompe [α -glucosidasa del ácido lisosómico]) y otros defectos metabólicos que incluyen otros trastornos por almacenamiento lisosómico y trastornos por almacenamiento de glucógeno, enfisema congénito (α 1-antitripsina), síndrome de Lesch-Nyhan (hipoxantina guanina fosforribosil transferasa), enfermedad de Niemann-Pick (esfingomielinasa), enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce (cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada), enfermedades degenerativas de la retina (y otras enfermedades del ojo y la retina; por ejemplo, PDGF, endostatina y/o angiostatina para la degeneración macular), enfermedades de órganos sólidos como el cerebro (incluida la enfermedad de Parkinson [GDNF], astrocitomas [endostatina, angiostatina y/o ARNi contra VEGF], glioblastomas [endostatina, angiostatina y/o ARNi contra VEGF]), hígado (ARNi como ARNip o ARNh_c, microARN o ARN antisentido para los genes de hepatitis B y/o hepatitis C), riñón, corazón, incluida insuficiencia cardíaca congestiva o enfermedad arterial periférica (EAP) (por ejemplo, mediante la administración del inhibidor de la proteína fosfatasa I [I-1], fosfolambán, endorretículo sarcoplásmico Ca²⁺-ATPasa [serca2a], proteínas de dedos de zinc que regulan el gen del fosfolambán, Pim-1, PGC-1 α , SOD-1, SOD-2, ECF-SOD, calicreína, timosina- β 4, factor de transcripción inducible por hipoxia [HIF], β arkct, receptor β 2-adrenérgico, receptor quinasa β 2-adrenérgico [β ARK], fosfoinosítido-3 quinasa [PI3 quinasa], calsarcina, un factor angiogénico, S100A1, parvalbúmina, adenilil ciclasa tipo 6, una molécula que afecta al receptor de quinasa de tipo 2 acoplado a proteína G, como un bARKct constitutivamente activo truncado, un ARN inhibidor [por ejemplo, ARNi, ARN antisentido o microARN] contra fosfolambán; moléculas inhibitoras de fosfolambán o dominantes-negativas como fosfolambán S16E, etc.), artritis (factores de crecimiento similares a la insulina), trastornos de las articulaciones (factores de crecimiento similares a la insulina), hiperplasia de la íntima (por ejemplo, mediante administración de enos, inos), mejorar la supervivencia de los trasplantes de corazón (superóxido dismutasa), SIDA (CD4 soluble), atrofia muscular (factor de crecimiento similar a la insulina I, propéptido de miostatina, un factor antiapoptótico, folistatina), isquemia de las extremidades (VEGF, FGF, PGC-1 α , EC-SOD, HIF), deficiencia renal (eritropoyetina), anemia (eritropoyetina), artritis (factores antiinflamatorios como IRAP y receptor soluble de TNF α), hepatitis (α -interferón), deficiencia del receptor de LDL (receptor de LDL), hiperamonemia (ornitina transcarbamilasa), ataxias cerebrales espinales incluyendo SCA1, SCA2 y SCA3, fenilcetonuria (fenilalanina hidroxilasa), enfermedades autoinmunes y similares. La partícula de AAV o la formulación farmacéutica se puede usar adicionalmente después del trasplante de órganos para aumentar el éxito del trasplante y/o para reducir los efectos secundarios negativos del trasplante de órganos o terapias complementarias (por ejemplo, mediante la administración de agentes inmunosupresores o ácidos nucleicos inhibidores para bloquear la producción de citocina). Como ejemplo adicional, las proteínas morfogénicas óseas (incluyendo RANKL y/o VEGF) se pueden administrar con un aloinjerto óseo, por ejemplo, después de una rotura o extirpación quirúrgica en un paciente con cáncer.

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico ejemplares que pueden tratarse de acuerdo con la presente divulgación incluyen, sin limitación: síndrome de Hurler (MPS IH), síndrome de Scheie (MPS IS) y el síndrome de Hurler-Scheie (MPS IH/S) (α -L-iduronidasa); síndrome de Hunter (MPS II) (iduronato sulfato sulfatasa); síndrome de Sanfilippo A (MPS IIIA) (Heparán-S-sulfato sulfaminidasa), síndrome de Sanfilippo B (MPS IIIB) (*N*-acetil-D-glucosaminidasa), síndrome de Sanfilippo C (MPS IIIC) (Acetil-CoA-glucosaminidasa *N*-acetiltransferasa), síndrome de Sanfilippo D (MPS IIID) (*N*-acetil-glucosaminidasa-6-sulfato sulfatasa); enfermedad de Morquio A (MPS IVA) (galactosamina-6-sulfato sulfatasa), enfermedad de Morquio B (MPS IV B) (β -galactosidasa); enfermedad de Maroteaux-Lmay (MPS VI) (arilsulfatasa B); síndrome de Sly (MPS VII) (β -glucuronidasa); deficiencia de hialuronidasa (MPS IX) (hialuronidasa); sialidosis (mucopolidosis I), mucopolidosis II (enfermedad de células I) (subunidad catalítica de *N*-actilglucos-aminil-1-fosfotransferasa), mucopolidosis III (pseudopolidistofia de Hurler) (*N*-actilglucos-aminil-1-fosfotransferasa; tipo IIIA [subunidad catalítica] y tipo IIIC [subunidad de reconocimiento de sustrato]); gangliosidosis GM1 (gangliósido β -galactosidasa), gangliosidosis GM2 tipo I (enfermedad de Tay-Sachs) (β -hexaminidasa A), gangliosidosis GM2 de tipo II (enfermedad de Sandhoff) (β -hexosaminidasa B); enfermedad de Niemann-Pick (tipos A y B) (esfingomielinasa); enfermedad de Gaucher (glucocerebrosidasa); enfermedad de Farber (ceraminidasa); enfermedad de Fabry (α -galactosidasa A); enfermedad de Krabbe (galactosilceramida β -galactosidasa); leucodistofia metacromática (arilsulfatasa A); deficiencia de lipasa ácida lisosómica, incluida la enfermedad de Wolman (lipasa ácida lisosómica); enfermedad de Batten (lipofuscinosis ceroides neuronal juvenil) (proteína CLN3 transmembrana lisosómica) sialidosis (neuraminidasa 1); galactosialidosis (síndrome de Goldberg) (proteína protectora/catepsina A); α -manosidosis (a-D-manosidasa); β -manosidosis (β -D-manosidosis); fucosidosis (a-D-fucosidasa); aspartilglucosaminuria (*N*-Aspartilglucosaminidasa); y sialuria (cotransportador de fosfato de sodio).

Las enfermedades ejemplares por almacenamiento de glucógeno que se pueden tratar de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, GSD tipo Ia (enfermedad de von Gierke) (glucosa-6-fosfatasa), GSD de tipo Ib (translocasa de glucosa-6-fosfato), GSD de tipo Ic (transportador de fosfato o pirofosfato microsomal), GSD de tipo Id (transportador de glucosa microsomal), GSD de tipo II, incluida la enfermedad de Pompe o GSD infantil de tipo IIa (α -glucosidasa del ácido lisosomal) y de tipo IIb (Danon) (proteína 2 de la membrana lisosomal), GSD de tipo IIIa y IIIb (enzima desramificante; amiloglucosidasa y oligoglucanotransferasa), GSD de tipo IV (enfermedad de Andersen) (enzima ramificadora), GSD de tipo V (enfermedad de McArdle) (fosforilasa muscular), GSD de tipo VI (enfermedad de Hers) (fosforilasa hepática), GSD de tipo VII (enfermedad de Tarui) (fosfofructoquinasa), GSD de Tipo VIII/IXa (fosforilasa quinasa ligada a X), GSD tipo IXb (fosforilasa quinasa de hígado y músculo), GSD de tipo IXc (fosforilasa quinasa hepática), GSD de tipo IXd (fosforilasa quinasa muscular), GSD O (glucógeno sintasa), síndrome de Fanconi-Bickel (transportador de glucosa-2), deficiencia de fosfoglucoisomerasa, deficiencia de fosfoglicerato quinasa muscular, deficiencia de fosfoglicerato mutasa, deficiencia de fructosa 1,6-difosfatasa, deficiencia de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y deficiencia de lactato deshidrogenasa.

Los ácidos nucleicos y polipéptidos que se pueden administrar al músculo cardíaco incluyen aquellos que son beneficiosos en el tratamiento de lesiones, músculo cardíaco degenerado o atrofiado y/o defectos cardíacos congénitos. Por ejemplo, los factores angiogénicos útiles para facilitar la vascularización en el tratamiento de enfermedades cardíacas incluyen, entre otros, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), VEGF II, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF₁₂₁, VEGF₁₃₈, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, factor inducible por hipoxia 1 α (HIF 1 α), NO sintasa endotelial (eNOS), iNOS, VEGFR-1 (Flt1), VEGFR-2 (KDR/Flk1), VEGFR-3 (Flt4), angiogenina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), angiopoyetina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor angiogénico, factor de crecimiento transformante- α (TGF- α), factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), factor de permeabilidad vascular (VPF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-3 (IL-3), interleucina-8 (IL-8), factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-EGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de dispersión (SF), pleiotrofina, proliferina, folistatina, factor de crecimiento placentario (PIGF), midquina, factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF), fractalquina, ICAM-1, angiopoyetina-1 y -2 (Ang1 y Ang2), Tie-2, neuropilina-1, ICAM-1, quimiocinas y citocinas que estimulan las células del músculo liso, migración de monocitos o leucocitos, péptidos y proteínas antiapoptóticos, factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), FGF-1, FGF-1b, FGF-1c, FGF-2, FGF-2b, FGF-2c, FGF-3, FGF-3b, FGF-3c, FGF-4, FGF-5, FGF-7, FGF-9, FGF ácido, FGF básico, proteína quimiotáctica de monocitos 1, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1), IGF-2, factor de respuesta de crecimiento temprano-1 (EGR-1), ETS-1, calcireína de tejido humano (HK), metaloproteínasa de matriz, quimasa, activador de plasminógeno de tipo uroquinasa y heparinasa. (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 20060287259 y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 20070059288).

La cardiopatía congénita más común encontrada en adultos es la válvula aórtica bicúspide, mientras que la comunicación interauricular es responsable del 30-40 % de las cardiopatías congénitas observadas en adultos. El defecto cardíaco congénito más común observado en la población pediátrica es el defecto del tabique ventricular. Otras cardiopatías congénitas incluyen el síndrome de Eisenmenger, conducto arterioso persistente, estenosis pulmonar, coartación de la aorta, transposición de las grandes arterias, atresia tricúspide, corazón univentricular, anomalía de Ebstein y ventrículo derecho de doble salida. Varios estudios han identificado supuestos loci genéticos asociados con una o más de estas cardiopatías congénitas. Por ejemplo, el(los) gen(es) putativo(s) de la cardiopatía congénita asociada con el síndrome de Down es 21q22.2-q22.3, entre ETS2 y MX1. De forma similar, la mayoría de

los casos de síndrome de DiGeorge son el resultado de una delección del cromosoma 22q11.2 (la región cromosómica del síndrome de DiGeorge o DGCR). Varios genes se pierden en esta delección, incluido el supuesto factor de transcripción TUPLE 1. Esta delección está asociada con una variedad de fenotipos, por ejemplo, síndrome de Shprintzen; cara de anomalía conotruncal (o síndrome de Takao); y defectos aislados del tracto de salida del corazón, incluida la tetralogía de Fallot, tronco arterioso y arco aórtico interrumpido. Todos los trastornos anteriores se pueden tratar de acuerdo con la presente divulgación.

También se cree que otras enfermedades importantes del corazón y del sistema vascular tienen un componente etiológico genético, típicamente poligénico. Estas enfermedades incluyen, por ejemplo, síndrome del corazón izquierdo hipoplásico, displasia valvular cardíaca, síndrome cardiocraneal de Pfeiffer, síndrome oculofaciocardiodental, síndrome de Kapur-Toriello, síndrome de Sonoda, síndrome de Ohdo Blefarofimosis, síndrome de corazón-mano, síndrome de Pierre-Robin, enfermedad de Hirschsprung, síndrome de Kousseff, síndrome arterial oclusivo de Grange, síndrome de Kearns-Sayre, síndrome de Kartagener, síndrome de Alagille, síndrome de Ritscher-Schinzel, síndrome de Ivemark, síndrome de Young-Simpson, hemocromatosis, síndrome de Holzgreve, síndrome de Barth, síndrome de Smith-Lemli-Opitz, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, enfermedad similar a Gaucher, enfermedad de Fabry, síndrome de Lowry-Maclean, síndrome de Rett, síndrome de Opitz, síndrome de Marfan, síndrome de lisencefalia de Miller-Dieker, mucopolisacaridosis, síndrome de Bruada, disostosis humeroespinal, síndrome de Phaver, síndrome de McDonough, síndrome de hipermovilidad marfanoide, atranferrinemia, síndrome de Cornelia de Lange, síndrome Leopard, anemia de Diamond-Blackfan, síndrome de Steinfeld, progeria y síndrome de Williams-Beuren. Todos estos trastornos se pueden tratar de acuerdo con la presente divulgación.

Los factores antiapoptóticos se pueden administrar al músculo esquelético, músculo diafragma y/o músculo cardíaco para tratar enfermedades de desgaste muscular, isquemia de extremidades, infarto cardíaco, insuficiencia cardíaca, enfermedad de las arterias coronarias y/o diabetes tipo I o tipo II.

Los ácidos nucleicos que pueden administrarse al músculo esquelético incluyen aquellos que son beneficiosos en el tratamiento del músculo esquelético dañado, degenerado y/o atrofiado. Los defectos genéticos que causan la distrofia muscular son conocidos para muchas formas de la enfermedad. Estos genes defectuosos no pueden producir un producto proteico, producir un producto proteico que no funciona correctamente, o producir un producto proteico disfuncional que interfiere con el correcto funcionamiento de la célula. El ácido nucleico heterólogo puede codificar una proteína terapéuticamente funcional o un polinucleótido que inhibe la producción o actividad de una proteína disfuncional. Los polipéptidos que pueden expresarse a partir de ácidos nucleicos administrados o inhibidos por ácidos nucleicos administrados (por ejemplo, administrando ARNi, microARN o ARN antisentido), incluyen, sin limitación, distrofina, una minidistrofina o una microdistrofina (MD de Duchene y Becker); las glucoproteínas asociadas a distrofina β -sarcoglicano (MD 2E de cintura de extremidades), δ -sarcoglicano (MD 2 2F de cintura de extremidades), α -sarcoglicano (MD 2D de cintura de extremidades) y γ -sarcoglicano (MD 2C de cintura de extremidades), utrofina, calpaína (DM autosómica recesiva de cinturas de miembros tipo 2A), caveolina-3 (DM autosómica dominante de cinturas de miembros), laminina-alfa2 (DM congénita deficiente en merosina), miniagrina (DM congénita deficiente en laminina-alfa2), fukutina (MD congénito tipo Fukuyama), emerina (Emery-Dreifuss MD), miotilina, lamina A/C, calpaína-3, disferlina y/o teletonina. Además, el ácido nucleico heterólogo puede codificar mir-1, mir-133, mir-206, mir-208 o un ARN antisentido, ARNi (por ejemplo, ARNip o ARNhc) o microARN para inducir la omisión de exón en un gen de distrofina defectuoso.

En realizaciones particulares, el ácido nucleico se administra al músculo de la lengua (por ejemplo, para tratar la lengua distrófica). Los métodos de administración en la lengua pueden ser mediante cualquier método conocido en la técnica, incluida la inyección directa, administración oral, administración tópica en la lengua, administración intravenosa, administración intraarticular y similares.

Las proteínas anteriores también se pueden administrar al músculo del diafragma para tratar la distrofia muscular.

De manera alternativa, se puede administrar un vector de transferencia génica que codifique cualquier otro polipéptido terapéutico.

En realizaciones particulares, un vector de virus de acuerdo con la presente invención se usa en un método para administrar un ácido nucleico de interés como se describe en el presente documento al músculo esquelético, músculo diafragma y/o músculo cardíaco, por ejemplo, para tratar un trastorno asociado con uno o más de estos tejidos, como la distrofia muscular, enfermedad cardíaca (incluida PAD e insuficiencia cardíaca congestiva) y similares.

La transferencia génica tiene un posible uso sustancial para comprender y proporcionar terapia para estados patológicos. Hay una serie de enfermedades hereditarias en las que se conocen genes defectuosos y se han clonado. En general, los estados de enfermedad anteriores se dividen en dos clases: estados de deficiencia, generalmente de enzimas, que generalmente se heredan de manera recesiva, y estados desequilibrados, que pueden involucrar proteínas reguladoras o estructurales, y que típicamente se heredan de manera dominante. Para enfermedades en estado de deficiencia, la transferencia de genes se puede utilizar para llevar un gen normal a los

tejidos afectados para la terapia de reemplazo, así como para crear modelos animales para la enfermedad usando ARN inhibidor como ARNi (por ejemplo, ARNip o ARNhc), microARN o ARN antisentido. Para estados de enfermedad desequilibrados, la transferencia de genes se puede utilizar para crear un estado de enfermedad en un sistema modelo, que luego se puede utilizar en los esfuerzos para contrarrestar el estado de enfermedad. Por tanto, los vectores de virus según la presente invención permiten el tratamiento de enfermedades genéticas. Como se usa en el presente documento, un estado de enfermedad se trata remediando parcial o totalmente la deficiencia o el desequilibrio que causa la enfermedad o la agrava. También es posible el uso de recombinación específica de sitio de secuencias nucleicas para provocar mutaciones o corregir defectos.

Los vectores de virus de acuerdo con la presente invención también se pueden emplear para proporcionar un ácido nucleico antisentido o ARN inhibidor (por ejemplo, microARN o ARNi tal como ARNip o ARNhc) a una célula *in vitro* o *in vivo*. La expresión del ARN inhibidor en la célula diana disminuye la expresión de una proteína particular por la célula. Por consiguiente, se puede administrar ARN inhibidor para disminuir la expresión de una proteína particular en un sujeto que lo necesite. También se puede administrar ARN inhibidor a las células *in vitro* para regular la fisiología celular, por ejemplo, para optimizar los sistemas de cultivo de células o tejidos.

Como aspecto adicional, los vectores de virus de la presente invención se pueden usar para producir una respuesta inmune en un sujeto. De acuerdo con la presente realización, se puede administrar a un sujeto un vector de virus que comprende un ácido nucleico que codifica un inmunógeno, y el sujeto monta una respuesta inmune activa (opcionalmente, una respuesta inmune protectora) contra el inmunógeno. Los inmunógenos son tal como se describe anteriormente en el presente documento.

De manera alternativa, el vector vírico se puede administrar a una célula *ex vivo* y la célula alterada se administra al sujeto. El ácido nucleico heterólogo se introduce en la célula y la célula se administra al sujeto, donde el ácido nucleico heterólogo que codifica el inmunógeno se expresa opcionalmente e induce una respuesta inmune en el sujeto contra el inmunógeno. En realizaciones particulares, la célula es una célula presentadora de antígenos (por ejemplo, una célula dendrítica).

Una "respuesta inmune activa" o "inmunidad activa" se caracteriza por la "participación de los tejidos y células del hospedador después de un encuentro con el inmunógeno. Implica la diferenciación y proliferación de células inmunocompetentes en tejidos linforreticulares, que conducen a la síntesis de anticuerpos o al desarrollo de reactividad mediada por células, o ambos". Herbert B. Herscovitz, Immunophysiology: Cell Function and Cellular Interactions in Antibody Formation, en IMMUNOLOGY: BASIC PROCESSES 117 (Joseph A. Bellanti ed., 1985). Como alternativa, se establece que, el hospedador genera una respuesta inmunitaria activa después de la exposición a inmunógenos por infección o por vacunación. La inmunidad activa se puede contrastar con la inmunidad pasiva, que se adquiere mediante la "transferencia de sustancias preformadas (anticuerpos, factor de transferencia, injerto tímico, interleucina-2) de un hospedador inmunizado activamente a un hospedador no inmunizado". *Id.*

Una respuesta inmune "protectora" o inmunidad "protectora" como se usa en el presente documento indica que la respuesta inmunitaria confiere algún beneficio al sujeto porque previene o reduce la incidencia de la enfermedad. De manera alternativa, una respuesta inmunitaria protectora o inmunidad protectora puede ser útil en el tratamiento de enfermedades, en particular cáncer o tumores (por ejemplo, provocando la regresión de un cáncer o tumor y/o previniendo la metástasis y/o previniendo el crecimiento de nódulos metastásicos). Los efectos protectores pueden ser completos o parciales, siempre que los beneficios del tratamiento superen cualquier desventaja del mismo.

Los vectores víricos de la presente invención también se pueden administrar para inmunoterapia contra el cáncer mediante la administración de un vector vírico que exprese un antígeno de célula cancerosa (o una molécula inmunológicamente similar) o cualquier otro inmunógeno que produzca una respuesta inmune contra una célula cancerosa. Para ilustración, se puede producir una respuesta inmune contra un antígeno de células cancerosas en un sujeto mediante la administración de un vector vírico que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica el antígeno de células cancerosas, por ejemplo, para tratar a un paciente con cáncer. El vector de virus se puede administrar a un sujeto *in vivo* o usando métodos *ex vivo*, tal como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" abarca los cánceres formadores de tumores. Del mismo modo, la expresión "tejido canceroso" incluye tumores. Un "antígeno de células cancerosas" abarca los antígenos tumorales.

El término "cáncer" tiene su significado entendido en la técnica, por ejemplo, un crecimiento incontrolado de tejido que tiene el potencial de extenderse a sitios distantes del cuerpo (por ejemplo, metastatizar). Los cánceres ejemplares incluyen, pero sin limitación, leucemia, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin), cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de testículos, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de cerebro (por ejemplo, gliomas y glioblastoma), cáncer de huesos, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de tiroides y similares. Según la divulgación, la partícula de AAV o la formulación farmacéutica se usa en métodos para tratar y/o prevenir cánceres formadores de tumores.

El término "tumor" también se entiende en la técnica, por ejemplo, como una masa anómala de células indiferenciadas dentro de un organismo multicelular. Los tumores pueden ser malignos o benignos. En realizaciones representativas, los métodos desvelados en el presente documento se utilizan para prevenir y tratar tumores malignos.

Los antígenos de células cancerosas se han descrito anteriormente en el presente documento. Con las expresiones "tratar el cáncer" o "tratamiento del cáncer", se pretende que la gravedad del cáncer se reduzca o que el cáncer se prevenga o al menos se elimine parcialmente. Por ejemplo, en contextos particulares, estas expresiones indican que la metástasis del cáncer se previene o reduce o al menos se elimina parcialmente. En otras realizaciones representativas, estas expresiones indican que el crecimiento de nódulos metastásicos (por ejemplo, después de la extirpación quirúrgica de un tumor primario) se previene o reduce o al menos se elimina parcialmente. Con las expresiones "prevenir el cáncer" o "prevención del cáncer" se pretende que los métodos eliminen o reduzcan al menos parcialmente la incidencia o aparición del cáncer. Como alternativa, se establece que, la aparición o progresión del cáncer en el sujeto puede ralentizarse, controlarse, reducirse en posibilidad o probabilidad, o retrasarse.

En ejemplos particulares, las células pueden extraerse de un sujeto con cáncer y ponerse en contacto con un vector de virus de acuerdo con la presente invención. A continuación, se administra la célula modificada al sujeto, por lo que se provoca una respuesta inmune contra el antígeno de la célula cancerosa. Este método se emplea de manera particularmente ventajosa con sujetos inmunodeprimidos que no pueden generar una respuesta inmunitaria suficiente *in vivo* (es decir, no pueden producir anticuerpos potenciadores en cantidades suficientes).

Se sabe en la técnica que las respuestas inmunitarias pueden potenciarse mediante citocinas inmunomoduladoras (por ejemplo, α -interferón, β -Interferón, γ -interferón, ω -interferón, τ -interferón, interleucina-1a, interleucina-1 β , interleucina-2, interleucina-3, interleucina-4, interleucina 5, interleucina-6, interleucina-7, interleucina-8, interleucina-9, interleucina-10, interleucina-11, interleucina 12, interleucina-13, interleucina-14, interleucina-18, factor de crecimiento de linfocitos B, ligando CD40, factor de necrosis tumoral α , factor de necrosis tumoral β , proteína 1 quimioatrayente de monocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos y linfoxina). Por consiguiente, las citocinas inmunomoduladoras (por ejemplo, citocinas inductoras de CTL) se pueden administrar a un sujeto junto con los vectores de virus.

Las citocinas se pueden administrar mediante cualquier método conocido en la técnica. Se pueden administrar al sujeto citocinas exógenas o, como alternativa, al sujeto se le puede administrar una secuencia de nucleótidos que codifica una citocina usando un vector adecuado, y la citocina producida *in vivo*.

Los vectores víricos son además útiles para dirigirse a oligodendrocitos con fines de investigación, por ejemplo, para el estudio de la función del SNC *in vitro* o en animales o para su uso en la creación y/o estudio de modelos animales de enfermedad. Por ejemplo, los vectores se pueden usar para administrar ácidos nucleicos heterólogos a oligodendrocitos en modelos animales de enfermedades desmielinizantes. La desmielinización se puede inducir en animales por diversos medios, incluyendo, sin limitación, la administración de virus (por ejemplo, Virus Semliki, virus de la hepatitis murina o virus de la encefalomiелitis murina de Theiler) y administración de productos químicos (por ejemplo, cuprizona, bromuro de etidio o lisolectina). En algunas realizaciones, el vector también puede usarse en modelos animales de encefalomiелitis autoinmune experimental. Esta afección puede ser inducida por, por ejemplo, administración de kainita, SIN-1, antigalactocerebrósido o irradiación. En otras realizaciones, el vector vírico se puede usar para administrar específicamente a los oligodendrocitos un agente tóxico o una enzima que produce un agente tóxico (por ejemplo, timidina quinasa) con el fin de destruir algunas o todas las células.

Además, los vectores de virus de acuerdo con la presente invención encuentran un uso adicional en métodos de diagnóstico y cribado, en el que un gen de interés se expresa de forma transitoria o estable en un sistema de cultivo celular o, como alternativa, un modelo animal transgénico. La partícula de AAV o la formulación farmacéutica también se puede utilizar en métodos para administrar un ácido nucleico con el fin de producir proteínas, por ejemplo, para fines de laboratorio, industriales o comerciales.

Los vectores de virus recombinantes de acuerdo con la presente divulgación encuentran uso en aplicaciones tanto veterinarias como médicas. Los sujetos adecuados incluyen tanto aves como mamíferos. El término "aviar" tal y como se usa en el presente documento, incluye, pero no se limita a, pollos, patos, gansos, codornices, pavos, faisanes, loros, periquitos. El término "mamífero" tal y como se usa en el presente documento, incluye, pero no se limita a, seres humanos, primates, primates no humanos (por ejemplo, monos y babuinos), ganado bovino, ovejas, cabras, cerdos, caballos, gatos, perros, conejos, roedores (por ejemplo, ratas, ratones, hámsteres y similares), etc. Los sujetos humanos incluyen neonatos, bebés, jóvenes y adultos. Opcionalmente, el sujeto "necesita" los métodos de la presente divulgación, por ejemplo, porque el sujeto tiene o se cree que corre riesgo de padecer un trastorno que incluye los descritos en el presente documento o que se beneficiaría de la administración de un ácido nucleico que incluye los descritos en el presente documento. Por ejemplo, en ejemplos particulares, el sujeto tiene (o ha tenido) o está en riesgo de sufrir un trastorno desmielinizante o una lesión de la médula espinal o del cerebro. Como una opción adicional, el sujeto puede ser un animal de laboratorio y/o un modelo animal de enfermedad.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector de virus de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, agentes estabilizantes, tampones, vehículos, adyuvantes, diluyentes, etc. Para la inyección, el vehículo típicamente será un líquido. Para otros métodos de administración, el vehículo puede ser sólido o líquido. Para la administración por inhalación, el vehículo será respirable y, preferentemente, estará en forma de partículas sólidas o líquidas.

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es tóxico o indeseable de otra manera, es decir, el material puede administrarse a un sujeto sin producir ningún efecto biológico indeseable.

Un aspecto de la presente invención es un método para transferir una secuencia de nucleótidos a una célula *in vitro*. El vector del virus se puede introducir a las células a la multiplicidad de infección apropiada de acuerdo con métodos de transducción convencionales apropiados para las células diana particulares. Los títulos del vector o cápside del virus a administrar pueden variar, dependiendo del tipo de célula diana y del número, vector o cápside de virus, y pueden determinarse por los expertos en la materia sin experimentación excesiva. En realizaciones particulares, al menos alrededor de 10^3 unidades infecciosas, más preferiblemente al menos alrededor de 10^5 unidades infecciosas se introducen en la célula.

La(s) célula(s) en la(s) que se puede introducir el vector vírico pueden ser de cualquier tipo, incluidas, entre otras, células neurales (incluidas células de los sistemas nerviosos periférico y central, en particular, células del cerebro tales como las neuronas, los oligodendrocitos, células de la glía, astrocitos), células pulmonares, células del ojo (incluidas las células de la retina, epitelio pigmentario retiniano y células corneales), células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales intestinales y respiratorias), células del músculo esquelético (incluidos mioblastos, miotubos y miofibras), células del músculo del diafragma, células dendríticas, células pancreáticas (incluidas las células de los islotes), células hepáticas, una célula del tracto gastrointestinal (incluidas las células del músculo liso, las células epiteliales), células del corazón (incluidos cardiomiocitos), células óseas (por ejemplo, células madre de la médula ósea), células madre hematopoyéticas, células del bazo, queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, células de próstata, células articulares (incluyendo, por ejemplo, cartílago, menisco, sinovio y médula ósea), células germinales y similares. De manera alternativa, la célula puede ser cualquier célula progenitora. Como alternativa adicional, la célula puede ser una célula madre (por ejemplo, células madre neuronal, célula madre del hígado). Como otra alternativa más, la célula puede ser una célula cancerosa o tumoral (los cánceres y tumores se describen anteriormente). Además, las células pueden ser de cualquier especie de origen, como se ha indicado anteriormente.

Los vectores de virus se pueden introducir en las células *in vitro* con el fin de administrar la célula modificada a un sujeto. En realizaciones particulares, las células se han eliminado de un sujeto, se introduce el vector de virus en su interior y después las células se vuelven a colocar en el sujeto. Los métodos de extracción de células del sujeto para tratamiento *ex vivo*, seguido de una introducción de nuevo al sujeto son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5.399.346). De manera alternativa, el vector de virus recombinante se introduce en células de otro sujeto, en células cultivadas o en células de cualquier otra fuente adecuada, y las células se administran a un sujeto que lo necesita.

Las células adecuadas para la terapia génica *ex vivo* son como se describió anteriormente. Las dosis de las células para administrar a un sujeto variarán según la edad, la condición y especie del sujeto, el tipo de célula, el ácido nucleico expresado por la célula, el modo de administración y similares. Normalmente, al menos alrededor de 10^2 a aproximadamente 10^8 o alrededor de 10^3 a aproximadamente 10^6 células se administrarán por dosis en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En realizaciones particulares, las células transducidas con el vector vírico se administran al sujeto en una cantidad eficaz en combinación con un vehículo farmacéutico.

En algunas realizaciones, las células que se han transducido con el vector de virus se pueden administrar para provocar una respuesta inmunogénica contra el polipéptido administrado (por ejemplo, expresado como un transgén o en la cápside). Normalmente, se administra una cantidad de células que expresan una cantidad eficaz del polipéptido en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la dosis es suficiente para producir una respuesta inmunitaria protectora (tal como se define anteriormente). El grado de protección conferido no tiene por qué ser completo ni permanente, siempre que los beneficios de administrar el polipéptido inmunogénico superen cualquier desventaja del mismo.

Un aspecto adicional de la divulgación es un método para administrar los vectores de virus o las cápsides de la invención a sujetos. En realizaciones particulares, el método comprende un método para administrar un ácido nucleico de interés a un sujeto animal, comprendiendo el método: administrar una cantidad eficaz de un vector de virus según la invención a un sujeto animal. La administración de los vectores de virus de la presente invención a un sujeto humano o un animal que lo necesite puede realizarse por cualquier medio conocido en la técnica. Opcionalmente, el vector de virus se administra en una dosis eficaz en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los vectores de virus de la invención se pueden administrar además a un sujeto para provocar una respuesta inmunogénica (por ejemplo, como una vacuna). Normalmente, las vacunas de la presente invención comprenden

una cantidad eficaz de virus en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la dosis es suficiente para producir una respuesta inmunitaria protectora (tal como se define anteriormente). El grado de protección conferido no tiene por qué ser completo ni permanente, siempre que los beneficios de administrar el polipéptido inmunogénico superen cualquier desventaja del mismo. Los sujetos e inmunógenos son como se describió anteriormente.

Las dosis de los vectores de virus a administrar a un sujeto dependerán del modo de administración, la enfermedad o afección a tratar, el estado del sujeto individual, el vector vírico particular y el ácido nucleico a liberar, y puede determinarse de una manera rutinaria. Las dosis ejemplares para conseguir efectos terapéuticos son títulos de virus de al menos aproximadamente 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^3 , 10^{14} , 10^{15} unidades de transducción o más, preferentemente alrededor de 10^7 o 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} o 10^{14} unidades transductoras, aún más preferentemente de 10^{12} unidades de transducción.

En realizaciones particulares, se puede emplear más de una administración (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más administraciones) para lograr el nivel deseado de expresión génica durante un período de varios intervalos, por ejemplo, diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente, etc.

Los modos de administración ejemplares incluyen oral, rectal, transmucosal, tópica, intranasal, por inhalación (por ejemplo, a través de un aerosol), bucal (por ejemplo, sublingual), vaginal, intratecal, intraocular, transdérmica, *en el útero* (o *en ovo*), parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramuscular [incluida la administración al esqueleto, diafragma y/o músculo cardíaco], intradérmica, intrapleural, intracerebral e intraarticular), tópica (por ejemplo, para la piel y las superficies mucosas, incluidas las superficies de las vías respiratorias y la administración transdérmica), introlinfático y similares, así como la inyección directa en un tejido u órgano (por ejemplo, al hígado, músculo esquelético, músculo cardíaco, músculo diafragma o cerebro). La administración también puede ser a un tumor (por ejemplo, en o cerca de un tumor o un ganglio linfático). La ruta más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección que se esté tratando y de la naturaleza del vector particular que se esté utilizando.

En algunas realizaciones, el vector vírico se administra directamente al SNC, por ejemplo, el cerebro o la médula espinal. La administración directa puede resultar en una alta especificidad de transducción de oligodendrocitos, por ejemplo, en donde al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o más de las células transducidas son oligodendrocitos. Se puede usar cualquier método conocido en la técnica para administrar vectores directamente al SNC. El vector se puede introducir en la médula espinal, el tronco encefálico (bulbo raquídeo, protuberancia), mesencéfalo (hipotálamo, tálamo, epítalamo, glándula pituitaria, sustancia negra, glándula pineal), cerebelo, telencéfalo (cuerpo estriado, cerebro, incluidos los lóbulos occipital, temporal, parietales y frontal, córtex, ganglios basales, hipocampo y amígdala), sistema límbico, neocórtex, cuerpo estriado, cerebro y colículo inferior. El vector también se puede administrar a diferentes regiones del ojo como la retina, córnea o nervio óptico. El vector se puede administrar al líquido cefalorraquídeo (por ejemplo, mediante punción lumbar) para una administración más dispersa del vector.

El vector de administración puede administrarse a la región o regiones deseadas del SNC por cualquier ruta conocida en la técnica, incluyendo pero sin limitación, intratecal, intracerebral, intraventricular, intranasal, intraaural, intraocular (por ejemplo, intravítrea, subretiniana, cámara anterior) y periocular (por ejemplo, región de sub-Tenon) o cualquier combinación de los mismos.

Normalmente, el vector vírico se administrará en una formulación líquida mediante inyección directa (por ejemplo, inyección estereotáctica) en la región o compartimento deseado en el SNC. En algunas realizaciones, el vector se puede administrar a través de un depósito y/o una bomba. En otras realizaciones, el vector se puede proporcionar mediante aplicación tópica en la región deseada o mediante administración intranasal de una formulación en aerosol. La administración en el ojo o en el oído, puede ser por aplicación tópica de gotitas líquidas. Como alternativa adicional, el vector se puede administrar como una formulación sólida de liberación lenta. La liberación controlada de vectores de parvovirus y AAV se describe en la publicación de patente internacional WO 01/91803.

En algunas realizaciones en las que el sujeto tiene una barrera hematoencefálica (BHE) comprometida, el vector vírico se puede administrar sistémicamente (por ejemplo, por vía intravenosa) al sujeto, en donde el vector transduce oligodendrocitos en el área (por ejemplo, limítrofe) del compromiso de la BHE. En determinadas realizaciones, el vector transduce células en el área comprometida pero no células en áreas no comprometidas. Por tanto, un aspecto de la divulgación se refiere a un método para administrar un ácido nucleico de interés a un área del SNC que bordea un área comprometida de la barrera hematoencefálica en un sujeto mamífero, comprendiendo el método la administración intravenosa de una cantidad eficaz de la partícula de AAV de la invención.

En algunas realizaciones, el compromiso en la BHE se debe a una enfermedad o trastorno. Los ejemplos incluyen, sin limitación, enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis múltiple, epilepsia, tumores del SNC o infartos cerebrales. En otras realizaciones, el compromiso de la BHE puede ser una interrupción inducida, por ejemplo, para promover la administración de agentes al SNC. Los compromisos temporales de la BHE pueden ser inducidos por, por ejemplo,

productos químicos tóxicos (tales como metrazol, VP-16, cisplatino, hidroxurea, fluorouracilo y etopósido), agentes osmóticos (como manitol y arabinosa), agentes biológicos (como ácido retinoico, miristato de forbol acetato, leucotrieno C4, bradiquinina, histamina, RMP-7 y alquilgliceroles) o irradiación (como ultrasonido o radiación electromagnética).

5 La administración al músculo esquelético de acuerdo con la presente invención incluye pero no se limita a la administración a los músculos esqueléticos de las extremidades (por ejemplo, parte superior del brazo, antebrazo, parte superior de la pierna y/o parte inferior de la pierna), la espalda, cuello, cabeza (por ejemplo, lengua), tórax, abdomen, pelvis/perineo y/o dedos. Los tejidos del músculo esquelético adecuados incluyen, entre otros, abductor del meñique (en la mano), abductor del meñique (en el pie), secuestrador del dedo gordo, abductor del quinto metatarsiano, abductor corto del pulgar, abductor largo del pulgar, aductor corto, aductor del dedo gordo, aductor largo, aductor mayor, aductor del pulgar, ancóneo, escaleno anterior, articular de la rodilla, bíceps braquial, bíceps femoral, braquial, braquiorradial, buccinador, coracobraquial, corrugador superciliar, deltoides, depresor del ángulo de la boca, depresor del labio inferior, digástrico, interóseo dorsal (en la mano), interóseo dorsal (en el pie), extensor radial corto del carpo, extensor radial largo del carpo, extensor cubital del carpo, extensor del meñique, extensor común de los dedos, extensor corto de los dedos, extensor largo de los dedos, extensor corto del dedo gordo, extensor largo del dedo gordo, extensor del índice, extensor corto del pulgar, extensor largo del pulgar, flexor radial del carpo, flexor cubital del carpo, flexor corto del dedo meñique (en la mano), flexor corto del dedo meñique (en el pie), flexor corto de los dedos, flexor largo de los dedos, flexor profundo de los dedos, flexor superficial de los dedos, flexor corto del dedo gordo, flexor largo del dedo gordo, flexor corto del pulgar, flexor largo del pulgar, frontal, gastrocnemio, geniioideo, glúteo mayor, glúteo medio, glúteo menor, grácil, iliocostal cervical, iliocostal lumbar, iliocostal torácico, iliaco, gemelo inferior, oblicuo inferior, recto inferior, infraespinoso, interespinal, intertransverso, pterigoideo lateral, recto lateral, dorsal ancho, elevador del ángulo de la boca, elevador del labio superior, elevador del labio superior y del ala de la nariz, elevador del párpado superior, elevador de la escápula, rotadores largos, longísimo de la cabeza, longísimo cervical, longísimo torácico, largo de la cabeza, largo del cuello, lumbricales (en la mano), lumbricales (en el pie), masetero, pterigoideo medial, recto medial, escaleno medio, multifido, milohioideo, oblicuo menor de la cabeza, oblicuo mayor de la cabeza, obturador externo, obturador interno, occipital, omohioideo, oponente del meñique, oponente del pulgar, orbicular de los ojos, orbicular de la boca, interóseo palmar, palmar corto, palmar largo, pectíneo, pectoral mayor, pectoral menor, peroneo corto, peroneo largo, peroneo tercio, piriforme, interóseo plantar, plantar, platisma, poplíteo, escaleno posterior, pronador cuadrado, pronador redondo, psoas mayor, cuadrado femoral, cuadrado plantar, recto anterior de la cabeza, recto lateral de la cabeza, recto de la cabeza posterior mayor, recto de la cabeza posterior menor, recto femoral, romboide mayor, romboide menor, risorio, sartorio, escaleno mínimo, semimembranoso, semiespinoso de la cabeza, semiespinoso cervical, semiespinoso torácico, semitendinoso, serrato anterior, rotadores cortos, sóleo, espinal de la cabeza, espinal cervical, esternocleidomastoideo, esternohioideo, esternotiroideo, estilohioideo, subclavio, subescapular, gemelo superior, oblicuo superior, recto superior, supinador, supraespinoso, temporal, tensor de la fascia lata, redondo mayor, redondo menor, torácico, tirohioideo, tibial anterior, tibial posterior, trapecio, tríceps braquial, vasto intermedio, vasto lateral, vasto medial, cigomático mayor y cigomático menor y cualquier otro músculo esquelético adecuado como se conoce en la técnica.

40 El vector de virus puede administrarse al músculo esquelético mediante cualquier método adecuado que incluye, sin limitación, la administración intravenosa, administración intraarterial, administración intraperitoneal, perfusión aislada de extremidades (de pierna y/o brazo; véase, por ejemplo, Arruda *et al.*, (2005) Blood 105:3458-3464), y/o inyección intramuscular directa.

45 La administración al músculo cardíaco incluye, sin limitación, la administración a la aurícula izquierda, aurícula derecha, ventrículo izquierdo, ventrículo derecho y/o tabique. El vector de virus se puede administrar al músculo cardíaco mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, administración intravenosa, administración intraarterial como la administración intraaórtica, inyección cardíaca directa (por ejemplo, en la aurícula izquierda, aurícula derecha, ventrículo izquierdo, ventrículo derecho) y/o perfusión de la arteria coronaria.

La administración al músculo diafragma puede realizarse mediante cualquier método adecuado, incluida la administración intravenosa, administración intraarterial y/o administración intraperitoneal.

55 La administración a cualquiera de estos tejidos también se puede lograr mediante la administración de un depósito que comprende el vector del virus, que se puede implantar en el tejido muscular esquelético, cardíaco y/o del diafragma o el tejido puede ponerse en contacto con una película u otra matriz que comprenda el vector vírico. Ejemplos de tales matrices o sustratos implantables se describen en la Patente de Estados Unidos N.º 7.201.898.

60 En realizaciones particulares, se administra un vector de virus según la presente invención al músculo esquelético, músculo diafragma y/o músculo cardíaco (por ejemplo, para tratar la distrofia muscular o la enfermedad cardíaca [por ejemplo, PAD o insuficiencia cardíaca congestiva]).

65 La invención se puede utilizar en métodos para tratar trastornos del músculo esquelético, cardíaco y/o diafragma. De manera alternativa, la invención se puede utilizar para administrar un ácido nucleico al músculo esquelético, cardíaco y/o diafragma, que se utiliza como plataforma para la producción de un producto proteico (por ejemplo, una enzima)

o ARN no traducido (por ejemplo, ARNi, microARN, ARN antisentido) que normalmente circula en la sangre o para el suministro sistémico a otros tejidos para tratar un trastorno (por ejemplo, un trastorno metabólico, tal como diabetes (por ejemplo, insulina), hemofilia (por ejemplo, factor IX o factor VIII), o un trastorno de almacenamiento lisosómico (tal como la enfermedad de Gaucher [glucocerebrosidasa], enfermedad de Pompe [α -glucosidasa del ácido lisosómico] o enfermedad de Fabry [α -galactosidasa A]) o un trastorno de almacenamiento de glucógeno (tal como enfermedad de Pompe [α -glucosidasa del ácido lisosómico]). Otras proteínas adecuadas para el tratamiento de trastornos metabólicos se describen anteriormente.

En una realización representativa, un vector de virus de la invención se usa en un método para tratar la distrofia muscular en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método: administrar una cantidad eficaz de un vector de virus de la invención a un mamífero, en el que el vector de virus comprende un ácido nucleico heterólogo eficaz para tratar la distrofia muscular. En una realización ejemplar, el método comprende: administrar una cantidad eficaz de un vector de virus de la invención a un mamífero, en el que el vector vírico comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica distrofina, una mini-distrofina, una microdistrofina, utrofina, mini-utrofina, laminina- α 2, mini-agrina, proteína relacionada con la fukutina, folistatina, miostatina negativa dominante, α -sarcoglicano, β -sarcoglicano, γ -sarcoglicano, δ -sarcoglicano, IGF-1, propéptido de miostatina, receptor soluble de activina tipo II, polipéptidos antiinflamatorios tales como el mutante dominante Ikappa B, sarcospan, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra miostatina o propéptido de miostatina, o un ARN inhibidor (por ejemplo, ARN antisentido, microARN o ARNi) contra la miostatina, mir-1, mir-133, mir-206, mir-208 o un ARN inhibidor (por ejemplo, microARN, ARNi o ARN antisentido) para inducir la omisión de exón en un gen de distrofina defectuoso. En realizaciones particulares, el vector del virus se puede administrar al músculo esquelético, diafragma y/o músculo cardíaco tal como se describe en otra parte del presente documento.

La divulgación abarca además un método para tratar un trastorno metabólico en un sujeto que lo necesite. En realizaciones representativas, el método comprende: administrar una cantidad eficaz de un vector de virus de la invención al músculo esquelético de un sujeto, donde el vector de virus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido, en donde el trastorno metabólico es el resultado de una deficiencia y/o defecto en el polipéptido. En el presente documento se describen trastornos metabólicos ilustrativos y ácidos nucleicos heterólogos que codifican polipéptidos. Como una opción adicional, el ácido nucleico heterólogo puede codificar una proteína secretada.

La invención también se puede poner en práctica para producir ARN inhibidor (por ejemplo, ARN antisentido, microARN o ARNi) para administración sistémica.

La divulgación también proporciona un método para tratar la insuficiencia cardíaca congénita en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un vector de virus de la invención a un mamífero, en el que el vector de virus comprende un ácido nucleico heterólogo eficaz para tratar la insuficiencia cardíaca congénita. En realizaciones representativas, el método comprende administrar una cantidad eficaz de un vector de virus de la invención a un sujeto mamífero, donde el vector de virus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica una Ca^{2+} -ATPasa de endorretículo sarcoplásmico (SERCA2a), un factor angiogénico, fosfolambán, PI3 cinasa, calsarcán, un receptor quinasa β -adrenérgico (β ARK), β ARKct, inhibidor 1 de la proteína fosfatasa 1, Pim-1, PGC-1 α , SOD-1, SOD-2, EC-SOD, calicreína, HIF, timosina- β 4, S100A1, parvalbúmina, adenilil ciclasa tipo 6, una molécula que efectúa la desactivación del receptor quinasa de tipo 2 acoplado a proteína G tal como un β ARKct constitutivamente activo truncado; moléculas inhibitoras de fosfolambán o dominantes-negativas como fosfolambán S16E, mir-1, mir-133, mir-206, mir-208.

Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea en forma de soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en un líquido antes de la inyección, o como emulsiones. De manera alternativa, se puede administrar el vector del virus de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, en una formulación de depósito o de liberación sostenida. Además, el vector del virus se puede administrar seco a una matriz implantable quirúrgicamente, como un sustituto de injerto óseo, una sutura, una endoprótesis vascular y similares (por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. 7.201.898).

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral se pueden presentar en unidades discretas, tales como cápsulas, obleas, pastillas o comprimidos, cada uno conteniendo una cantidad predeterminada de la composición de la presente invención; como un polvo o gránulos; como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión de aceite en agua o agua en aceite. La administración oral se puede realizar formando un complejo de un vector de virus de la presente invención con un vehículo capaz de resistir la degradación por las enzimas digestivas en el intestino de un animal. Ejemplos de tales vehículos incluyen cápsulas o comprimidos de plástico, como se conoce en la técnica. Dichas formulaciones se preparan mediante cualquier método farmacéutico adecuado, que incluye la etapa de poner en asociación la composición y un vehículo adecuado (que puede contener uno o más ingredientes accesorios como se indicó anteriormente). En general, la composición farmacéutica de acuerdo con las realizaciones de la presente invención se prepara mezclando uniforme e íntimamente la composición con un vehículo líquido o sólido finamente dividido, o ambos, y luego, si fuera necesario, dando forma a la mezcla resultante. Por ejemplo, se puede preparar un comprimido comprimiendo o moldeando un polvo o gránulos que contienen la composición, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos que se han comprimido se preparan comprimiendo, en un aparato adecuado, la composición en forma

fluida, como un polvo o gránulos opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, un diluyente inerte, y/o un agente (o agentes) tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados se fabrican moldeando, en un aparato adecuado, el compuesto en polvo humedecido con un aglutinante líquido inerte.

5 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración bucal (sublingual) incluyen pastillas que comprenden la composición de la presente invención en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; y pastillas que comprenden la composición en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica.

10 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden comprender soluciones inyectables acuosas y no acuosas estériles de la composición de la presente invención, cuyas preparaciones son opcionalmente isotónicas con la sangre del receptor previsto. Estas preparaciones pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos, que hacen que la composición sea isotónica con la sangre del receptor previsto. Las suspensiones, soluciones y emulsiones estériles acuosas y no acuosas pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores de líquidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

25 Las composiciones se pueden presentar en envases de dosis unitarias o multidosis, por ejemplo, en viales y ampollas selladas, y se pueden almacenar en condiciones de criodesecado (liofilizadas) que requieren solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua para inyección inmediatamente antes de su uso.

30 Las soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito anteriormente. Por ejemplo, se puede proporcionar una composición inyectable, estable y estéril de la presente invención en una forma de dosificación unitaria en un recipiente sellado. La composición se puede presentar en forma de liofilizado, que se puede reconstituir con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para formar una composición líquida adecuada para inyección en un sujeto. La forma de dosificación unitaria puede ser de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 gramos de la composición de la presente invención. Cuando la composición es sustancialmente insoluble en agua, una cantidad suficiente de agente emulsionante, que es fisiológicamente aceptable, se puede incluir en cantidad suficiente para emulsionar la composición en un vehículo acuoso. Uno de estos agentes emulsionantes útiles es la fosfatidilcolina.

40 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración rectal se pueden presentar como supositorios de dosis unitaria. Estos se pueden preparar mezclando la composición con uno o más vehículos sólidos convencionales, tales como, por ejemplo, manteca de cacao y luego dar forma a la mezcla resultante.

45 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para la aplicación tópica a la piel pueden tomar la forma de un ungüento, crema, loción, pasta, gel, pulverización, aerosol y/o aceite. Los vehículos que se pueden utilizar incluyen, pero sin limitación, gelatina de petróleo, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, potenciadores transdérmicos y combinaciones de dos o más de los mismos. En algunas realizaciones, por ejemplo, la administración tópica se puede realizar mezclando una composición farmacéutica de la presente invención con un reactivo lipofílico (por ejemplo, DMSO) que es capaz de pasar a la piel.

50 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración transdérmica pueden estar en forma de parches discretos adaptados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del sujeto durante un período de tiempo prolongado. Las composiciones adecuadas para la administración transdérmica también se pueden administrar por iontoforesis (véase, por ejemplo, Pharm. Res. 3:318 (1986)) y típicamente toman la forma de una solución acuosa opcionalmente tamponada de la composición de la presente invención. Las formulaciones adecuadas pueden comprender tampón citrato o bis/tris (pH 6) o etanol/agua y pueden contener de 0,1 a 0,2 M de ingrediente activo.

60 Los vectores de virus desvelados en el presente documento se pueden administrar a los pulmones de un sujeto por cualquier medio adecuado, por ejemplo, mediante la administración de una suspensión en aerosol de partículas respirables compuestas por los vectores del virus, que el sujeto inhala. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. Los aerosoles de partículas líquidas que comprenden los vectores de virus pueden producirse por cualquier medio adecuado, como con un nebulizador de aerosol impulsado por presión o un nebulizador ultrasónico, tal como conocen los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 4.501.729. También se pueden producir aerosoles de partículas sólidas que comprenden los vectores víricos con cualquier generador de aerosoles de medicamentos en partículas sólidas, mediante técnicas conocidas en la técnica farmacéutica.

65

IV. Uso de la cápside de AAV para atacar tejidos periféricos.

Se ha demostrado que las cápsides y los vectores de AAV de la presente invención se desdirigen total o casi totalmente de los órganos y tejidos periféricos (véase la Fig. 4). Este desdireccionamiento hace que los vectores sean ideales como un vector "en blanco" que puede modificarse para producir el perfil trópico deseado, por ejemplo, para dirigirse a órganos y tejidos específicos y/o desdirigir otros órganos y tejidos. Por tanto, un aspecto de la divulgación se refiere a un método para preparar una cápside de AAV que tiene un perfil de tropismo de interés, comprendiendo el método modificar la cápside de AAV de la presente invención para insertar una secuencia de aminoácidos que proporcione el perfil de tropismo de interés. En algunas realizaciones, el perfil de tropismo de interés es la selectividad mejorada para un tejido seleccionado del músculo esquelético, músculo cardíaco, el diafragma, riñón, hígado, páncreas, bazo, tracto gastrointestinal, pulmón, tejido articular, lengua, ovario, testículos, una célula germinal, una célula cancerosa, o una combinación de las mismas y/o selectividad reducida por un tejido seleccionado de hígado, ovario, testículos, una célula germinal o una combinación de las mismas.

Se conocen en la técnica ejemplos de secuencias de direccionamiento y desdireccionamiento específicas. Un ejemplo es la base molecular del tropismo preferencial del hígado, que ha sido mapeado, en el caso de AAV2 y AAV6, a una huella básica continua que parece estar involucrada en la interacción de cualquiera de los serotipos con la heparina. Específicamente, se ha demostrado previamente que un solo resto de lisina en AAV6 (K531) dicta la capacidad de unión de heparina y, en consecuencia, el tropismo hepático. En corolario, la mutagénesis por sustitución del resto de glutamato/aspartato correspondiente en otros serotipos con un resto de lisina confiere unión a heparina, posiblemente formando una huella básica continua mínima en la superficie de la cápside. Otro ejemplo son los mutantes de la cápside que comprenden alteraciones en el bucle 4 de tres ejes como se describe en la publicación internacional N.º WO 2012/093784. Estos mutantes presentan una o más propiedades que incluyen (i) reducción de la transducción del hígado, (ii) movimiento mejorado a través de las células endoteliales, (iii) transducción sistémica; (iv) transducción mejorada de tejido muscular (por ejemplo, músculo esquelético, músculo cardíaco y/o músculo diafragma) y/o (v) reducción de la transducción de tejidos cerebrales (por ejemplo, neuronas). Otras secuencias trópicas se describen en Li *et al.*, (2012) *J. Virol.* 86:7752-7759; Pulicherla *et al.*, (2011) *Mol. Ther.* 19:1070-1078; Bowles *et al.*, (2012) *Mol. Ther.* 20:443-455; Asokan *et al.*, (2012) *Mol. Ther.* 20:699-708; y Asokan *et al.*, (2010) *Nature Biotechnol.* 28:79-82.

En algunas realizaciones, la cápside de AAV de la presente invención se puede modificar mediante codificación de ADN y/o evolución dirigida para identificar las cápsides modificadas que tienen el perfil de tropismo deseado. Las técnicas para la codificación del ADN y la evolución dirigida de las cápsides de AAV se describen en la publicación internacional N.º WO 2009/137006.

EJEMPLO 1

Descubrimiento y caracterización del clon de AAV BNP61

Se inyectó intravenosamente una biblioteca de cápsides de AAV con ADN mutante barajado en un modelo de rata de la enfermedad de Parkinson y 3 días más tarde las células se disociaron del núcleo caudado. Usando el rescate de PCR, emergió un solo clon (BNP61). La mezcla y la selección adicionales produjeron el mismo clon. Como se ve en la Fig.1, este clon es una quimera de varios serotipos de AAV.

La infusión directa de este clon de BNP61 en el cerebro de la rata produjo un patrón de transducción celular sorprendente. Hasta ahora, casi todos los diversos serotipos y quimeras de AAV presentan un tropismo por neuronas > 95 %, cuando la expresión génica es impulsada por un promotor constitutivo. De manera muy destacable, BNP61 presentó un tropismo > 95 % por oligodendrocitos sin evidencia de transducción microglial o de astrocitos y transducción neuronal mínima (Fig. 2A-2C). La Fig. 2A muestra oligodendrocitos positivos para GFP en el caudado de rata 1 semana después de la infusión de los vectores BNP61-CBh-GFP. Téngase en cuenta que no hay neuronas positivas para GFP. La Fig. 2B muestra un aumento mayor que refleja una clara morfología de oligodendrocitos, y la Fig. 2C muestra que ninguna de las células positivas para GFP se colocaliza con el marcador celular de astrocitos, GFAP (rojo).

También, en cultivos de oligodendrocitos primarios, BNP61 transduce los oligodendrocitos pero no el lecho subyacente de astrocitos (Fig. 3A-3B). Se transdujeron cultivos gliales mixtos en el día 10 con BNP61-GFP a una MDI de 100 partículas víricas y se tomaron imágenes 72 horas después. La Fig. 3A es una imagen clara del cultivo glial. La Fig. 3B es una imagen de células positivas para GFP de AAV fluorescentes tomadas del mismo marco que la Fig. 3A. El lecho de la capa inferior de astrocitos no se transdujo y casi todas las células que expresan GFP aparecen morfológicamente como oligodendrocitos. Las flechas indican oligodendrocitos casi enfocados que muestran procesos consistentes con la morfología del cultivo progenitor de oligodendrocitos. Por tanto, el vector BNP61 de AAV presenta propiedades que son claramente diferentes de otros vectores de AAV caracterizados hasta la fecha.

Para evaluar la biodistribución periférica, los ratones recibieron administración intravenosa de vectores BNP61-CBh-GFP y posteriormente se recolectaron los órganos periféricos. Todos los ratones fueron inyectados como adultos

con 5×10^{10} vg excepto lo indicado. Las inyecciones neonatales fueron con $2,5 \times 10^{10}$ vg. Los adultos se sacrificaron 10 días después de la inyección y los recién nacidos se sacrificaron 4 semanas después de la inyección. * indica muestras no analizadas. En la leyenda, el número de animales para cada vector se muestra entre paréntesis. Las barras de error son E.E.M. Como se observa en la Fig. 4, BNP61 no se acumuló en ninguno de los órganos periféricos.

EJEMPLO 2

BNP61 cruza la barrera hematoencefálica comprometida

Después de la primera ronda de selección, el clon BNP61 se empaquetó con GFP y se produjo el virus recombinante. Después, 2 semanas después del tratamiento con 6-OHDA, el virus recombinante se administró por vía intravenosa a una dosis de 8×10^{11} genomas de vector/kg. Un mes después, se sacrificaron las ratas y se seccionaron los cerebros. En estas ratas de 2 semanas posteriores al tratamiento, se encontró expresión génica sustancial en oligodendrocitos y algunas neuronas dentro del cuerpo estriado tratado con 6-OHDA (Fig.5), mientras que no se encontró expresión génica en el cuerpo estriado contralateral, el tracto inyector en la corteza o estructuras cerebrales distales. Nótese la falta de colocalización de NeuN con los muchos oligodendrocitos que rodean la única neurona positiva en NeuN (Fig. 5). Por tanto, parece que después de la administración intravenosa, este nuevo clon de AAV presenta la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica comprometida con 6-OHDA, pero no la barrera hematoencefálica intacta.

EJEMPLO 3

Generación de clones dirigidos a oligodendrocitos adicionales

Usando la misma mezcla de cápside de ADN de AAV y el proceso *in vivo* de evolución dirigido descrito en el Ejemplo 1, se identificaron dos clones adicionales dirigidos a oligodendrocitos, BNP62 y BNP63. Tal como se muestra en la Fig. 1 y similar a BNP61, estos clones son quimeras de varios serotipos de AAV. La identidad de la secuencia de aminoácidos entre los tres clones se muestra en la Tabla 2. Los tres clones son más del 95 % idénticos entre sí a nivel de aminoácidos.

Tabla 2: Identidad de secuencia entre clones

	BNP61	BNP62	BNP63
BNP61	100 %	96 %	97 %
BNP62	96 %	100 %	96 %
BNP63	97 %	96 %	100 %

La Fig. 6 muestra que el clon BNP63 transduce oligodendrocitos en la corteza piriforme de rata. Las células transducidas con BNP63 (verde) no se colocalizan con un marcador celular para astrocitos (GFAP, rojo). También, las células transducidas presentan una clara morfología de oligodendrocitos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ácido nucleico que codifica una cápside de AAV, comprendiendo el ácido nucleico una secuencia codificante de la cápside de AAV que es al menos el 96 % idéntica a:
- (a) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1; o
 (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una de las SEQ ID NO:2-4;
- 10 en donde la cápside presenta un tropismo dominante por los oligodendrocitos.
2. El ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico es un plásmido, fago, vector vírico, cromosoma artificial bacteriano o cromosoma artificial de levadura, tal como un vector de AAV que comprende la secuencia codificante.
- 15 3. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el ácido nucleico comprende además una secuencia codificante de rep de AAV.
- 20 4. Una célula *in vitro* que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 incorporado de forma estable en el genoma.
5. Una partícula de virus que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, tal como una partícula de AAV, una partícula de adenovirus, una partícula de herpesvirus o una partícula de baculovirus.
- 25 6. Una cápside de AAV que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 96 % idéntica a una de las SEQ ID NO: 2-4, en donde la cápside presenta un tropismo dominante por los oligodendrocitos.
7. La cápside de AAV de la reivindicación 6, unida de manera covalente, enlazada o que encapsula un compuesto seleccionado del grupo que consiste en una molécula de ADN, una molécula de ARN, un polipéptido, un hidrato de carbono, un lípido y una pequeña molécula orgánica.
- 30 8. Una partícula de AAV que comprende:
- un genoma de vector de AAV; y
 la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en donde la cápside de AAV encapsula el genoma del vector de AAV, que comprende opcionalmente un ácido nucleico heterólogo.
- 35 9. La partícula AAV de la reivindicación 8, en la que el ácido nucleico heterólogo está operativamente unido a un promotor constitutivo o un promotor específico de oligodendrocitos o preferido por los oligodendrocitos, tal como un promotor seleccionado de la proteína básica de mielina, fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, proteína proteolípida, Gtx o Sox10.
- 40 10. Un método para producir una partícula de AAV recombinante que comprende una cápside de AAV, comprendiendo el método:
- 45 proporcionar una célula *in vitro* con un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, una secuencia de codificación de rep AAV, un genoma de vector de AAV que comprende un ácido nucleico heterólogo y funciones auxiliares para generar una infección de AAV productiva; y
 permitir el ensamblaje de la partícula de AAV recombinante que comprende la cápside de AAV y que encapsula el genoma del vector de AAV.
- 50 11. Una formulación farmacéutica que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, la partícula de virus de la reivindicación 5, la cápside de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, o la partícula de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55 12. Un método para administrar un ácido nucleico de interés a un oligodendrocito *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto el oligodendrocito *in vitro* con la partícula de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9.
- 60 13. La partícula de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9 o la formulación farmacéutica de la reivindicación 11 para su uso en un método de administración de un ácido nucleico de interés a un oligodendrocito en un sujeto mamífero, comprendiendo el método: administrar una cantidad eficaz de dicha partícula o formulación a un mamífero.
- 65 14. La partícula o formulación para su uso según la reivindicación 13, en donde la partícula de AAV se administra al sistema nervioso central (SNC), de tal manera que se administra directamente al SNC por administración intratecal, intracerebral, intraventricular, intranasal, intraaural, intraocular o periocular, o cualquier combinación de las mismas.

15. La partícula de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 8-9 o la formulación farmacéutica de la reivindicación 11 para su uso en un método de tratamiento de un trastorno asociado con la disfunción de oligodendrocitos en un sujeto mamífero que lo necesite, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha partícula o formulación a un mamífero, tal como una enfermedad desmielinizante.

5

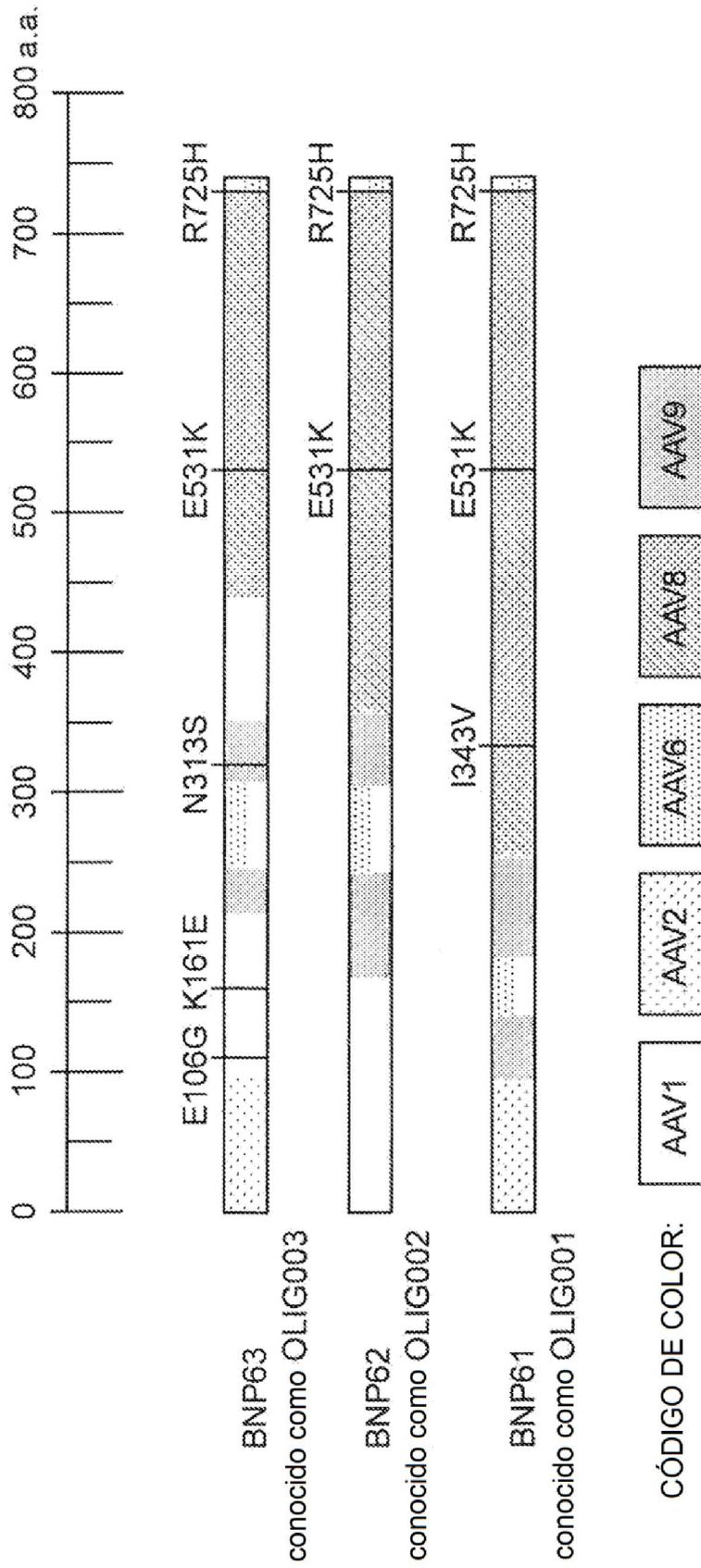


FIG. 1

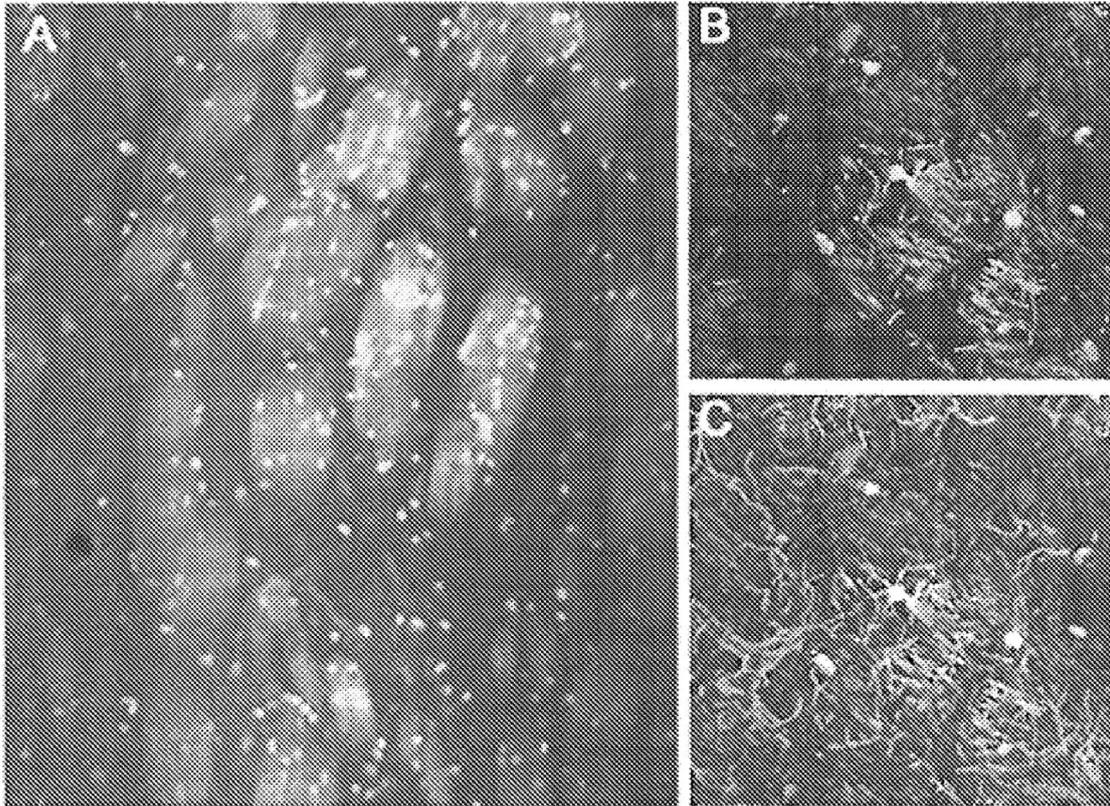


FIG. 2

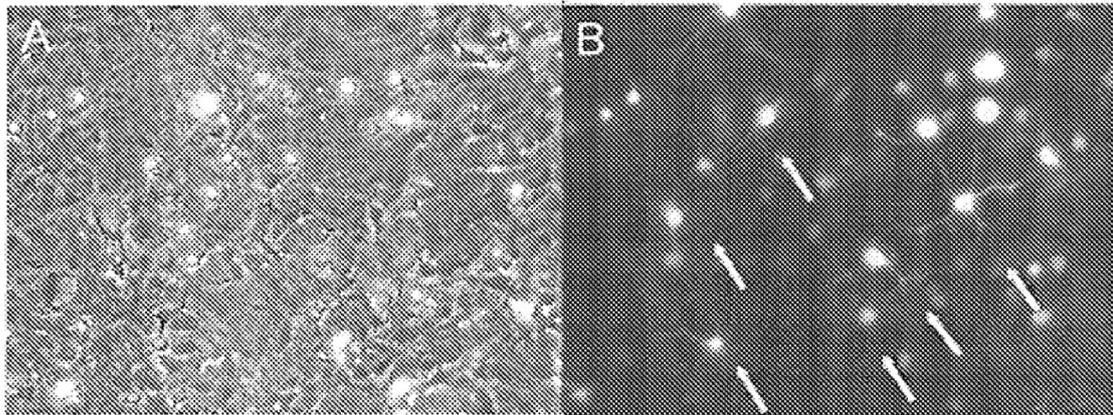


FIG. 3

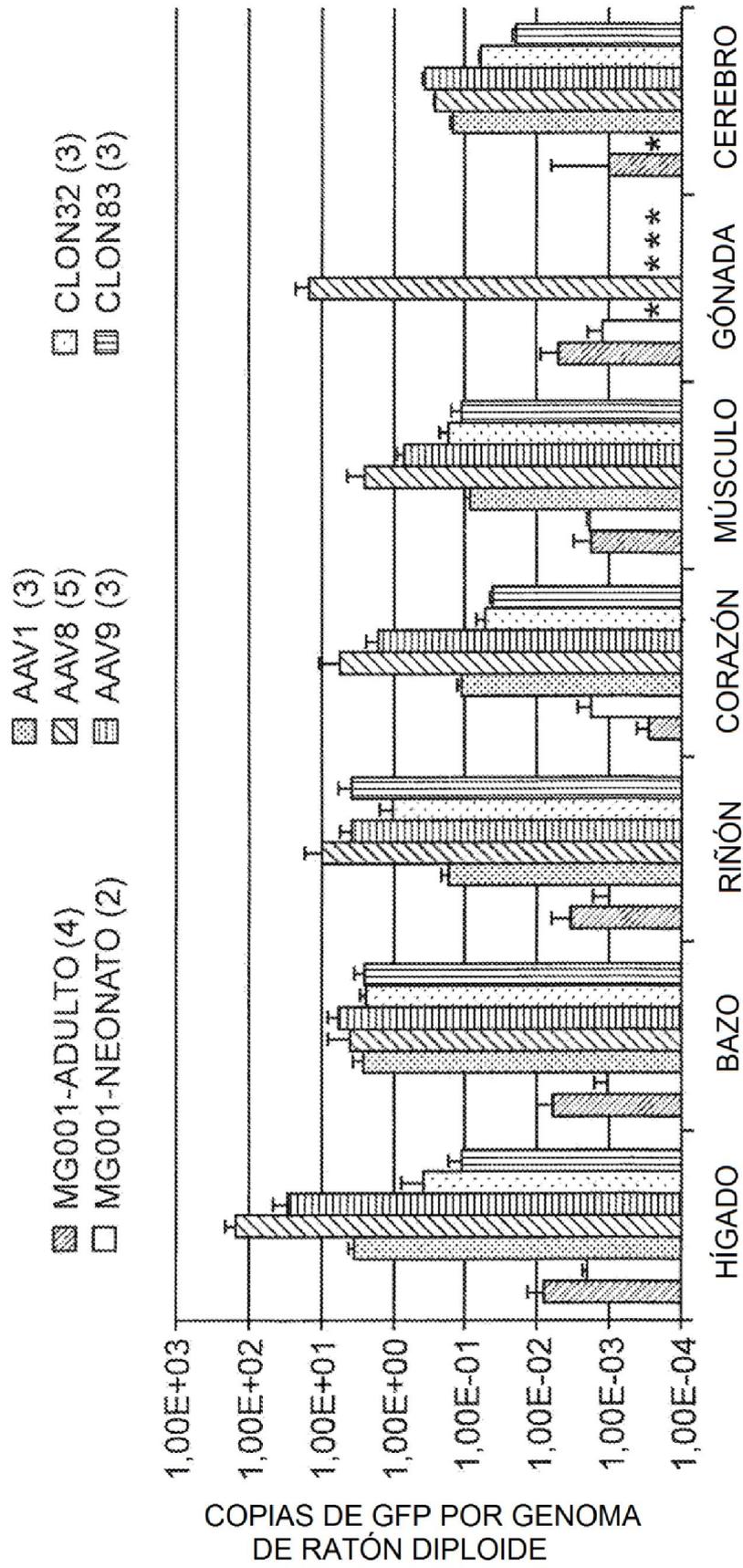
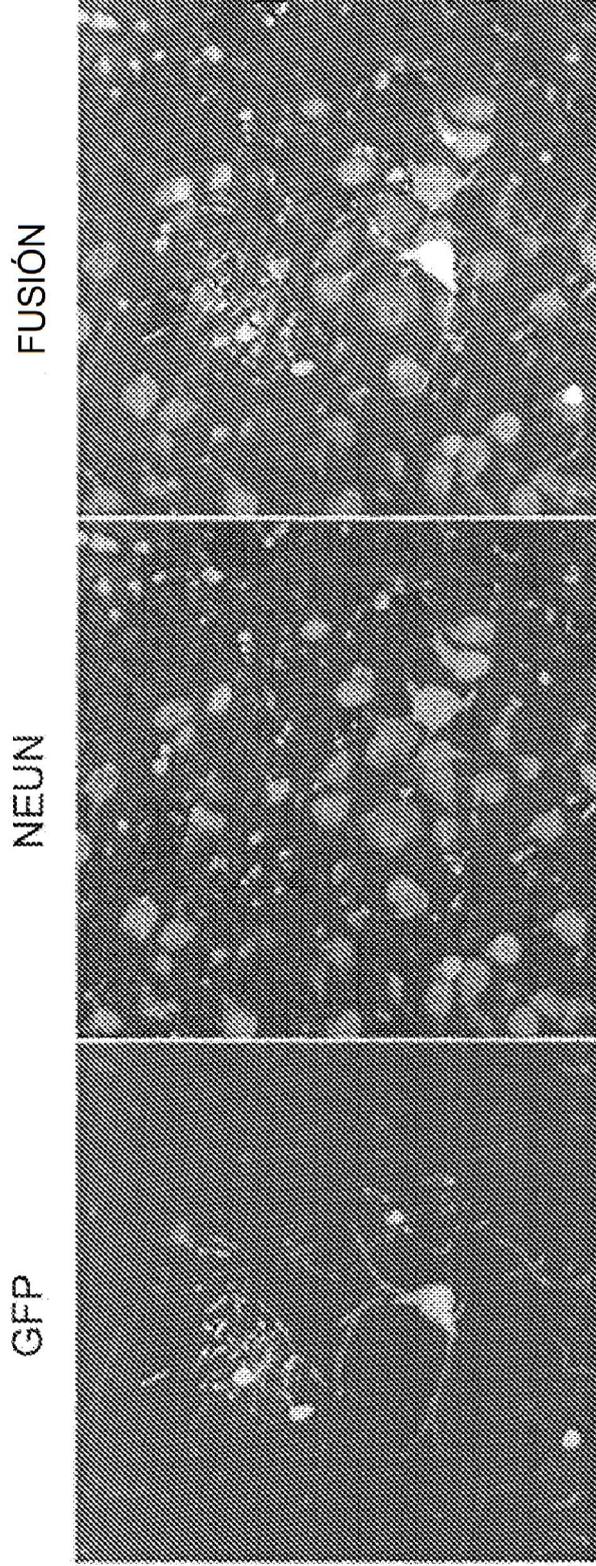


FIG. 4

IMAGEN CONFOCAL DE COLOCALIZACIÓN DE GFP-NEUN EN EL CUERPO ESTRIADO



NÓTESE LA AUSENCIA DE COLOCALIZACIÓN DE NEUN EN LOS MUCHOS OLIGODENDROCITOS QUE RODEAN LA ÚNICA NEURONA POSITIVA EN NEUN

FIG. 5

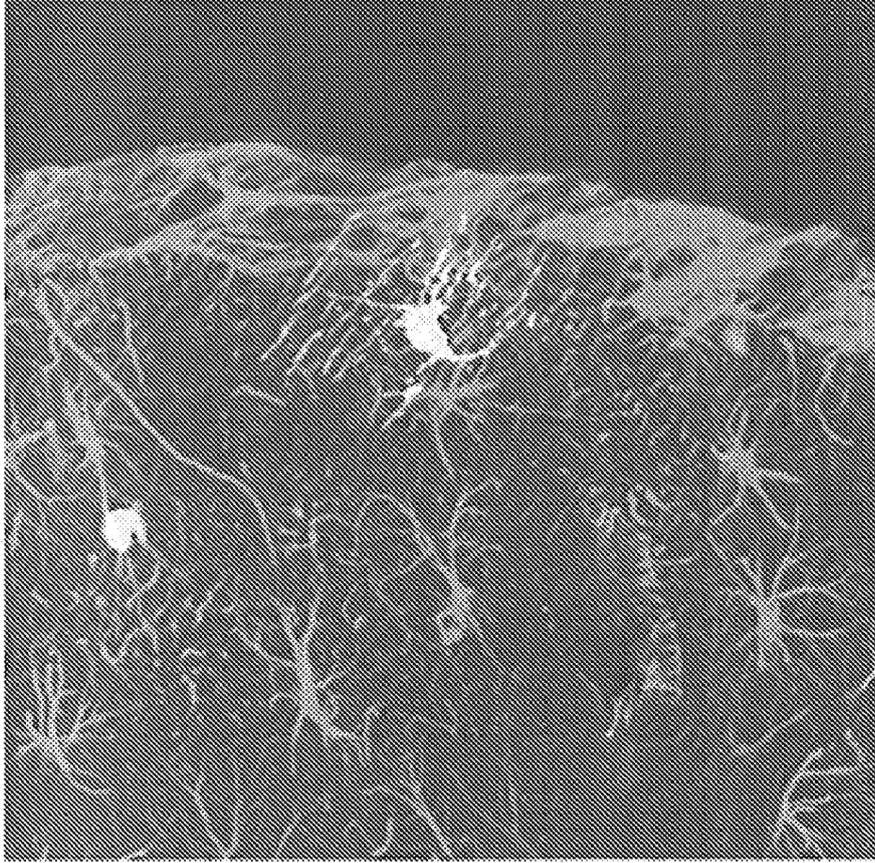


FIG. 6