

VECTOR ADENOVIRAL QUE CODIFICA EL HOMOLOGO-1 ATONAL HUMANO (HATH1)

REFERENCIA RECIPROCA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la Solicitud de
5 Patente Provisional EE.UU. No. 62/061.748, presentada el 9 de octubre de 2014,
la cual se incorpora como referencia.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA DEL MATERIAL PRESENTADO DE MANERA ELECTRÓNICA

[0002] Se incorpora como referencia en su totalidad en la presente un listado
10 de secuencias de nucleótidos/aminoácidos legible por computador presentado
simultáneamente con la presente e identificado como sigue: Un archivo ASCII
(texto) de 49.240 bytes llamado "721767_ST25.TXT", creado el 25 de septiembre
de 2015.

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

15 [0003] La mayoría de la población mundial probablemente experimentará
alguna reducción en la capacidad auditiva o un trastorno del equilibrio a lo largo de
su vida. Aproximadamente el 17 por ciento (36 millones) de los adultos
estadounidenses reportan algún grado de pérdida de la audición, y alrededor del
2-3 de cada 1.000 niños en los Estados Unidos nacen sordos o con problemas de
20 audición (estadísticas del Instituto Nacional de la Sordera y Otros Trastornos de la
comunicación (NIDCD)).

[0004] Tanto en la audición y el equilibrio, los estímulos mecánicos se traducen
en señales neuronales mediante las células sensoriales del cabello, el daño de
éstas es responsable de muchos tipos de trastornos de pérdida de la audición y el
25 equilibrio. Daño mecánico mediante, por ejemplo, ruidos fuertes, dobleces de las
células del cabello de la cóclea hasta el punto de que la célula del cabello ya no
puede transducir señales a los nervios auditivos. Puesto que las células del

cabello de mamíferos no se regeneran de forma natural, puede ocurrir pérdida de audición permanente, si se dañan las células del cabello. Aparte del trauma acústico, que es la causa predominante de la discapacidad auditiva, la pérdida auditiva también puede ser causada por síndromes hereditarios, infecciones bacterianas o virales, el uso de medicamentos recetados, y la presbiacusia (pérdida auditiva asociada con la vejez). Del mismo modo, los trastornos del equilibrio, especialmente trastornos vestibulares, pueden ser causados por una infección, lesión en la cabeza, uso farmacéutico, y la edad.

[0005] Los tratamientos más comunes para la pérdida auditiva incluyen ayudas auditivas e implantes cocleares. Aproximadamente 188.000 personas en todo el mundo han recibido implantes cocleares, que incluyen aproximadamente 41.599 adultos y 25.500 niños en los Estados Unidos (estadísticas NIDCD). Las opciones de tratamiento para los trastornos del equilibrio incluyen la readaptación del equilibrio, medicamentos antivertiginosos o anti-náuseas, y la terapia de rehabilitación vestibular. Tales terapias, sin embargo, es probable que se requieran durante períodos prolongados de tiempo si el trastorno es progresivo, y muchas terapias para los trastornos del equilibrio no proporcionan alivio permanente contra mareos. Actualmente, no existen tratamientos farmacéuticos eficaces para los trastornos que implican la pérdida o el daño de las células sensoriales del cabello en el oído.

[0006] Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad de agentes que pueden aliviar los trastornos asociados con la destrucción o pérdida de células sensoriales del cabello, tales como trastornos de pérdida auditiva y trastornos del equilibrio. Esta invención proporciona tal agente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0007] La invención proporciona un vector adenoviral que comprende un genoma adenoviral del serotipo 5, excepto que dos pares de bases se eliminan en la región VA RNA I, uno o más nucleótidos endógenos de la región E1 se eliminan para rendir un gen endógeno en la región E1 funcionalmente deficiente, uno o más nucleótidos endógenos de la región E3 se eliminan, y uno o más nucleótidos

endógenos de la región E4 se eliminan para rendir un gen endógeno en la región E4 funcionalmente deficiente, en el que una repetición terminal invertida (ITR) de lado derecho, una secuencia de poliadenilación de la región E4, y un promotor de la región E4 se conservan, (b) una secuencia de poliadenilación temprana de SV40, (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del homólogo-1 atonal humano (Hath1) que comprende la SEQ ID NO: 1, (d) un promotor de proteína ácida fibrilar glial humana (GFAP), y (e) un espaciador transcriptionalmente inerte (TIS). Los elementos (b), (c) y (d) se encuentran en la secuencia de 3' a 5' con respecto al genoma de adenovirus en la región E1 del genoma adenoviral, y el elemento (e) se encuentran en la región E4 del genoma adenoviral entre la secuencia de poliadenilación E4 y el promotor E4.

[0008] La invención también proporciona una composición y un método que utiliza el vector adenoviral mencionada anteriormente para generar células sensoriales en el oído interno de un ser humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIFERENTES VISTAS DE LOS DIBUJOS

[0009] La Figura 1 es un mapa esquemático del plásmido pAdE1 (GFAP.Hath1) E3(10)E4 (TIS1).

[0010] La Figura 2 es un mapa esquemático del vector adenoviral AdGFAP.HATH1.11D.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0011] La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que las células sensoriales del cabello se pueden generar mediante la entrega en el oído interno de un vector adenoviral del serotipo 5 que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del homólogo-1 atonal humano (Hath1).

[0012] El término "vector adenoviral", como se usa en la presente, se refiere a un adenovirus en el que el genoma adenoviral se ha manipulado para dar cabida a una secuencia de ácido nucleico que no es nativa con respecto al genoma adenoviral. Típicamente, un vector adenoviral se genera mediante la introducción

de una o más mutaciones (por ejemplo, una delección, inserción o sustitución) en el genoma adenoviral del adenovirus con el fin de dar cabida a la inserción de una secuencia de ácido nucleico no nativa en el adenovirus.

[0013] La fuente del genoma viral para el vector adenoviral es un adenovirus humano del serotipo 5. El adenovirus humano se clasifica como subgrupo A (ej., los serotipos 12, 18, y 31), subgrupo B (ej., los serotipos 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, y 50), el subgrupo C (ej., serotipos 1, 2, 5, y 6), subgrupo D (por ejemplo, los serotipos 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, y 42-48) , subgrupo E (por ejemplo, el serotipo 4), subgrupo F (por ejemplo, los serotipos 40 y 41), o un serogrupo sin clasificar (por ejemplo, los serotipos 49 y 51). Los serotipos de adenovirus 1 a 51 (es decir, Ad1 a Ad51) están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia).

[0014] El vector adenoviral según la invención es de replicación deficiente. Un vector adenoviral de replicación deficiente requiere la complementación de una o más funciones o regiones génicas del genoma adenoviral que se requieren para la replicación, como resultado de, por ejemplo, una deficiencia en una o más funciones o regiones génicas esenciales para replicación, de manera que el vector adenoviral no se replique en células huésped típicas, especialmente aquellas en un ser humano infectadas por el vector adenoviral.

[0015] Una deficiencia en una función génica o región genómica, como se usa en el presente documento, se define como una interrupción (por ejemplo, supresión) de material genético suficiente del genoma adenoviral para obliterar o deteriorar la función del gen (por ejemplo, tal que la función del producto génico se reduce en al menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, o 50 veces) cuya secuencia de ácidos nucleicos fue alterada (por ejemplo, borrada) en su totalidad o parcialmente, haciendo así el gen o la región genómica "funcionalmente deficiente." La delección de toda una región génica a menudo no se requiere para la alteración de una función génica esencial para la replicación. Sin embargo, para el propósito de proporcionar suficiente espacio en el genoma adenoviral para uno o más transgenes, la eliminación de una mayoría de una o más regiones génicas puede ser deseable. A este respecto, el vector adenoviral

comprende deseablemente un genoma adenoviral, excepto que uno o más nucleótidos endógenos de uno o más genes regiones genómicas esenciales para la replicación se eliminan para volver un gen endógeno o región genómica funcionalmente deficiente. Aunque se prefiere la eliminación de material genético, la mutación de material genético también es apropiada para alterar la función génica. Las funciones génicas esenciales para la replicación son aquellas funciones génicas que son necesarias para la replicación de adenovirus (por ejemplo, propagación) y están codificadas por, por ejemplo, las regiones adenovirales tempranas (por ejemplo, las regiones E1, E2, y E4), las regiones tardías (por ejemplo, las regiones L1, L2, L3, L4, y L5), los genes implicados en el empaquetado viral (por ejemplo, el gen IVa2) y ARNs asociados a virus (ej., VA-ARN-1 y/o VA-ARN-2).

[0016] El vector adenoviral de replicación deficiente retiene preferiblemente al menos una parte del genoma adenoviral. El vector adenoviral puede comprender cualquier porción del genoma adenoviral, incluyendo regiones de codificación de proteínas y regiones de codificación de no proteínas. El vector adenovírico puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquier proteína de adenovirus adecuado, tal como, por ejemplo, una proteína codificada por uno cualquiera de los genes de la región temprana (es decir, las regiones E1A, E1B, E2A, E2B, E3, y/o E4), o una proteína codificada por cualquiera de los genes de regiones tardías, que codifican las proteínas estructurales del virus (es decir, regiones L1, L2, L3, L4 y L5). Alternativamente, el vector adenovírico puede comprender regiones codificantes no proteicas del genoma adenoviral, incluyendo, por ejemplo uno o más promotores, secuencias de terminación de la transcripción, o secuencias de poliadenilación de la región temprana o genes de regiones tardías o una o más secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR). En una modalidad, el vector adenoviral de la invención retiene al menos una repetición terminal invertida derecha (ITR), una secuencia de poliadenilación de la región E4, y un promotor de la región E4.

[0017] El vector adenoviral de replicación deficiente puede ser modificado de cualquier manera adecuada para causar las deficiencias en una o más funciones

génicas esenciales para la replicación en una o más regiones del genoma adenoviral para la propagación. La complementación de las deficiencias en la una o más funciones génicas esenciales para la replicación de una o más regiones del genoma adenoviral se refiere al uso de medios exógenos para proporcionar las funciones génicas esenciales para la replicación funcionalmente deficiente. Dicha complementación se puede efectuar de cualquier manera adecuada, por ejemplo, mediante el uso de células de complementación y/o ADN exógeno (por ejemplo, adenovirus colaborador que codifican las funciones génicas esenciales para la replicación interrumpida.

10 [0018] El vector adenoviral puede ser deficiente en una o más funciones génicas esenciales para la replicación de sólo las regiones tempranas (es decir, regiones E1-E4) del genoma adenoviral, sólo las regiones tardías (es decir, regiones L1-L5) del genoma adenoviral, tanto las regiones tempranas y tardías del genoma adenoviral, o todos los genes adenovirales (es decir, un adenovector de alta capacidad (HC-Ad)). Ver Morsy, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 95: 965-976
15 (1998); Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 94: 1645-1650 (1997); y Kochanek, *Hum. Gene Ther.*, 10: 2451-2459 (1999). Ejemplos de vectores adenovirales de replicación deficiente se dan a conocer en las patentes US 5,837,511; 5.851.806; 5.994.106; 6.127.175; 6.482.616; y 7.195.896, y las Publicaciones de Solicitudes de Patentes Internacionales WO 1994/028152, WO 1995/002697, WO 1995/016772, WO 1995/034671, WO 1996/022378, WO 1997/012986, WO 1997/021826, y WO 2003/022311.

[0019] Las regiones tempranas del genoma adenoviral incluyen las regiones E1, E2, E3, y E4. La región E1 comprende las subregiones E1a y E1b, y una o
25 más deficiencias en las funciones de genes esenciales para la replicación de la región E1 pueden incluir una o más deficiencias en las funciones de genes esenciales para la replicación en una o ambas de las subregiones E1A y E1B, requiriendo de ese modo la complementación de la subregión E1A y/o la subregión E1B del genoma adenoviral para el vector adenoviral para propagar (por
30 ejemplo, para formar partículas de vectores adenovirales). La región E2 comprende las subregiones E2A y E2B, y una o más deficiencias en las funciones

de genes esenciales para la replicación en la región E2 pueden incluir una o más deficiencias en las funciones de genes esenciales para la replicación en una o ambas de las subregiones E2A y E2B, requiriendo de ese modo la complementación de la subregión E2A y/o la subregión E2B del genoma adenoviral para el vector adenoviral para propagar (por ejemplo, para formar partículas de vectores adenovirales).

[0020] La región E3 no incluye ninguna de las funciones génicas esenciales para la replicación, de modo que una delección de la región E3 en parte o en conjunto, no requiere complementación de cualquiera de las funciones génicas en la región E3 para el vector adenoviral para propagar (por ejemplo, para formar partículas de vectores adenovirales). En el contexto de la invención, la región E3 se define como la región que se inicia con el marco de lectura abierto que codifica una proteína con alta homología con la proteína 12,5K de la región E3 del adenovirus humano 5 (secuencia de referencia NCBI AP_000218) y termina con el marco de lectura abierto que codifica una proteína con alta homología con la proteína 14,7K de la región E3 del adenovirus humano 5 (secuencia de referencia NCBI AP_000224.1). La región E3 se puede suprimir en su totalidad o en parte, o se puede retener en su totalidad o en parte. El tamaño de la delección se puede adaptar a fin de retener un vector adenoviral cuyo genoma corresponde estrechamente con el tamaño óptimo de embalaje del genoma. Una delección mayor acomodará la inserción de secuencias de ácido nucleico heterólogas más grandes en el genoma adenoviral. En una modalidad de la invención, las secuencias señal de poliadenilación L4, que residen en la región E3, se conservan.

[0021] La región E4 comprende múltiples marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican múltiples genes endógenos. Un vector adenoviral con una delección de todos los marcos de lectura abiertos de la región E4 excepto ORF6, y en algunos casos ORF3, no requiere complementación de las funciones génicas en la región E4 para el vector adenoviral para propagar (por ejemplo, para formar partículas de vectores adenovirales). A la inversa, un vector adenoviral con una interrupción o supresión de ORF6, y en algunos casos ORF3, de la región E4 (por ejemplo, con

una deficiencia en una función génica esencial para la replicación basado en ORF6 y/o ORF3 de la región E4), con o sin una alteración o eliminación de cualquiera de los otros marcos de lectura abiertos de la región E4 o el promotor E4 nativo, secuencia de poliadenilación, y/o repetición terminal invertida derecha (ITR), requiere la complementación de la región E4 (específicamente, de ORF6 y/o ORF3 de la región E4) para el vector adenoviral para propagar (por ejemplo, para formar partículas de vectores adenovirales).

[0022] Las regiones tardías del genoma adenoviral incluyen las regiones L1, L2, L3, L4 y L5. El vector adenoviral también puede tener una mutación en el promotor tardío principal (MLP), como se discute en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 2000/000628, que puede hacer el vector adenoviral de replicación deficiente, si se desea.

[0023] Preferiblemente, la una o más regiones del genoma adenoviral que contienen una o más deficiencias en las funciones génicas esenciales para la replicación de manera deseable son una o más regiones tempranas del genoma adenoviral, es decir, las regiones E1, E2 y/o E4, opcionalmente con una delección parcial o total de la región E3.

[0024] En una modalidad, uno o más nucleótidos endógenos de la región E1 y la región E4 se borran en el vector adenoviral inventivo para hacer que un gen endógeno en la región E1 funcionalmente deficiente y un gen endógeno en la región E4 funcionalmente deficiente (denotado un vector adenoviral deficiente E1/E4). El vector adenoviral según la invención puede comprender una delección en al menos una función génica esencial para la replicación de la región E1 del genoma adenoviral, y preferiblemente comprende una delección de todas las funciones de los genes esenciales para la replicación de la región E1. A este respecto, la delección de la región E1 del vector adenoviral de la invención puede comprender la eliminación de los promotores y las regiones codificantes de los genes endógenos E1A y E1B. La delección de la región E4 comprende deseablemente al menos una función génica esencial para la replicación de la región E4, y preferiblemente comprende una delección de todas las funciones de los genes esenciales para la replicación de la región E4. A este respecto, la

delección de la región E4 del vector adenovírico según la invención puede comprender la eliminación de todos los genes endógenos de la región E4. Además de la delección de la región E1 y la región E4 del genoma adenoviral, uno o más nucleótidos endógenos de la región E3 se pueden eliminar en el vector

5 adenoviral según la invención, y preferiblemente el vector adenoviral de la invención comprende una delección de al menos una función génica de la región E3 no esencial del genoma adenoviral (denota un vector adenoviral E1/E3/E4 deficiente). Además de las delecciones de las regiones E1, E3, y E4 del genoma adenoviral del serotipo 5, el vector adenoviral de la invención también comprende

10 deseablemente una delección en uno de los RNAs asociados a virus (por ejemplo, VA-ARN-1 y/o VA- RNA-2). Preferiblemente, el vector adenoviral de la invención comprende una delección en la región VA-ARN-I. La delección de la región VA-ARN-I puede ser de cualquier tamaño adecuado, pero deseablemente es de 1 a 10 pares de bases, preferiblemente de 1 a 5 pares de bases, y más

15 preferiblemente de 1 a 3 pares de bases, o de un rango definido por cualquiera dos de los valores anteriores. En una modalidad, dos pares de bases se eliminan en la región VA RNA I del vector adenoviral.

[0025] En una modalidad preferida, el genoma del vector adenoviral del serotipo 5 de la invención comprende una delección de nucleótidos de la región E1

20 356-3510, inclusive, una delección de nucleótidos de la región E3 28,593-30,471, inclusive, una delección de la región de nucleótidos E4 32,827-35,563, y una delección de los nucleótidos de la región VA-ARN-1 10.594 y 10595. Sin embargo, otras delecciones pueden ser apropiadas. Por ejemplo, los nucleótidos 356-3329 o 356-3510 se puede eliminar para crear una deficiencia en las funciones de genes

25 E1 esenciales para la replicación, y los nucleótidos 28,594-30,469 se pueden suprimir de la región E3 del genoma adenoviral.

[0026] El vector adenoviral de la invención comprende un espaciador transcripcionalmente inerte (TIS). La secuencia espaciadora transcripcionalmente inerte proporciona un crecimiento de un vector adenoviral de replicación deficiente

30 en diferentes formas (por ejemplo, un vector adenoviral E1/E4-deficiente) en una línea celular de complementación similar a la alcanzada por un vector adenoviral

deficiente en una única función génica esencial para la replicación (por ejemplo, un vector adenoviral E1-deficiente). La secuencia de TIS puede contener cualquier secuencia o secuencias de nucleótidos que son de una longitud deseada, tal como secuencias de al menos aproximadamente 15 nucleótidos (por ejemplo, entre aproximadamente 15 nucleótidos y aproximadamente 12.000 nucleótidos), preferiblemente entre 100 nucleótidos y 10.000 nucleótidos aproximadamente, más preferiblemente entre 500 nucleótidos y 8000 nucleótidos aproximadamente, incluso más preferiblemente entre 1.500 nucleótidos y 6000 nucleótidos aproximadamente, y más preferiblemente entre 2000 y 3000 nucleótidos aproximadamente de longitud, o un rango definido por cualesquiera dos de los valores anteriores. La secuencia TIS puede ser codificante o no codificante y nativa o no nativa con respecto al genoma adenoviral, pero no restaura la función esencial para la replicación a la región deficiente. La TIS también puede contener un casete de expresión.

[0027] En una modalidad, el espaciador transcripcionalmente inerte comprende una secuencia de poliadenilación y/o un gen que no es nativo con respecto al vector adenoviral. El elemento espaciador puede comprender cualquier secuencia de poliadenilación adecuada, tal como, por ejemplo, las secuencias de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH), virus del polio, timidina quinasa (TK), virus de Epstein Barr (EBV), virus del papiloma humano (VPH) y virus del papiloma bovino (BPV). Preferiblemente, la secuencia TIS comprende una secuencia de poliadenilación del virus 40 de simio (SV40). Ejemplos de genes no nativos adecuados para su inclusión en la TIS incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas marcadoras tales como pGUS, fosfatasa alcalina secretora, luciferasa, β -galactosidasa, y anti-tripsina humana; factores terapéuticos; posibles modificadores inmunes tales como B3-19K, E3-14.7, ICP47, ligando fas y CTLA4; secuencias biológicamente inactivas (por ejemplo, secuencias que son (i) no transcritas para producir un producto o (ii) codificar un producto defectuoso o biológicamente inactivo); y otras secuencias inocuas (por ejemplo, el gén α -glucuronidasa).

[0028] Preferiblemente, el TIS comprende en secuencia de 5' a 3' en relación con el genoma adenoviral (i) una secuencia de poliadenilación (poli (A)) y secuencia de terminación de la transcripción de virus 40 de simio (SV40), (ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen de □□glucuronidasa, y (iii) una

5 secuencia de poliadenilación (poli (A)) y secuencia de terminación de la transcripción del gen de la hormona de crecimiento bovino (BGH). El uso de un espaciador transcriptionalmente inerte en un vector adenoviral se describe además en, por ejemplo, la patente EE.UU. 5.851.806 y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 1997/021826.

10 [0029] Mediante la eliminación de la totalidad o parte del genoma adenoviral, por ejemplo, uno o más nucleótidos endógenos de las regiones E1, E3, y E4 del genoma adenoviral, el vector adenoviral resultante es capaz de aceptar insertos de secuencias de ácidos nucleicos exógenos al tiempo que conserva la capacidad para ser empaquetado en cápsidas adenovirales. Una secuencia de ácido

15 nucleico exógeno se puede insertar en cualquier posición en el genoma adenoviral con tal que la inserción en la posición permita la formación de la partícula de vector adenoviral. La secuencia de ácido nucleico exógeno preferiblemente se coloca en la región E1, la región E3, o la región E4 del genoma adenoviral.

[0030] El vector adenoviral de replicación deficiente de la invención se puede

20 producir en líneas celulares de complementación que proporcionan funciones génicas no presentes en el vector adenoviral de replicación deficiente, pero se requiere para la propagación viral, a niveles apropiados a fin de generar altos títulos elevados de material del vector viral. Tales líneas celulares complementarias son conocidas e incluyen, pero no se limitan a, células 293

25 (descritas en, por ejemplo, Graham, *J. Gen. Virol.*, 36:59-72 (1977)), células PER.C6 (descritas en, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 1997/000326, y patentes de Estados Unidos 5,994,128 y 6,033,908), y células 293-ORF6 (descritas en, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 95/34671 y Brough, *J. Virol.*, 71:9206 a 9213

30 (1997)). Otras líneas celulares de complementación adecuadas incluyen células que se han generado para propagar vectores adenovirales que codifican

transgenes cuya expresión inhibe el crecimiento viral en células huésped (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2008/0233650). Se describen células de complementación adecuadas adicionales, por ejemplo, en las patentes EE.UU. 6,677,156 y 6.682.929, y

5 Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 2003/020879. En algunos casos, el genoma celular no necesita comprender secuencias de ácido nucleico, los productos génicos de los cuales se complementan para todas las deficiencias de un vector adenoviral de replicación deficiente. Una o más funciones génicas esenciales para la replicación que carecen de un vector adenoviral de replicación

10 deficiente pueden ser proporcionadas por un virus colaborador, por ejemplo, un vector adenoviral que suministra en *trans* una o más funciones génicas esenciales necesarias para la replicación del vector adenoviral de replicación deficiente. Alternativamente, el vector adenoviral de la invención puede comprender un gen no nativo esencial para la replicación que complementa la una o más funciones

15 génicas esenciales para la replicación ausentes en el vector adenoviral de replicación deficiente de la invención. Por ejemplo, un vector adenoviral E1/E4-deficiente puede modificarse para contener una secuencia de ácido nucleico que codifica E4 ORF 6 que se obtiene o se deriva de un adenovirus diferente (por ejemplo, un adenovirus de un serotipo diferente que el vector adenoviral de la

20 invención, o un adenovirus de una especie diferente que el vector adenoviral de la invención).

[0031] El vector adenoviral de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de homólogo-1 atonal humano (Hath1). Hath1 es un factor asociado atonal. Los factores asociados atonales son factores de

25 transcripción de la familia de de proteínas de proteínas básicas hélice-bucle-hélice (bHLH) que transdiferencian células de apoyo en las células sensoriales del cabello en el oído. El dominio básico de la proteína es responsable de la unión del ADN y la función de la proteína. Los factores asociados atonales se encuentran en una variedad de animales e insectos, incluyendo ratones (homólogo-1 atonal

30 de ratón (*Math1*)), pollos (homólogo-1 atonal de pollo (*Cath1*)), *Xenopus* (homólogo-1 atonal *Xenopus* (*Xath1*)) y humanos (homólogo-1 atonal humano

(*Hath1*)). Proteínas atonales asociadas como Math1 y Hath1 han demostrado ser esenciales para el desarrollo de células del cabello y pueden estimular la regeneración de las células del cabello en el oído (véase, por ejemplo, Groves, *Annu Rev. Neurosci.*, 36:361-381 (2013)). Hath1 se caracteriza además, por ejemplo, Ben-Arie, *Human Molecular Genetics*, 5, 1207-1216 (1996); y Mulvaney, J. y Dabdoub, A, *J. Assoc. Res. . Otolaryngol*, 13 (3): 281-289 (2012), y los factores atonales asociados se describen generalmente en la Solicitud de Patente Internacional WO 00/73764.

[0032] Secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos Hath1 están disponibles al público como, por ejemplo, GenBank números de acceso U61148 (GI No. 1.575.354) y AAB41305.1 (GI No. 1.575.355), respectivamente. Preferiblemente, el vector adenoviral de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 1, que codifica una proteína Hath1.

[0033] Mientras que la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Hath1 comprende la SEQ ID NO: 1, muchas modificaciones y variaciones (por ejemplo, mutación) de la secuencia de ácido nucleico son posibles y apropiadas en el contexto de la invención. Se cree que la función de los factores atonales asociados depende de la porción de hélice-bucle-hélice (HLH) de la proteína, en particular la región básica del dominio HLH (Chien, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 13239-13244 (1996)). Por consiguiente, cualquier modificación de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína Hath1 deseablemente está situada fuera del dominio básico de la proteína tal que la función de la proteína Hath1 es retenida o mejorada.

[0034] Además de la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Hath1, el vector adenoviral de la invención comprende preferiblemente secuencias de control de expresión, tales como promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores de transcripción, sitios de entrada de ribosoma interno (IRES), y similares, que proporcionan la expresión de la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped. Secuencias de control de expresión de ejemplo son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Goeddel, *Tecnología de Expresión de Genes: Métodos en Enzimología*, Vol. 185, Academic

Press, San Diego, California (1990). Idealmente, la secuencia de ácido nucleico que codifica Hath1 está unida operativamente a un promotor y una secuencia de poliadenilación. El promotor deseablemente es un promotor específico a tejido, es decir, un promotor que se activa preferentemente en un tejido dado y resulta en la expresión de un producto génico en el tejido donde se activa. Un promotor específico de tejido para su uso en el vector adenoviral de la invención puede ser elegido con base en el tejido diana o tipo de célula en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica Hath1 se va a expresar. Promotores específicos a tejido preferidos para su uso en el vector adenoviral de la invención son específicos a células de soporte o de las células sensoriales del cabello. Promotores específicos de tejido activados específicamente en células del cabello incluyen, por ejemplo, un promotor atonal o un promotor de miosina VIIa. Promotores específicos de tejido activados específicamente en células de soporte incluyen, por ejemplo, un promotor HES-1 y un promotor de proteína ácida fibrilar glial humana (GFAP). En una modalidad preferida, el promotor es un promotor de GFAP humana que comprende la SEQ ID NO: 2. La proteína GFAP humana es una proteína estructural soluble expresada principalmente en astrocitos del sistema nervioso central, células Schwann no formadoras de mielina, y otros tipos de células seleccionadas. Dentro de la anatomía del oído interno, la expresión de GFAP se limita principalmente a las células de apoyo de los órganos de los sentidos (es decir, las células de Deiter y las células de las falanges del órgano de Corti, las situadas dentro de las ampollas de canal y las células de apoyo de las regiones extrastriales en el utrículo/saccula maculae).

[0035] Otros ejemplos de promotores específicos de tejido que podrían utilizarse en la invención incluyen el promotor BRN.3C, el promotor BRN 3.1, el promotor del factor POU ORF3, el promotor BRK1, el promotor BRK3, El promotor chordin, el promotor noggin, el promotor jagged1, el promotor jagged2 y el promotor notch1.

[0036] Para optimizar la producción de proteínas, la secuencia de ácido nucleico que codifica Hath1 comprende además una secuencia de poliadenilación aguas abajo de la secuencia de codificación de Hath1. Cualquier secuencia de

poliadenilación adecuada se puede utilizar, incluyendo una secuencia sintética optimizada, así como la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH), virus del polio, timidina quinasa (TK), virus de Epstein Barr (EBV), virus del papiloma humano (VPH) y virus del papiloma bovino (BPV). La secuencia de poliadenilación es preferiblemente una secuencia de poliadenilación temprana del virus-40 de simio (SV40), que es la secuencia de poliadenilación de los productos de ARN tempranos de SV40 (véase, ej., Carswell, S. y Alwine, JC, *Mol. Cell. Biol.*, 9(10): 4248-4258 (1989)). Además del promotor y la secuencia de poliadenilación, la secuencia de ácido nucleico que codifica Hath1 comprende deseablemente todas las señales apropiadas de transcripción (y las señales de traducción, en su caso) correctamente dispuesto de tal manera que la secuencia de ácido nucleico se expresa adecuadamente en las células en las que se introduce. Si se desea, la secuencia de ácido nucleico también puede incorporar sitios de empalme (es decir, sitios aceptores de empalme y sitios donantes y empalme) para facilitar la producción de ARNm.

[0037] El promotor específico a tejido, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Hath1, y la secuencia de poliadenilación temprana de SV40 se pueden colocar dentro del vector adenoviral según la invención en cualquier orientación adecuada, siempre que la producción del vector adenoviral no se impida y la secuencia de ácido nucleico que codifica Hath1 se expresa de manera eficiente en las células huésped. En general, el promotor se posicionará aguas arriba de la secuencia de ácido nucleico que codifica Hath1, y la secuencia de poliadenilación temprana de SV40 será posicionada aguas abajo de la secuencia de ácido nucleico que codifica Hath1. En una modalidad, el vector adenovírico puede comprender los elementos antes mencionados en la secuencia de 5' a 3' en relación con el genoma adenoviral: un promotor específico de tejido (ej., un promotor de GFAP humano), la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Hath1, y la secuencia de poliadenilación temprana de SV40. Alternativamente, el vector adenovírico puede comprender los elementos antes mencionados en la secuencia de 3' a 5' en relación con el genoma adenoviral: la secuencia de poliadenilación temprana SV40, la secuencia de ácido nucleico que

codifica una proteína Hath1, y un promotor específico de tejido (por ejemplo, un promotor de GFAP humana). La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Hath1, así como el promotor específico de tejido y una poli (a) secuencia temprana SV40 unida operativamente a la misma, pueden ser insertados en cualquier posición en el genoma adenoviral con tal que la inserción en la posición permita la formación de la partícula de vector adenoviral. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico que codifica Hath1 está posicionada en la región E1 o la región E4 del genoma adenoviral. En una modalidad preferida, la región E1 del genoma adenoviral se sustituye con la secuencia de poliadenilación temprana de SV40, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Hath1, y un promotor de GFAP humana en la secuencia de 3' a 5' en relación con el genoma adenoviral.

[0038] El vector adenoviral según la invención puede comprender la secuencia de ácido nucleico de, por ejemplo, SEQ ID NO: 3

[0039] La invención proporciona una composición que comprende el vector adenoviral descrito en este documento y un vehículo para el mismo (por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable). La composición deseablemente es una composición fisiológicamente aceptable (por ejemplo, farmacéuticamente aceptable), que comprende un vehículo, preferiblemente un vehículo fisiológicamente aceptable (por ejemplo, farmacéuticamente), y el vector adenoviral. Cualquier vehículo adecuado puede ser utilizado en el contexto de la invención, y tales vehículos son bien conocidos en la técnica. La elección del vehículo será determinada, en parte, por el uso particular de la composición (por ejemplo, administración a un animal) y el método particular usado para administrar la composición. Idealmente, en el contexto de vectores adenovirales de replicación deficiente, la composición farmacéutica preferiblemente está libre de adenovirus de replicación competente. La composición farmacéutica opcionalmente puede ser estéril.

[0040] Las composiciones adecuadas incluyen soluciones estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, buffers, y agentes bacteriostáticos, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden

incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. La composición puede presentarse en dosis unitarias o recipientes multi-dosis sellados, tales como ampollas y viales, y se pueden almacenar en una condición secada por congelación (líofilizado) que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua, inmediatamente antes del uso. Las soluciones extemporáneas y suspensiones pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos. Preferiblemente, el vehículo es una solución salina amortiguada. Más preferiblemente, el vector adenoviral es parte de una composición formulada para proteger al vector adenoviral contra daños antes de la administración. Por ejemplo, la composición se puede formular para reducir la pérdida del vector adenoviral en los dispositivos usados para preparar, almacenar o administrar el vector adenoviral, tales como contenedores de cristal, jeringas, o agujas. La composición se puede formular para disminuir la sensibilidad a la luz y/o sensibilidad a la temperatura del vector adenoviral. Para este fin, la composición preferiblemente comprende un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, los descritos anteriormente, y un agente estabilizante seleccionado del grupo que consiste en polisorbato 80, L-arginina, polivinilpirrolidona, trehalosa y combinaciones de los mismos. El uso de tal composición extenderá la vida útil del vector adenoviral, y facilitará su administración. Las formulaciones para composiciones que contienen el vector adenoviral se describen adicionalmente en, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 6.225.289, Patente de Estados Unidos 6.514.943, y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 2000/034444.

[0041] La composición también puede ser formulada para mejorar la eficacia de la transducción. Además, un experto ordinario en la técnica apreciará que el vector adenoviral puede estar presente en una composición con otros agentes terapéuticos o biológicamente activos. Por ejemplo, los factores que controlan la inflamación, tales como ibuprofeno o esteroides, pueden formar parte de la composición para reducir la inflamación asociada con la administración *in vivo* del vector adenoviral. Los antibióticos, es decir, microbicidas y fungicidas, pueden estar presentes para tratar la infección existente y/o reducir el riesgo de infección

en el futuro, tales como la infección asociada con los procedimientos de transferencia de genes.

[0042] La invención también proporciona un método de generar células

sensoriales en el oído interno de un ser humano en necesidad del mismo. El

5 método comprende administrar una composición que comprende el vector

adenoviral de la invención descrito en el presente documento, con lo cual la

secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína Hath1 se expresa y se

generan las células sensoriales en el oído interno. Tal como se usa en el presente

documento, los términos "tratamiento", "tratar", y similares se refieren a la

10 obtención de un efecto farmacológico deseado y/o fisiológico. Preferiblemente, el

efecto es terapéutico, es decir, el efecto cura parcial o completamente una

enfermedad y/o síntoma adverso atribuible a la enfermedad. Para este fin, el

método de la invención comprende administrar al humano una "cantidad

terapéuticamente eficaz" de la composición. Una "cantidad terapéuticamente

15 eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de

tiempo necesarios, para conseguir un resultado terapéutico deseado. La cantidad

terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como el

estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del vector

adenoviral de la invención para provocar una respuesta deseada en el individuo.

20 Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la

invención es una cantidad que resulta en la expresión de la proteína Hath1 a

niveles que tratan la pérdida de audición o un trastorno del equilibrio en un ser

humano.

[0043] Alternativamente, el efecto farmacológico y/o fisiológico puede ser

25 profiláctico, es decir, el efecto evita completa o parcialmente una enfermedad o

síntoma de la misma. A este respecto, el método de la invención comprende la

administración de una "cantidad profilácticamente eficaz" de la composición que

comprende el vector adenoviral según la invención. Una "cantidad

profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y

30 durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir un resultado profiláctico

deseado (por ejemplo, prevenir el inicio de la enfermedad). La eficacia terapéutica

o profiláctica puede monitorizarse mediante la evaluación periódica de los pacientes tratados.

[0044] Las dosis adecuadas y los regímenes de dosificación se pueden

determinar mediante técnicas de búsqueda de intervalo convencionales conocidas

5 por los expertos en la técnica. De manera deseable, una sola dosis de vector

adenoviral comprende 1×10^5 aproximadamente o más partículas (que también se

conocen como unidades de partículas (pu)) del vector adenoviral, por ejemplo,

1×10^6 aproximadamente o más partículas, 1×10^7 aproximadamente o más

partículas, 1×10^8 aproximadamente o más partículas, 1×10^9 aproximadamente o

10 más partículas, o 3×10^8 aproximadamente o más partículas del vector adenoviral.

Alternativamente, o además, una sola dosis de vector adenoviral comprende

3×10^{14} partículas aproximadamente o menos del vector adenoviral, por ejemplo,

1×10^{13} partículas aproximadamente o menos, 1×10^{12} partículas aproximadamente

o menos, 3×10^{11} partículas aproximadamente o menos, 1×10^{11} partículas

15 aproximadamente o menos, 1×10^{10} partículas aproximadamente o menos, o 1×10^9

partículas aproximadamente o menos del vector adenoviral. Por lo tanto, una sola

dosis de vector adenoviral puede comprender una cantidad de partículas del

vector adenoviral en un rango definido por dos valores cualquiera de los

mencionados anteriormente. Por ejemplo, una sola dosis de vector adenoviral

20 puede comprender 1×10^5 - 1×10^{14} partículas, 1×10^7 - 1×10^{12} partículas, 1×10^8 - 1×10^{11}

partículas, 3×10^8 - 3×10^{11} partículas, 1×10^9 - 1×10^{12} partículas, 1×10^9 - 1×10^{11}

partículas, 1×10^9 - 1×10^{10} partículas, o 1×10^{10} - 1×10^{12} partículas, del vector

adenoviral. En otras palabras, una sola dosis de vector adenoviral puede

comprender, por ejemplo, 1×10^6 pu, 2×10^6 pu, 4×10^6 pu, 1×10^7 pu, 2×10^7 pu, 4×10^7

25 pu, 1×10^8 pu, 2×10^8 pu, 3×10^8 pu, 4×10^8 pu, 1×10^9 pu, 2×10^9 pu, 3×10^9 pu, 4×10^9

pu, 1×10^{10} pu, 2×10^{10} pu, 3×10^{10} pu, 4×10^{10} pu, 1×10^{11} pu, 2×10^{11} pu, 3×10^{11} pu ,

4×10^{11} pu, 1×10^{12} pu, 2×10^{12} pu, 3×10^{12} pu, o 4×10^{12} pu aproximadamente del

vector adenoviral. Por supuesto, otras vías de administración pueden requerir

dosis menores o mayores para conseguir un efecto terapéutico. Cualesquiera

30 variaciones necesarias en las dosis y vías de administración pueden ser

determinadas por el experto en la materia utilizando técnicas de rutina conocidas en la técnica.

[0045] El espacio interior de las estructuras del oído interno es limitado. El volumen de la composición farmacéutica administrado directamente en las estructuras del oído interno, deberá supervisarse cuidadosamente, debido a que forzar demasiado la composición puede dañar el epitelio sensorial. Para un paciente humano, el volumen administrado es preferiblemente 1 μ l a 500 μ l aproximadamente (por ejemplo, de 10 μ l a 400 μ l aproximadamente) de la composición. Por ejemplo, de 10 μ l a 200 μ l aproximadamente (por ejemplo, 15 μ l, 20 μ l, 30 μ l, 40 μ l, 50 μ l, 60 μ l, 70 μ l, 80 μ l, 90 μ l, 100 μ l, 125 μ l, 150 μ l, 175 μ l aproximadamente, o un rango definido por dos cualesquiera de los valores anteriores) de composición pueden ser administrados. En una modalidad, todo el contenido de fluidos de la estructura del oído interno, por ejemplo, la cóclea o canales semicirculares, es reemplazado con la composición farmacéutica. En otra modalidad, una composición farmacéutica que comprende el vector de expresión del método de la invención se libera lentamente dentro de la estructura del oído interno, de manera tal que el trauma mecánico se reduce al mínimo.

[0046] En una modalidad del método de la invención, la composición que comprende el vector adenoviral que codifica Hath1 deseablemente se administra sólo una vez en el oído interno del ser humano durante un período de tratamiento dado. En otras palabras, el método de la invención comprende la administración de una sola dosis del vector adenoviral de la invención en el oído interno de un ser humano. En otras modalidades, puede ser ventajoso administrar la composición dos o más (es decir, múltiples) veces al oído interno del ser humano. Por lo tanto, la invención proporciona la administración de dos o más dosis del vector adenoviral de la invención en el oído interno de un ser humano. Por ejemplo, la composición que comprende el vector adenoviral de la invención puede administrarse al menos dos veces en el mismo oído. Cuando la composición se administra múltiples veces al oído interno de un ser humano, cada administración se puede separar por días, semanas, meses, o incluso años dependiendo de la respuesta del ser humano a la primer administración y administraciones

posteriores de la composición. Por ejemplo, las múltiples administraciones pueden ser separadas por 1 semana a 4 semanas aproximadamente (por ejemplo, 2 o 3 semanas), o por 30 días a 90 días aproximadamente (por ejemplo, 40 días, 50 días, 60 días, 70 días, 80 días aproximadamente, o un rango definido por dos cualesquiera de los valores anteriores). Sin embargo, administraciones múltiples de la composición (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, o más administraciones) pueden ser separadas por cualquier número adecuado de días (por ejemplo, 2, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 85 o más días entre las dosis), meses (por ejemplo, 1, 3, 6, o 9 meses entre las dosis), o años (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más años entre las dosis) con tal que la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína Hath1 se exprese suficientemente y se generen células sensoriales en el oído interno.

[0047] La composición deseablemente es administrada a un humano para tratar un trastorno asociado con pérdida, daño o ausencia de células sensoriales del cabello en el oído interno, tales como pérdida de audición y trastornos de equilibrio. A este respecto, la composición puede ser administrada a un ser humano que padece pérdida o un trastorno del equilibrio, o de un ser humano que padece tanto de pérdida de audición como de trastorno de equilibrio. La pérdida de audición puede ser causada por daño de las células del cabello del órgano de Corti debido a la infección bacteriana o viral, herencia, lesión física, trauma acústico, y similares. Mientras que la pérdida de audición se identifica fácilmente, los trastornos relacionados al equilibrio se manifiestan en una amplia variedad de complicaciones fácilmente atribuibles a otras enfermedades. Los síntomas de un trastorno del equilibrio incluyen desorientación, mareo, vértigo, náuseas, visión borrosa, torpeza y caídas frecuentes. Los trastornos del equilibrio tratados mediante el método de la invención implican preferentemente un trastorno vestibular periférico (es decir, una alteración en el aparato vestibular) que implica la traducción disfuncional de estímulos mecánicos en impulsos nerviosos debido a daños o falta de las células sensoriales del cabello. En modalidades, la composición se administra a un ser humano para tratar la pérdida de audición bilateral de severa a profunda.

[0048] La composición se puede administrar al oído interno de un ser humano utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. El oído interno en los seres humanos está compuesto por el laberinto óseo, que es un sistema de pasajes que comprenden dos partes principales: (a) la cóclea dedicada a la audición y (b) el sistema vestibular dedicado al equilibrio. La composición deseablemente se administra a la cóclea o el sistema vestibular, o tanto a la cóclea como al sistema vestibular. No importa la vía de administración, el vector adenoviral de la invención debe alcanzar el epitelio sensorial del oído interno, por ejemplo, el epitelio sensorial de la cóclea y/o sistema vestibular. Las rutas más directas de administración, por lo tanto, implican procedimientos quirúrgicos que permiten el acceso al interior de las estructuras del oído interno. La inoculación a través de cocleostomía permite la administración del vector de expresión directamente a las regiones del oído interno relacionadas con la audición. La cocleostomía implica la perforación de un agujero a través de la pared coclear, por ejemplo, en la cápsula óptica debajo de la arteria estapedial como se describe en Kawamoto, *Molecular Therapy*, 4(6), 575-585 (2001), y la liberación de la composición que comprende el vector adenoviral. La administración al compartimiento endolinfático es particularmente útil para la administración de la composición a las áreas del oído interno responsables de la audición. Alternativamente, la composición se puede administrar a los canales semicirculares a través de canalostomía. La canalostomía proporciona la expresión del transgén en el sistema vestibular y la cóclea, mientras que la cocleostomía no proporciona la transducción eficiente en el espacio vestibular. El riesgo de daño a la función coclear se reduce usando la canalostomía tanto como la inyección directa en el espacio coclear puede resultar en daño mecánico a las células del cabello (Kawamoto, *Supra*). Los procedimientos de administración también se pueden realizar con fluido (por ejemplo, perilinfa artificial), que puede comprender factores para aliviar los efectos secundarios del tratamiento o procedimiento de administración, tales como inhibidores de la apoptosis o antiinflamatorios.

[0049] Otra vía directa de administración al oído interno es a través de la ventana redonda, ya sea por inyección o aplicación tópica en la ventana redonda. La administración a través de la ventana redonda es especialmente preferida para la entrega de un vector adenoviral al espacio perilinfático. La expresión del transgen en neuronas vestibulares y cocleares y epitelios sensoriales cocleares se ha observado después de la administración de vectores de expresión a través de la ventana redonda (Staecker, *Acta Otolaryngol*, 121, 157-163 (2001)). En otra modalidad, la composición se puede administrar al oído interno a través de una infusión intra-laberíntica (IL) a través de la ventana oval para la entrega de la composición en el espacio perilinfático. En ciertos casos, puede ser apropiado administrar múltiples aplicaciones y/o emplear rutas múltiples, por ejemplo, canalostomía y cocleostomía, para asegurar una exposición suficiente de células de soporte al vector adenoviral. Un método particularmente preferido para la entrega de la composición de la invención en el oído interno se describe en, por ejemplo, la patente estadounidense 7.387.614.

[0050] La composición que comprende el vector adenoviral según la invención puede estar presente en o sobre un dispositivo que permite la liberación controlada o sostenida del vector adenovírico, tal como una esponja, malla, depósito mecánico o bomba, o implante mecánico. Por ejemplo, una esponja biocompatible o una forma de gel empapada en la composición que comprende el vector adenoviral se puede colocar adyacente a la ventana redonda, a través de la cual el vector de expresión se permea para llegar a la cóclea (como se describe en Jero, *Hum. Gene Ther.*, 12: 539-548 (2001)). En otra modalidad, se pueden utilizar bombas mini-osmóticas para proporcionar una liberación sostenida del vector adenoviral en períodos de tiempo extendidos (ej., de cinco a siete días), permitiendo pequeños volúmenes de la composición que comprende el vector adenoviral a ser administrado, que puede prevenir el daño mecánico a células sensoriales endógenas. La composición también se puede administrar en forma de formulaciones de liberación sostenida (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.378.475) que comprende, por ejemplo, gelatina, sulfato de condroitina,

un polifosfoéster, tal como bis-2-hidroxietil-tereftalato (BHET), o un ácido poliláctico-glicólico.

[0051] Aunque no se prefiere, la composición que comprende el vector adenoviral de la invención puede administrarse por vía parenteral, intramuscular, intravenosa, o intraperitoneal. Si se administra por vía parenteral a un paciente, el vector adenoviral de manera deseable se dirige específicamente a las células epiteliales sensoriales, tales como células de soporte. Por ejemplo, el vector adenoviral puede dirigirse a epitelio sensorial cicatrizado para promover la generación de las células del cabello exógenas para reemplazar células del cabello endógenas dañadas. Un vector adenoviral puede ser modificado para alterar la especificidad de unión o el reconocimiento de un vector de expresión para un receptor en una célula huésped potencial mediante la eliminación de regiones de la fibra, pentón o hexón, la inserción de diversos ligandos nativos o no nativos en porciones de la proteína de recubrimiento, y similares. Un experto común en la técnica apreciará que la administración parenteral puede requerir grandes dosis o múltiples administraciones para entregar eficazmente el vector de expresión a las células huésped apropiadas.

[0052] En una modalidad, el método de la invención comprende la administración de una sola dosis que comprende entre aproximadamente 20 μ l y 90 μ l de la composición de la invención (a una concentración de 5.0×10^{11} partículas (vp)/ml de vector adenoviral) a un ser humano a través de infusión intralaberíntica (IL).

[0053] En una modalidad, el método de la invención comprende la administración de una sola dosis que comprende entre aproximadamente 20 μ l y 90 μ l de la composición de la invención (a una concentración de 5.0×10^{11} partículas (vp)/ml de vector adenoviral) a un ser humano a través de infusión intralaberíntica (IL) a una tasa de infusión de entre 10 μ L/minuto y 20 μ L/minuto aproximadamente.

[0054] El método de la invención puede ser parte de un régimen de tratamiento que implica otras modalidades terapéuticas. Por ejemplo, el método de la invención se puede realizar en un ser humano que ha sido tratado, se está

tratando, o será tratado con uno o más fármacos o cirugía. Además, el método de la invención puede ser utilizado en conjunción con agentes de proliferación que inducen proliferación de células de soporte en el oído interno, tales como factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), E2F, y reguladores del ciclo celular. El método de la invención también puede realizarse en conjunto con la implantación de dispositivos de audición, tales como implantes cocleares.

[0055] La generación de células sensoriales (por ejemplo, células del cabello) en el oído interno se puede determinar utilizando una variedad de medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células sensoriales del cabello se pueden detectar a través de microscopía electrónica de barrido o por medio de la detección de la miosina VIIa, que es una proteína específica a la célula del cabello detectada por inmunoquímica. Sin embargo, la mera presencia de células sensoriales del cabello no implica necesariamente un sistema funcional para el reconocimiento de los estímulos ambientales. Las células sensoriales funcionales deben ser unidas operativamente a las vías neurales, de tal manera que los estímulos mecánicos se convierten en impulsos nerviosos reconocidos por el cerebro. En consecuencia, mientras que la detección de la generación de células del cabello es apropiada para determinar la expresión exitosa de la secuencia de ácido nucleico que codifica *Hath1* al tejido diana, la generación de células sensoriales conduce preferiblemente a una mejora en la percepción sensorial por el sujeto humano. En este sentido, el examen de la conciencia del sujeto es un indicador de los cambios en la percepción sensorial.

[0056] Un cambio en la capacidad de un sujeto para detectar el sonido se puede evaluar mediante la administración de pruebas de audición simples, tales como una prueba de tonos comúnmente administrada por un audiólogo. En la mayoría de los mamíferos, una reacción a diferentes frecuencias indica un cambio en la percepción sensorial. En los seres humanos, la comprensión del lenguaje también es apropiada. Por ejemplo, es posible que un sujeto pueda escuchar mientras es incapaz de entender el habla. Un cambio en la percepción sensorial se indica mediante la capacidad de distinguir los diferentes tipos de estímulos

acústicos, tal como diferenciar el lenguaje del ruido de fondo, y mediante la comprensión del habla. Pruebas de umbral y discriminación del habla son útiles para este tipo de evaluaciones.

[0057] Evaluación de los cambios en el equilibrio, conciencia de movimiento, y/o sincronización de la respuesta a los estímulos de movimiento también se pueden lograr usando una variedad de técnicas. La función vestibular se puede medir mediante la comparación de la magnitud de la respuesta al estímulo de movimiento (ganancia) o el momento de inicio de la respuesta (fase). Los animales pueden ser probados para ganancia y fase del Reflejo Vestibulo-Ocular (VOR) usando bobinas de búsqueda esclerales para evaluar las mejoras en la percepción sensorial. La electronistagmografía (ENG) registra los movimientos del ojo en respuesta a estímulos tales como, por ejemplo, luces en movimiento o de parpadeo, reposicionamiento corporal, movimiento del fluido dentro de los canales semicirculares y similares. Evaluación del equilibrio durante el movimiento utilizando una silla giratoria o plataforma móvil también es útil en este respecto.

[0058] Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero, por supuesto, no deben interpretarse de ningún modo como limitantes de su alcance.

EJEMPLO 1

[0059] Este ejemplo demuestra un método de generación del vector adenoviral del serotipo 5 según la invención.

[0060] Un vector de adenovirus que comprende un genoma adenoviral del serotipo 5 con una delección de las regiones E1, E3, y E4 y que codifica la proteína Hath1 se construyó usando el protocolo ADFAST™ descrito en la patente EE.UU. 6.475.757. Usando el procedimiento ADFAST™, se construyó un plásmido que codifica un genoma del vector de adenovirus del serotipo 5 entero. El aislamiento de un único clon genético del genoma vector final se logró mediante dos etapas secuenciales de crecimiento de colonias en las bacterias. Este plásmido AdFast™ se convirtió en un vector viral tras la introducción en células mamíferas que complementan el crecimiento del vector de adenovirus. A continuación, se realizó la expansión subsiguiente a través de pasaje en serie para generar stocks de

vectores de adenovirus. Los pasos para la construcción del vector adenoviral del serotipo 5 que expresa Hath1 se resumen a continuación.

Construcción de los Plásmidos

- 5 Un plásmido denotado pAd3511gfa2.HATH1.sv se digirió con enzimas de restricción para extraer en gel un casete de expresión GFAP.HATH1. Un plásmido de base que comprende un genoma adenoviral del serotipo 5 con deleciones en las regiones E1, E3, y E4 y un espaciador transcripcionalmente inerte que contiene un poli SV40 (A) y secuencias de terminación de la transcripción, un gen de β -glucuronidasa, y un gen de la hormona de crecimiento bovino (BGH) poli (A) y secuencias de terminación de la transcripción (denotadas pAdE1 (BN) E3 (10) E4 (TIS1)) fue linealizado y purificado. El plásmido pAdE1 (BN) E3 (10) E4 (TIS1) fue recombinado homológamente con el casete de expresión GFAP.HATH1 en *E. coli*, dando como resultado el plásmido pAdE1 (GFAP.Hath1)E3(10)E4(TIS1).
- 15 **[0061]** Para asegurar la clonalidad del plásmido de vector de adenovirus de longitud completa, se utilizó una alícuota del plásmido de ADN pAdE1 (GFAP.Hath1)E3(10)E4(TIS1) AdFast™ para transformar *E. coli* de DH10B mediante la limitación de diluciones en serie. Colonias bien definidas y aisladas se seleccionaron de la placa de dilución más alta que contiene la menor cantidad de colonias. El plásmido de ADN miniprep se preparó y digirió con Hind III+SpeI para confirmar la integridad del plásmido mediante análisis RFLP. El ADN miniprep correspondiente positivo se utilizó para generar otra serie de diluciones limitantes, que se utilizaron luego para transformar DH10B de *E. coli*. Una alícuota de un cultivo líquido de una sola colonia en la placa que contiene el menor número de colonias se utilizó para generar ADN miniprep, después de lo cual se utilizó ApaI para confirmar adicionalmente la integridad del plásmido. El cultivo líquido restante del clon positivo se utilizó para marcar una placa de LB-kanamicina. Un transformante bacteriano único se amplió para la preparación de ADN de plásmido EndoFree AdFast™ por el Kit Plasmid Maxi HISPEED™ (Qiagen, Venlo, Países Bajos) siguiendo el protocolo del fabricante. La preparación de plásmido resultante se confirmó mediante la digestión de la endonucleasa de restricción
- 25
- 30

BglI, EcoRV, HindIII, KpnI, y BamHI+PacI. Un mapa de la pAdE1 (GFAP.Hath1)E3(10)E4(TIS1) se muestra en la Figura 1. Después se determinó la secuencia de ADN de pAdE1(GFAP.Hath1)E3(10)E4 (TIS1).

5 *Conversión de Vectores*

[0062] 18 µg de la pAdE1(GFAP.HATH1)E3(10)E4(TIS1) libre de endotoxinas se digirió en 300µL con endonucleasa de restricción Pac I y se purificó mediante fenol cloroformo isoamíalcohol (PCI). Brevemente, se añadió 100uL de PCI a la reacción de restricción, se mezcló por inversión vigorosa, se centrifugó a 13.000 rpm durante dos minutos en una microcentrífuga, y la fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo. El ADN se precipitó por la adición de 30µL (0.1 volúmenes) de NaCl 5M y 800µL de etanol absoluto, se incubó en hielo durante 10 minutos, y luego se centrifugó en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante se decantó. El sedimento se lavó con 500µL de etanol al 70%, se centrifugó y se decantó como antes y el sedimento de ADN se secó al aire. El ADN se resuspendió en 30µL de TE y la concentración de ADN se determinó por absorbancia a 260 nm. Las células 293-ORF6 fueron transfectadas con 4 µg del ADN digerido y purificado por Pac I utilizando el reactivo Polyfect™ (Qiagen, Venlo, Países Bajos), y se incubaron a 37°C, CO₂ al 5%, durante tres días. Se utilizó el lisado de transfección (generado por tres ciclos de congelación-descongelación) para iniciar el pasaje serial para generar lisado de alta titulación. Después de la confirmación por PCR, se usó el lisado de alta titulación para expandir el adenovector AdGFAP.HATH1.11D.

25 *Construcción del Vector Adenoviral AdGFAP.HATH1.11D*

[0063] Para construir el vector adenoviral AdGFAP.HATH1.11D, también conocido como GV501A (un mapa de éste se muestra en la Figura 2) y CGF166, el plásmido AdFast™ pAdE1(GFAP.HATH1) E3(10)E4(TIS1) se digirió con la endonucleasa de restricción PacI y se transfectó en células 293-ORF6 utilizando procedimientos estándar. El lisado de adenovector de las células transfectadas se pasó en serie cinco veces para expandir el título y el volumen del lisado

AdGFAP.HATH1.11D.GV501A y producir un stock de alta titulación (HT2). Las células 293-ORF6 utilizadas para la transfección y construcción de GV501A se mantuvieron en un espacio de cultivo de células de acceso limitado para asegurar la separación de otras actividades. Además, la transfección, el pasaje serial, y la producción del vector AdGFAP.HATH1.11D/GV501A se llevaron a cabo en espacio de cultivo de virus separado bajo los procedimientos para mantener la separación y el acceso limitado. La identidad e integridad del vector AdGFAP.HATH1.11D/GV501A se confirmó por análisis PCR en el pasaje de HT2. A continuación se usó el lisado de HT2 para generar las expansiones del stock de adenovector.

Ensayos de expresión de Transgenes Hath1

[0064] El vector AdGFAP.HATH1.11D fue certificado para la expresión de transgenes funcionales con base en la regeneración celular sensorial promovida por HATH1 en un modelo de utrículo de ratón. Los resultados de este experimento demostraron que el vector AdGFAP.HATH1.11D fue capaz de inducir la regeneración de células sensoriales, y por lo tanto la proteína HATH1 funcional producida. Además, AdGFAP.HATH1.11D se probó para la expresión de ARNm del transgén Hath1 usando un ensayo de expresión de ARNm Hath1 modificado. El ensayo implicaba infectar células 293 con AdGFAP.HATH1.11D y aislar ARN total 24 horas post-infección. La expresión de ARNm específico a Hath1 se midió mediante un método de RT-PCR semi-cuantitativo. Los resultados de este ensayo mostraron evidencia de expresión de Hath1 con base en cebadores y sondas observados de ARN/ADN y de ADN solamente.

[0065] Los resultados de este ejemplo confirman la generación de un vector adenoviral del serotipo 5 en el que se han eliminado uno o más nucleótidos endógenos de la región E1 y la región E4, y que comprende una secuencia de poliadenilación temprana SV40, una secuencia de ácido nucleico que codifica Hath1 operativamente unida a un promotor de GFAP humana, y un separador transcripcionalmente inerte (TIS).

EJEMPLO 2

[0066] Este ejemplo describe un estudio clínico diseñado para evaluar la seguridad, tolerabilidad, y la capacidad potencial de CGF166 (AdGFAP.HATH1.11D) entregado a través de infusión intra-laberíntica (IL) para mejorar la audición y la función vestibular en los seres humanos.

[0067] El ensayo clínico será un estudio de tres partes que utiliza una etiqueta abierta, dosis única, cohorte secuencial en pacientes con pérdida auditiva bilateral de severa a profunda con la función vestibular intacta en el oído no operativo. Se requirió que los pacientes tuvieran una pérdida auditiva bilateral de severa a profunda no fluctuante antes de la inscripción. Un máximo de 45 pacientes pueden ser inscritos en este ensayo de tres partes y seis cohortes.

[0068] La parte A del ensayo evaluará la seguridad y tolerabilidad así como la eficacia potencial después de una única dosis de IL de 20 μ L de concentración de CGF166 (5.0×10^{11} partículas virales (vp)/ml). El reclutamiento de pacientes será escalonado de manera que una revisión de datos de seguridad se puede completar después de cada paciente tratado (aproximadamente 4 semanas después del tratamiento) antes de la dosificación de cada paciente subsiguiente.

[0069] La parte B del ensayo incluirá un diseño de escalada volumétrica para evaluar hasta cuatro volúmenes de infusión posibles (entre 20 μ l y 90 μ l) de la misma concentración de CGF166 (5.0×10^{11} pv/mL) en cuatro cohortes de pacientes ($n = 3$ /cohorte; total de 12 pacientes). Todos los volúmenes de dosis estarán sujetos a cambios con base en datos de seguridad del ensayo.

[0070] Cada cohorte subsiguiente se dosifica sólo después de que el volumen entregado en la cohorte anterior se considera seguro y tolerable según lo determinado por un Comité de Revisión de Seguridad (SRC). Además, la programación y dosificación del primer paciente en cada cohorte serán escalonados para permitir al menos un intervalo de cuatro semanas entre el tratamiento de los dos pacientes restantes en cada cohorte.

[0071] El volumen seguro y tolerable más alto determinado en la Parte B será utilizado para la infusión de IL en pacientes de la Parte C. Se requiere un total de 20 pacientes para la Parte C del presente estudio. Una revisión de seguridad

análoga a la descrita para las partes A y B se llevará a cabo cada vez que un bloque de cinco sujetos completa las primeras cuatro semanas de las evaluaciones del estudio.

5 [0072] Los pacientes serán sometidos a las mismas evaluaciones y horario de visitas requeridos en el protocolo en todas las partes del ensayo (A-C). Parte C del estudio sólo comenzará una vez que la seguridad y tolerabilidad preliminar se hayan establecido para CGF166 y los métodos de entrega asociados en pacientes en las Partes A y B.

10 [0073] La duración del ensayo consistirá en un periodo de selección de 63 días seguido de un período de evaluación inicial de 1-3 días y la dosis quirúrgica interna / período de evaluación postoperatorio (aproximadamente 6-14 días), seguido de un período de evaluación después de la dosis de 6 meses. Además, todos los sujetos dosificados en las Partes A-C serán avisados de la oportunidad de inscribirse en un ensayo de seguimiento de seguridad independiente de 5 años.

15 [0074] Durante el periodo de selección, la elegibilidad de los pacientes potenciales se comprobó en los centros de estudio.

20 [0075] Los posibles pacientes serán evaluados para la aptitud antes de someterse a la cirugía requerida según el protocolo y para la terapia planificada con base en el examen físico, MRI, la historia médica actual/pasada, y pruebas de laboratorio. Durante el periodo de selección, los pacientes potenciales también serán sometidos a pruebas de calidad de vida, auditivas y de la función vestibular antes del tratamiento.

25 [0076] Al menos dos consultas externas durante el periodo de selección se anticipan con el fin de completar la verificación y evaluaciones requeridas. Si todas las evaluaciones de selección se pueden completar en una sola visita, se permite. Visitas externas adicionales (es decir, más de dos visitas) están permitidas dependiendo de los pacientes y el esquema clínico y la necesidad de nuevas verificaciones y pruebas adicionales potenciales.

30 [0077] Basándose en las evaluaciones de selección, un oído será seleccionado como el oído de estudio y se someterá a la cirugía de estudio requerida. Criterios para la selección del oído de estudio incluyen: (1) el oído con pérdida auditiva

más grave según lo determinado por audiometría de tonos puros y la puntuación de reconocimiento de voz y (2) si ambos oídos tienen la misma gravedad de la pérdida de audición, entonces el oído de estudio será seleccionado según la preferencia del investigador.

- 5 [0078] Al término de las visitas de selección, los pacientes elegibles serán programados para una visita inicial y la cirugía.

Estado inicial (día -3 a -1)

- 10 [0079] Los pacientes elegibles volverán al centro de estudio en la línea base (día -3 a -1) y se someten a preparación preoperatoria, así como evaluaciones funcionales pre-tratamiento.

Visita Día 1:

- 15 [0080] El Día 1, los pacientes del estudio se someterán a las evaluaciones de protocolo requeridas y la estapedotomía para la entrega del fármaco del estudio al espacio perilinfático que es la scala vestibuli del oído interno. A la finalización de la cirugía e infusión del fármaco de estudio, los pacientes del estudio se recuperarán en las instalaciones pos operativas del centro quirúrgico y se someterán a evaluaciones posteriores a la cirugía. Los pacientes del estudio pueden ser transferidos a cualquier unidad de hospitalización del centro quirúrgico o alojamiento temporal pre-dispuesto cerca del centro quirúrgico.
- 20

Visitas día 2 a día 6

- 25 [0081] Los pacientes del estudio serán seguidos durante los siguientes 5 días después de la cirugía (día 2 al día 6) y se someterán a evaluaciones de seguimiento de seguridad requeridas por el protocolo. Los pacientes del estudio serán dados de alta si no hay eventos adversos significativos que requieren monitorización prolongada. Los pacientes tendrán la opción de permanecer en el alojamiento previsto hasta la finalización de la visita del día 14. Las subsiguientes visitas serán programadas con los pacientes del estudio antes de ser dados de alta.

- 30 Visiita Día 14:

[0082] Los pacientes del estudio regresarán al centro de estudio para sacar el empaque quirúrgico de su oreja y también se someterán a evaluaciones requeridas por el estudio. Los pacientes serán dados de alta al final de todas las evaluaciones requeridas por el estudio. Se recordará a los pacientes de su próxima visita programada.

Seguimiento y final de las visitas de estudio (cada cuatro semanas)

[0083] Durante cada visita mensual al centro de estudio, la recuperación post-operatoria del oído de estudio será supervisada y evaluada. Los pacientes del estudio también se someterán a pruebas de seguridad, calidad de vida, funciones auditivas y vestibulares requeridas por el estudio durante cada visita. También se recolectarán muestras de sangre de biodistribución durante cada visita. Las muestras para pruebas de inmunogenicidad se recogerán según el registro de sangre. Al término de la visita pos cirugía de seis meses (final de la visita de estudio), si no hay eventos adversos significativos que requieren monitorización prolongada, se considera que los pacientes del estudio han completado el estudio y serán dados de alta a su domicilio.

[0084] Se espera que todos los pacientes que recibieron dosis participen en un ensayo de extensión/seguimiento separado.

Comentarios de Datos de Seguridad

[0085] Antes de la dosificación de cada paciente en la Parte A (cohorte 1) y antes de la dosificación los dos pacientes restantes en la Parte B (cohortes 2-5), una revisión de todos los datos de seguridad y tolerabilidad, así como una revisión de datos auditivos y datos de la función vestibular seleccionados se llevará a cabo. Los datos considerados para la revisión serán los disponibles hasta cuatro semanas después de la dosis, como se indica en el cuadro SRC. La seguridad y tolerabilidad se deben evaluar como satisfactoria con el fin de proceder con el resto de pacientes en la cohorte. Para las cohortes 2-5, la decisión de dosificar los dos pacientes restantes se hará mediante el SRC. Si se encuentran eventos adversos notables o preocupaciones de seguridad en uno de los niveles de dosis planificados, el siguiente nivel de dosis planificado puede ser cambiado.

[0086] Tras la finalización de una cohorte y antes de pasar a la próxima cohorte, una revisión de todos los datos de seguridad y tolerabilidad, así como datos auditivos y vestibulares limitados se llevará a cabo para todos los pacientes que recibieron una dosis de CGF166 y que han completado por lo menos 4
5 semanas de las evaluaciones del estudio. La seguridad y tolerabilidad se deben evaluar como satisfactorias con el fin de proceder a la siguiente cohorte. Esta decisión será tomada por el SRC. Si se encuentran eventos adversos notables o preocupaciones de seguridad en uno de los niveles de dosis planificados, el siguiente nivel de dosis planificado puede ser cambiado.

10 [0087] Para la Parte C, la revisión de seguridad descrita anteriormente se llevará a cabo a medida que cada cinco sujetos completan sus primeras cuatro semanas de evaluaciones del estudio.

[0088] Hallazgos

[0089] Los primeros pacientes tratados con 20 a 40 uL de la composición de la
15 invención bajo las cohortes A, B, y C han reportado de entre 0 y 3 eventos adversos cada uno - todos clasificados como leves a moderados durante 2-6 meses de seguimiento. La mayoría de los eventos adversos, incluyendo todos los eventos clasificados como moderados, no eran sospechosos de estar asociados con el tratamiento. Además, no se produjeron cambios clínicamente significativos
20 en los valores de laboratorio después del tratamiento con la composición. Estos resultados indican que la composición de la invención es segura cuando se administra a un ser humano.

[0090] Este ejemplo describe un protocolo clínico diseñado para evaluar la seguridad y eficacia del vector adenoviral según la invención para el tratamiento
25 de la pérdida de audición en seres humanos.

[0091] Todas las referencias, incluyendo publicaciones, solicitudes de patente y patentes, citadas en la presente se incorporan como referencia en la misma medida que si cada referencia se indicara individual y específicamente para ser
30 incorporada como referencia y expuesta en su totalidad en el presente documento.

[0092] El uso de los términos "un", y "una", y "al menos uno" y referencias similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) son para cubrir formas tanto singulares como plurales a menos que se indique lo contrario o claramente sea contradicho por el contexto. El uso del término "al menos uno", seguido por una lista de uno o más elementos (por ejemplo, "al menos uno de A y B") se ha de interpretar en el sentido de un elemento seleccionado de los elementos de la lista (A o B) o cualquier combinación de dos o más de los elementos enumerados (A y B), a menos que se indique lo contrario en este documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos "que comprende", "que tienen", "que incluye", y "que contiene" deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significa "incluyendo, pero no limitado a") a menos que se indique lo contrario. La recitación de intervalos de valores en el presente documento están destinados simplemente a servir como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del rango, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se citara individualmente en este documento. Todos los métodos descritos en la presente pueden realizarse en cualquier orden apropiado a menos que se indique lo contrario en la presente o de otra manera sea contradicho claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los Ejemplos, o terminología de ejemplo (ej., "tal como") proporcionada en la presente pretende solamente ilustrar mejor la invención y no implica limitación sobre el alcance de la invención de otra manera reivindicada. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como una indicación de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

[0093] Las modalidades preferidas de esta invención se describen en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Las variaciones de estas modalidades preferidas pueden resultar evidentes para aquellos de experiencia ordinaria en la técnica al leer la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores pretenden que la

invención pueda ser practicada de manera distinta a la descrita específicamente en este documento. Por consiguiente, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto expuesta en las reivindicaciones adjuntas a la misma según lo permitido por la ley aplicable. Por
5 otra parte, cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas las variaciones posibles de los mismos está abarcada por la invención a menos que se indique lo contrario en este documento o se contradiga claramente por el contexto.