

**CONSTRUCCIONES DE VECTORES VIRALES ADENO-ASOCIADOS DE GLUT1
RECOMBINANTES Y MÉTODOS RELACIONADOS PARA RESTABLECER LA
EXPRESIÓN DE GLUT1**

5 **REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º de serie 62/130,899, presentada el 10 de marzo de 2015, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta
10 referencia.

DECLARACIÓN DE APOYO GUBERNAMENTAL

La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno conforme a la concesión número R01 NS057482 otorgada por el
15 Instituto Nacional de Salud. El gobierno puede tener determinados derechos con respecto a la presente invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que
20 se presentó de forma electrónica en formato ASCII y se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Dicha copia de ASCII, creada el 4 de marzo de 2016, se denomina 01001-003887-W00_SL.txt y tiene un tamaño de 189,953 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a construcciones de vectores virales adeno-asociados (AAV) de Glut1 recombinantes y métodos relacionados para restablecer la expresión de Glut1 en mamíferos con deficiencia de Glut1.

ANTECEDENTES

La glucosa es la principal fuente de energía para el cerebro mamífero. El transportador de glucosa 1 (Glut1), también conocido como familia portadora de solutos 2 es el transportador de glucosa predominante expresado en la barrera hematoencefálica (BBB), es responsable del ingreso de la glucosa en el cerebro, y es el primer miembro identificado de la familia de transportadores de glucosa facilitados (SLC2A). El gen humano *SLC2A1* que codifica la proteína Glut1 se ha localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p34.2) y tiene una longitud de 35 kb, que contiene 10 exones que codifican una proteína de 492 aminoácidos (SEQ ID NO:79). La proteína se encuentra altamente conservada entre diferentes especies, incluidos el ser humano, la rata, el ratón y el cerdo. El gen *Slc2a1* de ratón que codifica la proteína mGlut1 se localiza en el cromosoma 4 y tiene una estructura génica muy similar a *SLC2A1* humano (Mouse Genome Informatics) (la secuencia de

mGlut1 de 492 aminoácidos es SEQ ID NO:78). El ADNc de *Slc2a1* de ratón (NM 011400) es >97 % idéntico al de ADNc de *SLC2A1* humano. (Véase: Mueckler M et ál., 1985; Veggiotti, P et ál., 2013; Seidner et ál., 1998).

5 El síndrome de deficiencia de Glut1 (DS de Glut1, OMIM 606777) es un trastorno neurológico infantil poco común, pero debilitante causado por la haploinsuficiencia del gen *SLC2A1*. El síndrome de deficiencia de Glut1 es un trastorno dominante autosómico. El fenotipo de paciente más prominente incluye
10 convulsiones infantiles, microcefalia adquirida, retraso del desarrollo e hipoglucorraquia (De Vivo D.C. et ál. 1991). Los tratamientos actuales para la enfermedad incluyen el uso de dietas cetogénicas, tales como cuerpos cetónicos de una fuente de energía alternativa para las neuronas en el
15 cerebro. Sin embargo, la dieta comprende la ingesta de cantidades elevadas de aceites y se ha informado que solo produce efectos leves en los síntomas neuroconductuales. Existe la necesidad continua de mejores tratamientos, especialmente de terapia génica para restablecer la expresión
20 de Glut1 en los pacientes.

COMPENDIO DE LA INVENCION

En determinadas modalidades, la presente invención se refiere a un vector adeno-asociado recombinante (rAAV) que comprende

una secuencia de ácido nucleico que comprende un transgén que codifica Glut1. En determinadas modalidades, el Glut1 comprende SEQ ID NO:78 o 79. En determinadas modalidades, el rAAV además comprende un promotor de Beta-actina de pollo, en donde el rAAV es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (BBB). En determinadas modalidades, el transgén es capaz de expresarse en células endoteliales que recubren la microvasculatura del cerebro. En determinadas modalidades, el promotor de Beta-actina de pollo se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:31, 38, 45, 54, 62 y 70. En determinadas modalidades, el rAAV es AAV8 o AAV9. En determinadas modalidades, el rAAV además comprende elementos de ARNmi seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO:48, 56, 59, 64 y 73. En determinadas modalidades, el rAAV además comprende repeticiones terminales invertidas (ITR) que flanquean los elementos de ARNmi.

En determinadas modalidades, la presente invención se refiere a una composición que comprende cualquiera de los AAV recombinantes descritos en la presente. En determinadas modalidades, la composición además comprende un portador farmacéutico.

En determinadas modalidades, la presente invención se refiere a un kit que comprende una cubierta de un recipiente que comprende la composición descrita en la presente. En

determinadas modalidades, el recipiente es una jeringa.

En determinadas modalidades, la presente invención se refiere a un método para restablecer el transporte de Glut1 en la barrera hematoencefálica (BBB) de un sujeto, que comprende
5 administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los vectores AAV recombinantes descritos en la presente, que es capaz de cruzar la BBB y también es capaz de expresarse en las células endoteliales que recubren la microvasculatura del cerebro.

10 En determinadas modalidades, la presente invención se refiere a un método para tratar el síndrome de deficiencia de Glut1 en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los vectores AAV recombinantes descritos en la presente, que es capaz de
15 cruzar la BBB y también es capaz de expresarse en las células endoteliales que recubren la microvasculatura del cerebro.

En determinadas modalidades, la presente invención se refiere a un método para aliviar en un sujeto al menos uno de los síntomas asociados con el síndrome de deficiencia de Glut1
20 seleccionado del grupo que consiste en hipoglucorraquia, microcefalia adquirida, disfunción motora atáxica y distónica, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los vectores AAV recombinantes descritos en la presente, que es capaz de

cruzar la BBB y que también es capaz de expresarse en las células endoteliales que recubren la microvasculatura del cerebro.

En determinados aspectos, las modalidades de la invención se refieren a un método para tratar el DS de Glut1 en un sujeto
5 caracterizado por el defecto o la haploinsuficiencia de un gen *SLC2A1*. El método puede incluir administrarle al sujeto una cantidad eficaz de un virus adeno-asociado recombinante que posee una secuencia de ácido nucleico (es decir, un
10 transgén) que codifica la proteína Glut1 normal/de tipo silvestre, bajo el control de una secuencia promotora que expresa el producto de Glut1 en las células deseadas. En determinadas modalidades, la secuencia promotora proporciona la expresión del producto de Glut1 en las células de la BBB.
15 En determinadas modalidades, la expresión se encuentra en las células endoteliales que recubren la microvasculatura del cerebro. En determinadas modalidades, la expresión del gen del transgén le proporciona a las células el producto necesario para restablecer o mantener los niveles de Glut1
20 deseados en el sujeto. En otra modalidad, la invención proporciona una composición para el tratamiento del DS de Glut1. Dichas composiciones se pueden formular con un portador y componentes adicionales adecuados para la inyección.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describen adicionalmente en la siguiente descripción detallada de sus modalidades preferidas.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1A-D son mapas de plásmidos de (diez) construcciones que codifican Glut1. La figura 1A muestra dos construcciones de EGFP-2A-Glut1 que poseen los genes indicadores de EGFP y Glut1, junto con la secuencia
10 codificante de 2A. La figura 1B muestra dos construcciones de Glut1-2A-EGFP. La figura 1C muestra dos construcciones de Glut1 naturales. La figura 1D muestra cuatro construcciones que poseen un sitio de unión a ARNmi-122 (Mir-122BS), que actúa para desactivar selectivamente la expresión de Glut1 en
15 el tejido hepático.

Las figuras 2A-C son análisis de transferencia y gráficas que muestran la expresión de la construcción de AAV9-hGlut1-eGFP (SEQ ID NO: 80) y la función de Glut1 en un ensayo de células CHO *in vitro*. La figura 2A muestra un análisis de
20 transferencia Western que demuestra la expresión de la construcción de AAV9-hGlut1-eGFP. La figura 2B es una gráfica que muestra la absorción mejorada de la glucosa en las células CHO transfectadas con la construcción de AAV9-hGlut1-eGFP; lo que demuestra su capacidad de actuar en un ensayo

funcional. La figura 2C muestra la fluorescencia de GFP de la construcción después de la transfección en las células CHO.

Las figuras 3A-B son gráficas que muestran el rendimiento motriz mejorado después de la reintroducción del gen *slc2a1*

5 murino en ratones con DS de Glut1. La figura 3A es una gráfica que muestra el rendimiento mejorado del cilindro giratorio en los ratones mutantes tratados con AAV9-mGlut1 (SEQ ID NO:35). La figura 3B es una gráfica que muestra la escalada de un poste vertical mejorada después del
10 restablecimiento de mGlut1 en los ratones mutantes tratados.

Las figuras 4A-B son gráficas que muestran la expresión específica de tejido mejorada de Glut1 en los ratones tratados con AAV9-mGlut1 (SEQ ID NO:35). La figura 4A es una gráfica que muestra la expresión del gen *slc2a1* relativa en
15 los mutantes tratados y los controles pertinentes. La figura 4B es una gráfica que muestra la expresión de Glut1 como un porcentaje de la expresión en los ratones Glut1+/+ de tipo silvestre.

Las figuras 5A-D son análisis de transferencia y gráficas que
20 muestran niveles aumentados de proteína Glut1 y glucosa en LCR en los ratones mutantes tratados con AAV9-mGlut1; lo que demuestra que el restablecimiento de Glut1 mitiga la hipoglucorraquia en los ratones del modelo de DS de Glut1. La figura 5A es un análisis de transferencia Western de la

proteína Glut1 en el tejido cerebral de los ratones mutantes con DS de Glut1 tratados y los controles pertinentes. La figura 5B es una gráfica que muestra la cuantificación de los niveles de proteína en los ratones mutantes con DS de Glut1 tratados y los controles. La figura 5C es una gráfica que muestra las concentraciones de glucosa en sangre y LCR en ratones tratados con AAV9-mGlut1 (SEQ ID NO:35) y controles. La figura 5D es una gráfica de caja y bigotes que muestra la proporción de las concentraciones de glucosa en LCR:sangre en los diversos ratones. Nota: N.S. - no significativo, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, ANOVA de una vía, $N \geq 8$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las mutaciones en el gen *SLC2A1* (también denominado *Glut1*) producen el síndrome de deficiencia de Glut1 (DS de Glut1), un trastorno del neurodesarrollo (De Vivo D.C. et ál. 1991). La proteína Glut1 de tipo silvestre se expresa ampliamente. Sin embargo, su sitio de acción celular predominante parecen ser las células endoteliales de los micro vasos cerebrales, en donde funciona en el transporte facilitado de la glucosa a través de la barrera hematoencefálica. Los niveles reducidos o la pérdida de la proteína dan lugar a un fenotipo complejo cuyas características distintivas incluyen la hipoglucorraquia, el retraso del desarrollo y la microcefalia

adquirida. Los pacientes también presentan un fenotipo motriz que es tanto atáxico como distónico. Los ratones haploinsuficientes para el gen *slc2a1* presentan muchas de las características de la enfermedad humana. Una inactivación homocigota del gen *slc2a1* murino es letal para embriones. Los modelos de animales haploinsuficientes presentan muchos aspectos de la enfermedad humana. La presente invención se refiere al uso de construcciones de AAV9-Glut1 para restablecer la expresión de la proteína Glut1 en el cerebro. Se espera que dichos métodos y construcciones de AAV9-Glut1 puedan ser tratamientos eficaces para la enfermedad humana. Para simplificar la referencia, las construcciones de vectores descritas en la presente se denominan diversas construcciones de AAV9-Glut1, lo que indica construcciones de AAV9 que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína Glut1 de ratón o humana, entre otros elementos. Tal como se utiliza en la presente, *SLC2A1* se refiere al gen humano, mientras que *slc2a1* se refiere al gen de ratón que codifica la proteína Glut1 respectiva.

20

DEFINICIONES

Con la finalidad de que la invención se pueda comprender más fácilmente, se definen de forma específica determinados términos técnicos y científicos a continuación. A menos que

se defina de forma específica en otra parte de este documento, el resto de los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el significado que le otorgue comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Tal como se usa en la presente, incluido en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de los términos tales como "un/una" y "el/la" incluyen sus referencias plurales correspondientes salvo que el contexto indique claramente lo contrario.

"Activación", "estimulación" y "tratamiento", cuando se aplican a células o receptores, pueden tener el mismo significado, p. ej., activación, estimulación o tratamiento de una célula o receptor con un ligando, salvo que el contexto indique claramente lo contrario o que se indique explícitamente. "Ligando" comprende ligandos naturales y sintéticos, por ejemplo, citocinas, variantes de citocinas, análogos, muteínas y compuestos de unión derivados de anticuerpos. "Ligando" también comprende moléculas pequeñas, por ejemplo, miméticos peptídicos de citocinas y miméticos peptídicos de anticuerpos. "Activación" puede referirse a activación celular regulada por mecanismos internos, así como por factores externos o ambientales. "Respuesta", p. ej., de una célula, tejido, órgano u organismo, abarca un cambio en

el comportamiento bioquímico o fisiológico, p. ej., la concentración, densidad, adhesión o migración dentro de un compartimento biológico, tasa de expresión génica o estado de diferenciación, donde el cambio se correlaciona con la
5 activación, estimulación o tratamiento o con mecanismos internos como la programación genética.

La "actividad" de una molécula puede describir o referirse a la unión de la molécula a un ligando o un receptor, a la actividad catalítica; a la capacidad de estimular la
10 expresión génica o la señalización, la diferenciación o la maduración celular; a la actividad antigénica, a la modulación de las actividades de otras moléculas y similares.

"Actividad" de una molécula también se puede referir a la actividad para modular o mantener las interacciones célula a
15 célula, por ejemplo, la adhesión, o la actividad para mantener una estructura de una célula, por ejemplo, membranas celulares o citoesqueleto. "Actividad" también puede significar actividad específica, por ejemplo, [actividad catalítica]/[mg de proteína] o [actividad inmunológica]/[mg
20 de proteína], concentración en un compartimento biológico o similar. "Actividad" se puede referir a la modulación de los componentes de los sistemas inmunitarios innatos o adaptativos.

"Administración" y "tratamiento", tal como se aplican a un

animal, ser humano, sujeto experimental, célula, tejido, órgano o fluido biológico, se refieren al contacto de una composición o agente de diagnóstico, terapéutico, farmacéutico exógeno con el animal, ser humano, sujeto, 5 célula, tejido, órgano o fluido biológico. "Administración" y "tratamiento" pueden hacer referencia, por ejemplo, a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, de diagnóstico, de investigación y experimentales. El tratamiento de una célula comprende el contacto de un reactivo con la célula, así como 10 el contacto de un reactivo con un fluido, donde el fluido se encuentra en contacto con la célula. "Administración" y "tratamiento" también significan tratamientos *in vitro* y *ex vivo*, por ejemplo, de una célula, mediante un compuesto reactivo, de diagnóstico, de unión o mediante otra célula. El 15 término "sujeto" incluye cualquier organismo, preferentemente un animal, más preferentemente, un mamífero (p. ej., rata, ratón, perro, gato, conejo) y, más preferentemente, un ser humano, incluido un paciente humano.

"Tratar" o "tratamiento" se refiere a administrar un agente 20 terapéutico, tal como una composición que contiene cualquiera de las construcciones de rAAV de la presente invención, de forma interna o externa, a un sujeto o paciente que padece uno o más síntomas de la enfermedad, o que se sospecha que tiene una enfermedad o tiene riesgo elevado de adquirir una

enfermedad para los cuales el agente tiene actividad terapéutica. Típicamente, el agente se administra en una cantidad eficaz para aliviar uno o más síntomas de la enfermedad en el sujeto o población tratados, ya sea mediante la inducción de la regresión o la inhibición de la evolución de dichos síntomas a cualquier grado clínicamente medible. La cantidad de agente terapéutico eficaz para aliviar cualquier síntoma de enfermedad en particular (también denominada "cantidad terapéuticamente eficaz") puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad y peso del paciente, y la capacidad del fármaco de provocar una respuesta deseada en el sujeto. El grado de alivio de un síntoma de una enfermedad puede evaluarse mediante cualquier medición clínica utilizada típicamente por los médicos u otros proveedores de cuidados de la salud, para evaluar la gravedad o estado de evolución de dicho síntoma. Si bien una modalidad de la presente invención (por ejemplo, un método de tratamiento o artículo de fabricación) puede no ser eficaz para aliviar los síntomas de la enfermedad objetivo en todos los sujetos, debería aliviar los síntomas de la enfermedad objetivo en una cantidad estadísticamente significativa de sujetos, según se determine mediante cualquier prueba estadística conocida en la técnica, tal como la prueba t de Student, la prueba χ^2 , la prueba U de acuerdo con Mann y

Whitney, la prueba Kruskal-Wallis (prueba H), la prueba Jonckheere-Terpstra y la prueba Wilcoxon.

"Tratamiento", según se aplica a un sujeto de investigación, veterinaria o ser humano, se refiere a tratamiento
5 terapéutico, medidas profilácticas o preventivas, y aplicaciones de diagnóstico e investigación. "Tratamiento", cuando se aplica a un ser humano, un sujeto veterinario o de investigación o una célula, un tejido o un órgano, abarca la transfección de cualquiera de las construcciones de rAAV o
10 métodos relacionados de la presente invención según se aplican a un ser humano o sujeto animal, una célula, un tejido, un compartimiento fisiológico o un fluido fisiológico.

Una "molécula de ácido nucleico aislada" hace referencia a un
15 ADN o ARN de origen genómico, ARNm, ADNc o sintético o alguna combinación de estos, que no se relaciona con todos los polinucleótidos o con una parte de estos en que se encuentra el polinucleótido en forma natural, ni se encuentra unida a un polinucléotido al que no se une de forma natural. A los
20 efectos de la presente descripción, debe entenderse que "una molécula de ácido nucleico que comprende" una secuencia de nucleótidos en particular no comprende cromosomas intactos. Las moléculas de ácido nucleico aislado que "comprenden" secuencias de ácido nucleico específicos pueden incluir,

además de las secuencias específicas, secuencias de codificación para hasta otras diez e incluso hasta otras veinte proteínas o partes o fragmentos de estas, o pueden incluir secuencias reguladoras unidas de forma operativa que controlen la expresión de la región de codificación de las secuencias de ácidos nucleicos mencionadas, y/o pueden incluir secuencias de vectores.

La expresión "secuencias de control" se refieren a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida de manera operativa en un organismo hospedador en particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está "unido de forma operativa" cuando se encuentra en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está operativamente unido al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia o un sitio de unión

al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está ubicada de modo que facilite la traducción. Generalmente, "unido de forma operativa" significa que las secuencias de ADN que se unen son
5 contiguas, y, en el caso de una líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se puede lograr mediante ligación en sitios de restricción convenientes. En caso de que no existan estos sitios, se usan enlazadores o adaptadores de
10 oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Tal como se usa en la presente, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan de manera indistinta y todas dichas designaciones incluyen la progenie.
15 Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula primaria de la presente y los cultivos derivados de esta sin importar la cantidad de transferencias. Se entiende también que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en cuanto al contenido de
20 ADN, debido a mutaciones inadvertidas o deliberadas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la evaluada en la célula originalmente transformada. En los casos donde se pretenden realizar las designaciones de forma separada, esto se

comprenderá a partir del contexto.

AAV recombinantes

En algunos aspectos, la invención proporciona AAV aislados. Según se utiliza en la presente con respecto a los AAV, el
5 término "aislado" se refiere a un AAV que se ha aislado de su entorno natural (p. ej., de una célula hospedadora, tejido o sujeto) o se ha producido de forma artificial. Los AAV aislados se pueden producir mediante métodos recombinantes. Dichos AAV se denominan en la presente "AAV recombinantes".
10 Los AAV recombinantes (rAAV) tienen preferentemente capacidades de direccionamiento específico al tejido, de modo que un transgén del rAAV se suministrará específicamente a uno o más tejidos predeterminados. La cápside de AAV es un elemento importante para determinar estas capacidades de
15 direccionamiento específico al tejido. Por ende, se puede seleccionar un rAAV que tenga una cápside adecuada para el tejido diana. En algunas modalidades, el rAAV comprende secuencias (tales como SEQ ID NO:96) que codifican la cápside de AAV9 que tiene una secuencia de aminoácidos que se
20 establece como SEQ ID NO:97 o una proteína que tenga homología sustancial con esta.

Para el direccionamiento al tejido deseado en el contexto del tratamiento de la DS de Glut1, un rAAV preferido es una combinación de la cápside de AAV9 y una estructura principal

de AAV2, que da como resultado los diversos rAAV descritos en la presente (véase la tabla 1 y el listado de secuencias).

Se han descrito métodos para obtener AAV recombinantes que tienen una proteína de cápside deseada (véase, por ejemplo,

5 US 2003/0138772, cuyo contenido se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad). Se han descrito una

serie de proteínas de cápside de AAV diferentes, por ejemplo, aquellas que se describen en G. Gao, et ál., J. Virol,

78(12):6381-6388 (junio de 2004); G. Gao, et ál., Proc Natl

10 Acad Sci EUA, 100(10):6081-6086 (13 de mayo de 2003); US

2003-0138772, US 2007/0036760, US 2009/0197338 cuyos

contenidos relacionados con las proteínas de cápside de AAV y secuencias de nucleótidos y aminoácidos asociadas se

incorporan a la presente mediante esta referencia. Para el

15 empaquetamiento deseado de las construcciones y métodos

descritos en la presente, se prefieren el vector de AAV9 y la

cápside. Sin embargo, cabe destacar que otros AAV adecuados,

tales como rAAVrh.8 y rAAVrh.10, u otros vectores similares,

se pueden adaptar para utilizar en la presente invención.

20 Típicamente, los métodos comprenden cultivar una célula

hospedadora que contiene una secuencia de ácido nucleico que

codifica una proteína de cápside de AAV o un fragmento de

esta; un gen rep funcional; un vector de AAV recombinante

compuesto por repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV

y un transgén; y funciones auxiliares suficientes para permitir el empaquetamiento del vector de AAV recombinante en las proteínas de cápside de AAV.

Los componentes que se van a cultivar en la célula
5 hospedadora para empaquetar un vector de rAAV en una cápside de AAV se pueden proporcionar a la célula hospedadora en trans. Alternativamente, uno o más de los componentes necesarios (p. ej., vector de AAV recombinante, secuencias rep, secuencias cap y/o funciones auxiliares) pueden ser
10 proporcionados por una célula hospedadora estable que se ha modificado genéticamente para que contenga uno o más de los componentes necesarios, utilizando los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Más adecuadamente, dicha célula hospedadora estable contendrá los componentes necesarios bajo
15 el control de un promotor inducible. Sin embargo, los componentes necesarios pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo. En otra alternativa, una célula hospedadora estable seleccionada puede contener componentes seleccionados bajo el control de un promotor constitutivo y
20 otros componentes seleccionados bajo el control de uno o más promotores inducibles. Por ejemplo, se puede generar una célula hospedadora estable que se derive de células 293 (que contienen funciones auxiliares El bajo el control de un promotor constitutivo), pero que contienen las proteínas rep

y/o cap bajo el control de los promotores inducibles.

El vector de AAV recombinante, las secuencias rep, las secuencias cap y las funciones auxiliares para producir el rAAV se pueden suministrar a la célula hospedadora
5 empaquetadora utilizando cualquier elemento genético adecuado (vector). El elemento genético seleccionado se puede suministrar a través de cualquier método adecuado, incluidos los que se describen en la presente. Véanse, p. ej., K. Fisher et ál., J. Virol., 70:520-532 (1993) y la patente
10 estadounidense n.º 5,478,745.

En algunas modalidades, los AAV recombinantes se pueden producir utilizando el método de transfección triple (p. ej., tal como se describe detalladamente en la patente estadounidense n.º 6,001,650, cuyo contenido relacionado con
15 el método de transfección triple se incorpora a la presente mediante referencia). Típicamente, los AAV recombinantes se producen mediante la transfección de una célula hospedadora con un vector de AAV recombinante (que comprende un transgén) que se va a empaquetar en las partículas de AAV, un vector de
20 función auxiliar de AAV y un vector de función accesoria. Un vector de función auxiliar de AAV codifica las secuencias de "función auxiliar de AAV" (es decir, rep y cap), que funcionan en trans para la repetición y encapsidación de AAV productivos. Preferentemente, el vector de función auxiliar

de AAV apoya la producción del vector de AAV eficaz sin generar viriones de AAV de tipo silvestre detectables (es decir, viriones de AAV que contienen genes rep y cap funcionales). Ejemplos no taxativos de vectores adecuados para utilizar con la presente invención incluyen pHLP19, descrito en la patente estadounidense n.º 6,001,650 y el vector pRep6cap6, descrito en la patente estadounidense n.º 6,156,303, que se incorporan en la presente en su totalidad. El vector de función accesoria codifica las secuencias de nucleótidos para las funciones celulares y/o virales no derivadas de AAV de las cuales depende AAV para la repetición (es decir, "funciones accesorias"). Las funciones accesorias incluyen aquellas funciones necesarias para la repetición de AAV, lo que incluye, entre otros, aquellos restos que participan en la activación de la transcripción génica de AAV, el corte y empalme de ARNm de AAV de etapa específica, la repetición de ADN de AAV, la síntesis de los productos de expresión de cap y el ensamblaje de cápside de AAV. Las funciones accesorias de base viral se pueden derivar de cualquiera de los virus auxiliares conocidos, tales como adenovirus, virus del herpes (diferente del virus del herpes simple tipo 1) y virus vaccinia.

Con respecto a las células hospedadoras transfectadas, el término "transfección" se utiliza para hacer referencia a la

absorción de ADN externo por una célula y una célula se ha "transfectado" cuando se ha introducido ADN exógeno dentro de la membrana celular. Un número de técnicas de transfección son conocidas en la técnica. Véanse, p. ej., Graham et ál. (1973) *Virology*, 52:456, Sambrook et ál. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Davis et ál. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier y Chu et ál. (1981) *Gene* 13:197. Dichas técnicas se pueden utilizar para introducir uno o más ácidos nucleicos exógenos, tales como un vector de integración de nucleótidos y otras moléculas de ácido nucleico, en células hospedadoras adecuadas.

Una "célula hospedadora" se refiere a cualquier célula que albergue, o que sea capaz de albergar, una sustancia de interés. A menudo, una célula hospedadora es una célula de mamífero. Una célula hospedadora se puede utilizar como un receptor de una construcción auxiliar de AAV, un plásmido de minigenes de AAV, un vector de función accesoria u otro ADN de transferencia asociado con la producción de AAV recombinantes. El término incluye la progenie de la célula original que se ha transfectado. Por ende, una "célula hospedadora", según se utiliza en la presente, se puede referir a una célula que se ha transfectado con una secuencia de ADN exógena. Se entiende que la progenie de una célula

progenitora individual puede no necesariamente ser completamente idéntica en morfología o en el complemento de ADN total o genómico al progenitor original, debido a mutaciones naturales, accidentales o deliberadas.

5 Con respecto a las células, el término "aislado" se refiere a una célula que se ha aislado de su entorno natural (p. ej., de un tejido o un sujeto). El término "línea celular" se refiere a una población de células capaces de crecimiento continuo o prolongado y división *in vitro*. A menudo, las
10 líneas celulares son poblaciones de clones derivadas de una célula progenitora única. Se sabe en la técnica que se pueden producir cambios espontáneos o inducidos en el cariotipo durante el almacenamiento o la transferencia de dichas poblaciones de clones. Por lo tanto, las células derivadas de
15 la línea celular mencionada pueden no ser precisamente idénticas a las células o los cultivos ancestrales, y la línea celular mencionada incluye dichas variantes. Tal como se utiliza en la presente, la expresión "célula recombinante" se refiere a una célula en la cual se ha introducido un
20 segmento de ADN exógeno, tal como un segmento de ADN que produce la transcripción de un polipéptido biológicamente activo o la producción de un ácido nucleico biológicamente activo, tal como un ARN.

El término "vector" incluye cualquier elemento genético, tal

como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, cromosoma artificial, virus, virión, etc., que es capaz de repetición cuando está asociado con los elementos de control adecuados y que puede transferir secuencias génicas entre las

5 células. Por lo tanto, el término incluye clonación, y vehículos de expresión así como vectores virales. En algunas modalidades, se considera que los vectores útiles son aquellos vectores en los cuales el segmento de ácido nucleico que se va a transcribir se ubica bajo el control

10 transcripcional de un promotor. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o la maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de un gen. Las frases "ubicado operativamente", "unido operativamente",

15 "bajo control" o "bajo control transcripcional" significan que el promotor se encuentra en la ubicación y la orientación correctas con relación al ácido nucleico para controlar el inicio de la polimerasa de ARN y la expresión del gen. La expresión "construcción o vector de expresión" significa

20 cualquier tipo de construcción genética que contenga un ácido nucleico en la cual la totalidad o parte de la secuencia que codifica el ácido nucleico es capaz de transcribirse. En algunas modalidades, la expresión incluye la transcripción del ácido nucleico, por ejemplo, para generar un producto de

polipéptido biológicamente activo o ARN inhibidor (p. ej., ARNhp, ARNmi) de un gen transcrito.

Vectores de AAV recombinantes

Los "vectores de AAV (rAAV) recombinantes" descritos en la presente están compuestos, típicamente, como mínimo, de un transgén (p. ej., que codifica Glut1) y sus secuencias reguladoras, y repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV 5' y 3'. Es este vector de AAV recombinante que se empaqueta en una proteína de cápside y se envía a una célula diana seleccionada. En algunas modalidades, el transgén es una secuencia de ácido nucleico, heteróloga para las secuencias del vector, que codifica un polipéptido, una proteína, una molécula de ARN funcional (p. ej., ARNmi, inhibidor de ARNmi) u otro producto génico de interés (p. ej., Glut1). La secuencia codificante de ácido nucleico está unida operativamente a los componentes reguladores de una forma que permite la transcripción, la traducción y/o la expresión de los transgenes, en una célula de un tejido diana.

Las secuencias de AAV del vector pueden comprender las secuencias de repetición terminal invertida 5' y 3' que actúan en cis (véase, p. ej., B. J. Carter, en "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, págs. 155 168 (1990)). Las secuencias de ITR tienen típicamente alrededor

de 145 bp de longitud. Preferentemente, prácticamente la totalidad de las secuencias que codifican las ITR se utilizan en la molécula, aunque se puede permitir cierto grado de modificación leve de estas secuencias. (Véanse, p. ej.,

5 textos tales como Sambrook et ál., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2° ed., Cold Spring harbor Laboratory, Nueva York (1989); y K. Fisher et ál., J. Virol., 70:520 532 (1996)). Un ejemplo de dicha molécula es un plásmido "que actúa en cis" que contiene el transgén, en donde la secuencia

10 de transgén seleccionada y los elementos reguladores asociados están flanqueados por las secuencias de ITR de AAV 5' y 3'. Las secuencias de ITR de AAV se pueden obtener a partir de cualquier AAV conocido, lo que incluye los tipos de AAV de mamífero identificados actualmente.

15 Además de los elementos identificados arriba para los vectores de AAV recombinantes, el vector también puede incluir elementos de control convencionales que están unidos operativamente al transgén de una forma que permite su transcripción, traducción y/o expresión en una célula

20 transfectada con el vector de plásmido o infectada con el virus producido por la invención. Tal como se utiliza en la presente, las secuencias "unidas operativamente" incluyen las secuencias de control de expresión que son contiguas con el gen de interés y las secuencias de control de expresión que

actúan en trans o a cierta distancia para controlar el gen de interés. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias apropiadas de inicio de transcripción, terminación, promotoras y potenciadoras; señales de procesamiento eficientes de ARN como por ejemplo señales de escisión y poliadenilación (poliA); secuencias que estabilizan ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficiencia de la traducción (es decir, secuencia de consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y, cuando así se desea, secuencias que potencian la secreción del producto codificado. Se conocen en la técnica y se pueden utilizar una gran cantidad de secuencias de control de expresión, incluidos promotores que son naturales, constitutivos, inducibles y/o específicos del tejido.

Según se utiliza en la presente, una secuencia de ácido nucleico (p. ej., secuencia de codificación) y las secuencias reguladoras están unidas operativamente cuando están unidas de forma covalente de modo que la expresión o la transcripción de la secuencia de ácido nucleico queda bajo la influencia o el control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias de ácido nucleico se traduzcan a una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN están unidas operativamente si la inducción de un promotor en las secuencias reguladoras 5' produce la transcripción de la

secuencia de codificación y si la naturaleza de la unión entre las dos secuencias de ADN no (1) produce la introducción de una mutación marco-cambio, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora de dirigir la transcripción de las secuencias de codificación o (3) interfiere con la capacidad de la transcripción de ARN correspondiente de traducirse en una proteína. Por ende, una región promotora se uniría operativamente a una secuencia de ácido nucleico si la región promotora fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ADN de forma tal que la transcripción resultante se pudiera traducir en la proteína o el polipéptido deseado. De forma similar, dos o más regiones codificantes están unidas operativamente cuando están unidas de tal modo que su transcripción de un promotor común produce la expresión de dos o más proteínas que se han traducido en marco. En algunas modalidades, las secuencias codificantes unidas operativamente producen una proteína de fusión. En algunas modalidades, las secuencias codificantes unidas operativamente producen un ARN funcional (p. ej., ARNhp, ARNmi).

Para los ácidos nucleicos que codifican proteínas, una secuencia de poliadenilación se inserta generalmente después de las secuencias de transgenes y antes de la secuencia de ITR de AAV 3'. Una construcción de rAAV útil en la presente

invención también puede contener un intrón, ubicado de forma deseable entre la secuencia promotora/potenciadora y el transgén. Una posible secuencia de intrones se deriva de SV-40 y se denomina la secuencia de intrones T SV-40. Otro elemento de vector que se puede utilizar es un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Una secuencia IRES se utiliza para producir más de un polipéptido a partir de la transcripción de un gen único. Una secuencia IRES se utilizaría para producir una proteína que contenga más de una cadena de polipéptidos. La selección de estos y otros elementos de vectores comunes es convencional y existen muchas secuencias de este tipo disponibles [véase, p. ej., Sambrook et ál., y las referencias citadas allí, por ejemplo, en las páginas 3.18 3.26 y 16.17 16.27 y Ausubel et ál., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1989]. En algunas circunstancias, se puede incluir una secuencia 2A del virus de la fiebre aftosa en una poliproteína; este es un péptido pequeño (aproximadamente 18 aminoácidos de longitud) que se ha demostrado que media la escisión de las poliproteínas (Ryan, M D et ál., EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et ál., J Virology, noviembre de 1996; p. 8124-8127; Furler, S et ál., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; y Halpin, C et ál., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459). La actividad de escisión de la secuencia 2A se había

demostrado anteriormente en sistemas artificiales que incluyen plásmidos y vectores de terapia génica (AAV y retrovirus) (Ryan, M D et ál., EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et ál., J Virology, noviembre de 1996; p. 8124-8127; Furler, S et ál., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; y Halpin, C et ál., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459; de Felipe, P et ál., Gene Therapy, 1999; 6: 198-208; de Felipe, P et ál., Human Gene Therapy, 2000; 11: 1921-1931.; y Klump, H et ál., Gene Therapy, 2001; 8: 811-817).

La naturaleza exacta de las secuencias reguladoras necesaria para la expresión génica en las células hospedadoras puede variar entre las especies, los tejidos o los tipos de células, pero, en general, incluye según sea necesario, secuencias 5' de no transcripción y 5' de no traducción que participan en el inicio de la transcripción y la traducción respectivamente, por ejemplo, una caja TATA, secuencia de casquete, secuencia CAAT, elementos potenciadores y similares. Específicamente, dichas secuencias reguladoras de no transcripción 5' incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para un control transcripcional del gen unido operativamente. Las secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias potenciadoras o secuencias activadoras corriente arriba según se desee. Los vectores pueden incluir, opcionalmente, secuencias de señal o

líderes 5'.

Algunos ejemplos de promotores constitutivos incluyen, entre otros, el promotor de LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) retroviral (opcionalmente con el potenciador de RSV), el
5 promotor del citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el potenciador de CMV) [véase, p. ej., Boshart et ál., Cell, 41:521-530 (1985)], el promotor de SV40, el promotor de dihidrofolato reductasa, el promotor de 13-actina, el promotor de fosfoglicerol cinasa (PGK) y el promotor de EFla
10 [Invitrogen].

Los promotores inducibles permiten la regulación de la expresión génica y pueden ser regulados por compuestos suministrados de forma exógena, factores ambientales, tales como la temperatura, o la presencia de un estado fisiológico
15 específico, p. ej., una fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula o solo en las células de repetición. Los promotores inducibles y los sistemas inducibles están disponibles de una serie de fuentes comerciales, incluidas, entre otros, Invitrogen, Clontech y
20 Ariad. Algunos ejemplos de promotores inducibles regulados por promotores suministrados de forma exógena incluyen el promotor de metalotioneína (MT) de oveja inducible por zinc, el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el sistema promotor de la

polimerasa T7 (WO 98/10088); el promotor de insectos ecdisona (No et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 93:3346-3351 (1996)), el sistema represor de la tetraciclina (Gossen et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 89:5547-5551 (1992)), el sistema
5 inducible por tetraciclina (Gossen et ál., Science, 268:1766-1769 (1995), véase también Harvey et ál., Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)), el sistema inducible por RU486 (Wang et ál., Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) y Wang et ál., Gene Ther., 4:432-441 (1997)) y el sistema inducible por
10 rapamicina (Magari et ál., J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)). Otros tipos de promotores inducibles que pueden ser útiles en este contexto son aquellos que son regulados por un estado fisiológico específico, p. ej., la temperatura, la fase aguda, un estado de diferenciación particular de la
15 célula o solo en las células de repetición.

En otra modalidad, se utilizará el promotor natural, o un fragmento de este, para el transgén. El promotor natural se puede preferir cuando se desea que la expresión del transgén imite la expresión natural. El promotor natural se puede
20 utilizar cuando la expresión del transgén se debe regular de forma temporal o a nivel del desarrollo, o de forma específica del tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. En otra modalidad, otros elementos de control de expresión naturales, tales como los

elementos potenciadores, los sitios de poliadenilación o las secuencias de consenso de Kozak también se pueden utilizar para imitar la expresión natural.

En algunas modalidades, las secuencias reguladoras confieren
5 capacidades de expresión génica específica del tejido. En algunos casos, las secuencias reguladoras específicas del tejido se unen a factores de transcripción específicos del tejido que inducen la transcripción de forma específica del tejido. Dichas secuencias reguladoras específicas del tejido
10 (p. ej., promotores, potenciadores, etc.) son conocidos en la técnica. Algunas secuencias reguladoras específicas del tejido incluyen, entre otras, los siguientes promotores específicos del tejido: neuronal, tal como el promotor de enolasa específico de neuronas (NSE) (Andersen et ál., Cell.
15 Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)), el promotor del gen de cadena ligera de neurofilamentos (Piccioli et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. IDSA, 88:5611-5 (1991)) y el promotor del gen vgf específico de neuronas (Piccioli et ál., Neuron, 15:373-84 (1995)). En algunas modalidades, el promotor
20 específico de tejidos es un promotor de un gen seleccionado de: núcleos neuronales (NeuN), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), poliposis coli adenomatosa (APC) y molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba-1). En algunas modalidades, el promotor es un promotor de Beta-actina de

pollo.

En algunas modalidades, uno o más sitios de unión para uno o más de los ARNmi se incorporan en un transgén de un vector rAAV, para inhibir la expresión del transgén en uno o más tejidos de un sujeto que alberga los transgenes, p. ej., tejidos no del SNC. El experto en la técnica apreciará que se pueden seleccionar sitios de unión para controlar la expresión de un transgén de forma específica del tejido. Por ejemplo, se puede inhibir la expresión de un transgén en el hígado mediante la incorporación de un sitio de unión para miR-122, de modo que el ARNm expresado a partir del transgén se una y sea inhibido por miR-122 en el hígado. Se puede inhibir la expresión de un transgén en el corazón mediante la incorporación de un sitio de unión para miR-133a o miR-1, de modo que el ARNm expresado a partir del transgén se una y sea inhibido por miR-133a o miR-1 en el corazón. Los sitios diana de ARNmi en el ARNm se pueden encontrar en la 5' UTR, la 3' UTR o en la región codificante. Típicamente, el sitio diana se encuentra en la 3' UTR del ARNm. Además, el transgén se puede diseñar de modo que múltiples ARNmi regulen el ARNm mediante el reconocimiento del mismo o múltiples sitios. La presencia de múltiples sitios de unión a ARNmi puede producir la acción cooperativa de múltiples RISC y proporcionar una inhibición de la expresión altamente eficaz. La secuencia del

sitio diana puede comprender un total de 5-100, 10-60 o más nucleótidos. La secuencia del sitio diana puede comprender al menos 5 nucleótidos de la secuencia de un sitio de unión al gen diana.

5 **Secuencias codificantes de transgenes**

La composición de la secuencia del transgén de un vector rAAV dependerá del uso que se le vaya a dar al vector resultante. Por ejemplo, un tipo de secuencia de transgén incluye una secuencia indicadora, que tras la expresión produce una señal detectable. En otro ejemplo, el transgén codifica una proteína de Glut1 terapéutica o ARN funcional terapéutico. En otro ejemplo, el transgén codifica una proteína o un ARN funcional que se pretende utilizar con fines de investigación, p. ej., para crear un modelo de animal transgénico somático que alberga el transgén, p. ej., para estudiar la función del producto transgénico. En otro ejemplo, el transgén codifica una proteína o un ARN funcional que se pretende utilizar para crear un modelo animal de enfermedad. Las secuencias codificantes de transgenes adecuadas serán evidentes para el experto en la técnica.

En algunos aspectos, la invención proporciona vectores rAAV para utilizar en los métodos para prevenir o tratar un defecto génico de *SLC2A1* (p. ej., defectos génicos hereditarios, alteraciones génicas somáticas) en un mamífero,

tal como, por ejemplo, un defecto génico que produce una deficiencia de polipéptidos de Glut1 en un sujeto, y particularmente para tratar o reducir la gravedad o el grado de la deficiencia en un sujeto que presenta una deficiencia de Glut1. En algunas modalidades, los métodos comprenden la administración de un vector rAAV que codifica uno o más péptidos terapéuticos, polipéptidos, ARNhp, ARNmicro, nucleótidos antisentido, etc., en un portador farmacéuticamente aceptable al sujeto en una cantidad y durante un período suficiente para tratar el trastorno de Glut1 en el sujeto que tiene o que se sospecha que tiene dicho trastorno.

Administración de AAV recombinante

Los rAAV se administran en cantidades suficientes para transfectar las células de un tejido deseado y para proporcionar niveles suficientes de transferencia y expresión génica sin efectos adversos innecesarios. Las vías de administración convencionales y farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otras, la administración directa al tejido seleccionado (p. ej., administración intracerebral, administración intratecal), intravenosa, oral, inhalación (que incluye administración intranasal e intratraqueal), intraocular, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intratumoral y otras vías de administración

parentales. Si se desea, las vías de administración se pueden combinar.

La administración de determinados rAAV a un sujeto puede ser, por ejemplo, mediante administración en el torrente sanguíneo del sujeto. La administración en el torrente sanguíneo puede ser mediante inyección en una vena, una arteria o cualquier otro conducto vascular. Además, en determinados casos, puede ser deseable administrar los rAAV al tejido cerebral, las meninges, las células neuronales, las células gliales, los astrocitos, los oligodendrocitos, el líquido cefalorraquídeo (LCR), los espacios intersticiales y similares. En algunas modalidades, los AAV recombinantes se pueden administrar directamente a la médula espinal o el cerebro mediante inyección en la región ventricular, así como en el cuerpo estriado (p. ej., el núcleo caudado o putamen del cuerpo estriado) y la unión neuromuscular, o el lóbulo cerebeloso, con una aguja, un catéter o un dispositivo relacionado, utilizando técnicas neuroquirúrgicas conocidas en la técnica, tales como mediante inyección estereotáctica (véase, p. ej., Stein et ál., J Virol 73:3424-3429, 1999; Davidson et ál., PNAS 97:3428-3432, 2000; Davidson et ál., Nat. Genet. 3:219-223, 1993; y Alisky y Davidson, Hum. Gene Ther. 11:2315-2329, 2000). En determinadas circunstancias, será deseable administrar las construcciones terapéuticas basadas en rAAV

en las composiciones farmacéuticas formuladas de forma adecuada descritas en la presente, ya sea de forma subcutánea, intrapancreática, intranasal, parenteral, intravenosa, intramuscular, intracerebral, intratecal, intracerebral, oral, intraperitoneal o mediante inhalación. En algunas modalidades, las modalidades de administración tal como se describen en las patentes estadounidenses n.º 5,543,158; 5,641,515 y 5,399,363 (cada una se incorpora específicamente a la presente mediante referencia en su totalidad) se pueden utilizar para administrar rAAV.

Composiciones de AAV recombinantes

Los rAAV se pueden administrar a un sujeto en las composiciones de acuerdo con los métodos adecuados conocidos en la técnica. El rAAV, preferentemente suspendido en un portador fisiológicamente compatible (p. ej., en una composición), se puede administrar a un sujeto, p. ej., un ser humano, un ratón, una rata, un gato, un perro, una oveja, un conejo, un caballo, una vaca, una cabra, un cerdo, un conejillo de indias, un hámster, una gallina, un pavo o un primate no humano (p. ej., un macaco). En determinadas modalidades, las composiciones pueden comprender un rAAV solo, o combinado con uno o más virus diferentes (p. ej., un segundo rAAV codificante que tiene uno o más transgenes diferentes).

Un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente portadores adecuados en virtud de la identificación a la cual se dirige el rAAV. Por ejemplo, un portador adecuado incluye solución salina, que se puede formular con diversas
5 soluciones amortiguadoras (p. ej., solución salina amortiguada con fosfato). Otros portadores ejemplares incluyen solución salina estéril, lactosa, sucrosa, fosfato de calcio, gelatina, dextrano, agar, pectina, aceite de maní, aceite de sésamo y agua. La selección del portador no es una
10 limitación de la presente invención.

Opcionalmente, las composiciones de la invención pueden contener, además del rAAV y los portadores, otros ingredientes farmacéuticos convencionales, tales como conservantes o estabilizadores químicos. Algunos conservantes
15 ejemplares adecuados incluyen clorobutanol, sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, galato de propilo, los parabenos, etil vainillina, glicerina, fenol y paraclorofenol. Los estabilizadores químicos adecuados incluyen gelatina y albúmina.

20 La dosis de viriones de rAAV necesaria para lograr un efecto deseado o "efecto terapéutico", p. ej., las unidades de dosis en los genomas de vector/por kilogramo de peso corporal (vg/kg), varían según diversos factores que incluyen, entre otros: la vía de administración de rAAV, el nivel de

expresión génica o de ARN necesario para lograr un efecto terapéutico, la enfermedad o trastorno específico que se está tratando y la estabilidad del producto de ARN o génico. El experto en la técnica puede determinar fácilmente un

5 intervalo de dosis de viriones de rAAV para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno particular basándose en los factores mencionados anteriormente, así como otros factores conocidos en la técnica. Una cantidad eficaz de rAAV se encuentra generalmente en el intervalo de entre

10 aproximadamente 10 μ l y aproximadamente 100 ml de solución que contiene entre aproximadamente 10^9 y 10^{16} copias de genoma por sujeto. Se pueden utilizar otros volúmenes de solución. El volumen utilizado depende, típicamente, entre otras cosas, del tamaño del sujeto, la dosis del rAAV y la vía de

15 administración. Por ejemplo, para la administración intratecal o intracerebral, se puede utilizar un volumen en el intervalo de entre 1 μ l y 10 μ l, o 10 μ l y 100 μ l. Para la administración intravenosa, se puede utilizar un volumen en el intervalo de entre 10 μ l y 100 μ l, 100 μ l y 1 ml, 1 ml y

20 10 ml o más. En algunos casos, una dosificación de entre aproximadamente 10^{10} y 10^{12} copias de genoma de rAAV por sujeto resulta adecuada. En determinadas modalidades, 10^{12} copias de genoma de rAAV por sujeto resultan eficaces para dirigirse a los tejidos del SNC. En algunas modalidades, el

rAAV se administra en una dosis de 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} o 10^{15} copias de genoma por sujeto. En algunas modalidades, el rAAV se administra en una dosis de 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} o 10^{14} copias de genoma por kg.

- 5 En algunas modalidades, las composiciones de rAAV se formulan para reducir la acumulación de partículas de AAV en la composición, particularmente cuando hay concentraciones de rAAV altas presentes (p. ej., aproximadamente 10^{13} GC/ml o más). Los métodos para reducir la acumulación de rAAV son
- 10 conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el añadido de tensioactivos, ajuste de pII, ajuste de concentración de sal, etc. (Véase, p. ej., Wright F R, et al., Molecular Therapy (2005) 12, 171-178, cuyo contenido se incorpora a la presente mediante esta referencia).
- 15 La formulación de excipientes y soluciones portadoras farmacéuticamente aceptables es conocida por los expertos en la técnica, así como lo es el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para utilizar las composiciones específicas descritas en la presente en
- 20 diversos regímenes de tratamiento. Típicamente, estas formulaciones pueden contener al menos alrededor de 0.1 % del ingrediente activo o más, aunque el porcentaje del ingrediente activo, desde luego, puede variar y puede tener convenientemente alrededor de 1 o 2 % y alrededor de 70 % u

80 % o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de ingrediente activo en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de manera tal que se obtenga una dosificación adecuada en cualquier
5 dosis unitaria dada del compuesto. Los factores tales como la solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, vía de administración, vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas serán contemplados por el experto en la técnica para preparar dichas formulaciones
10 farmacéuticas, y como tal, pueden ser deseables una variedad de dosificaciones y regímenes de tratamiento.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o
15 dispersiones inyectables estériles. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de estos, así como en aceites. En condiciones de almacenamiento y uso normales, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.
20 En muchos casos, la forma es estéril y fluida en la medida en que exista la posibilidad de incluirla en una jeringa fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias

y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) mezclas adecuadas de estos y/o aceites
5 vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de la dispersión y utilizando tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr
10 mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones
15 inyectables puede provocarse mediante el uso en las composiciones de agentes que retarden la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para la administración de una solución acuosa inyectable, por ejemplo, la solución se puede amortiguar de manera adecuada,
20 si fuera necesario, y el diluyente líquido se puede volver isotónico en primer lugar con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Con

relación a esto, los expertos en la técnica conocerán un medio acuoso estéril que se puede emplear. Por ejemplo, se puede disolver una dosificación en 1 ml de solución de NaCl isotónica y se puede agregar a 1000 ml de fluido de hipodermocclisis o se puede inyectar en el sitio propuesto de la infusión (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15° edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente algo de variación en la dosificación según la afección del hospedador. La persona responsable de la administración puede, en cualquier caso, determinar la dosis adecuada para el hospedador individual.

Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de rAAV activos en la cantidad necesaria en un solvente adecuado con varios de los ingredientes enumerados en la presente, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilizado que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional

deseado a partir de una solución filtrada previamente en condiciones estériles del mismo.

Las composiciones de rAAV descritas en la presente también se pueden formular en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, ácidos clorhídricos o fosfóricos, o ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de las bases inorgánicas como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos y bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Luego de la formulación, las soluciones pueden administrarse de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas de dosificación como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Tal como se usa en la presente, "portador" incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, vehículos, revestimientos, diluyentes, agentes antifúngicos y antibacterianos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, amortiguadores, soluciones portadoras,

suspensiones, coloides y similares. Es conocido en la técnica el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. También se pueden incorporar en las composiciones ingredientes activos suplementarios. La
5 frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administran a un hospedador.

Los vehículos de administración tales como liposomas,
10 nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares, se pueden utilizar para la introducción de las composiciones de la presente invención en células hospedadoras adecuadas. En particular, los transgenes administrados por el vector rAAV se pueden formular para
15 administración ya sea encapsulados en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera o una nanopartícula o similar.

Dichas formulaciones se pueden preferir para la introducción de formulaciones farmacéuticamente aceptables de los ácidos
20 nucleicos o las construcciones de rAAV descritas en la presente. La formación y el uso de liposomas, en general, son conocidos por los expertos en la técnica. Recientemente, se desarrollaron liposomas con estabilidad sérica y semividas en circulación mejoradas (patente estadounidense n.º 5,741,516).

Además, se han descrito diversos métodos de preparaciones de liposomas y tipo liposoma como posibles portadores de fármacos (patentes estadounidenses n.º 5,567,434; 5,552,157; 5,565,213; 5,738,868 y 5,795,587).

5 Los liposomas se han utilizado con éxito con una serie de tipos celulares que normalmente son resistentes a la transfección mediante otros procedimientos. Además, los liposomas carecen de las restricciones de longitud de ADN que son típicas de los sistemas de administración basados en
10 virus. Los liposomas se han utilizado de forma eficaz para introducir genes, fármacos, agentes radioterapéuticos, virus, factores de transcripción y efectores alostéricos en diversas líneas celulares cultivadas y animales. Además, se han realizado diversos ensayos clínicos exitosos que analizan la
15 eficacia de la administración de fármacos mediada por liposomas.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman de forma espontánea vesículas de bicapa concéntrica multilamelar (también
20 denominadas vesículas multilamelares (MLV). Las MLV generalmente tienen diámetros de entre 25 nm y 4 µm. La sonicación de las MLV produce la formación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con diámetros en el intervalo de entre 200 y 500Å, que contienen una solución acuosa en el

núcleo.

Alternativamente, se pueden utilizar formulaciones de nanocápsulas del rAAV. Por lo general, las nanocápsulas pueden atrapar sustancias en forma estable y reproducible.

5 Para evitar los efectos secundarios ocasionados por una sobrecarga polimérica intracelular, se deben diseñar dichas partículas ultrafinas (con un tamaño de alrededor de 0.1 μm) mediante el uso de polímeros con capacidad de degradación in vivo. Las nanopartículas biodegradables de polialquil-
10 cianoacrilato que cumplen con estos requisitos se consideran para el uso.

Además de los métodos de administración descritos anteriormente, las siguientes técnicas también se consideran como métodos alternativos para administrar las composiciones
15 de rAAV a un hospedador. Se ha utilizado la sonoforesis (es decir, el ultrasonido) y se describe en la patente estadounidense n.º 5,656,016 como un dispositivo para mejorar la velocidad y la eficacia de la permeación del fármaco hacia y a través del sistema circulatorio. Otras alternativas de
20 administración de fármacos contempladas son la inyección intraósea (patente estadounidense n.º 5,779,708), dispositivos de microchip (patente estadounidense n.º 5,797,898), formulaciones oftálmicas (Bourlais et ál., 1998), matrices transdérmicas (patente estadounidense n.º 5,770,219

y 5,783,208) y administración controlada por respuesta (patente estadounidense n.º 5,697,899).

Métodos generales relacionados con la administración de las composiciones de rAAV

- 5 La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas estables que comprenden viriones de rAAV. Las composiciones permanecen estables y activas incluso cuando se someten a ciclos de congelación/descongelación y cuando se almacenan en recipientes hechos de diversos materiales, incluido vidrio.
- 10 Los viriones de AAV recombinantes que contienen una secuencia de nucleótidos heteróloga de interés se pueden utilizar para la administración de genes, tal como en las aplicaciones de terapias génicas, para la producción de animales transgénicos, en la vacunación de ácido nucleico, ribozima y
- 15 terapia antisentido, así como para la administración de genes *in vitro*, a diversos tipos de células.

Generalmente, los viriones de rAAV se introducen en las células de un sujeto utilizando técnicas de transducción *in vivo* o *in vitro*. Si se transduce *in vitro*, la célula

20 receptora deseada se retirará del sujeto, se transducirá con viriones de rAAV y se reintroducirá en el sujeto. Alternativamente, se pueden utilizar células singénicas o xenogénicas en donde estas células no generan una respuesta inmunitaria inadecuada en el sujeto.

Se han descrito métodos adecuados para el suministro y la introducción de las células transducidas en un sujeto. Por ejemplo, se pueden transducir células *in vitro* mediante la combinación de viriones de AAV recombinantes con las células, p. ej., en un medio adecuado, y la detección de las células que albergan el ADN de interés utilizando técnicas convencionales como análisis de inmunotransferencia Southern y/o PCR o mediante el uso de marcadores seleccionables. Las células transducidas después se pueden formular en composiciones farmacéuticas, que se describen en mayor detalle abajo, y la composición se puede introducir en el sujeto mediante diversas vías, tales como inyección intramuscular, intravenosa, intraarterial, subcutánea e intraperitoneal, o mediante inyección en el músculo liso, utilizando, p. ej., un catéter o directamente en un órgano.

Para la administración *in vivo*, los viriones de rAAV se formulan en una composición farmacéutica y generalmente se administran por vía parenteral, p. ej., mediante inyección intramuscular directamente en el músculo esquelético, por vía intraarticular, intravenosa o directamente en un órgano.

Las dosis adecuadas dependerán del sujeto que se esté tratando (p. ej., un ser humano o un primate no humano u otro mamífero), la edad y el estado general del sujeto que se esté tratando, la gravedad de la afección que se esté tratando, el

modo de administración de los viriones de rAAV, entre otros factores. Una cantidad eficaz adecuada puede ser determinada fácilmente por los expertos en la técnica.

Por lo tanto, una "cantidad terapéuticamente eficaz" estará
5 comprendida en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar mediante ensayos clínicos. Por ejemplo, para la inyección *in vivo*, es decir, la inyección directamente al sujeto, una dosis terapéuticamente eficaz será de entre aproximadamente 10^5 y 10^{16} de los viriones de rAAV, más
10 preferentemente, entre 10^8 y 10^{14} de los viriones de rAAV. Para la transducción *in vitro*, una cantidad eficaz de viriones de rAAV que se debe administrar a las células será de entre 10^5 y 10^{13} , preferentemente, entre 10^8 y 10^{13} de los viriones de rAAV. Si la composición comprende células
15 transducidas que se van a administrar nuevamente al sujeto, la cantidad de células transducidas en las composiciones farmacéuticas será de entre aproximadamente 10^4 y 10^{10} células, más preferentemente, entre 10^5 y 10^8 células. La dosis, desde luego, depende de la eficacia de la
20 transducción, la fuerza del promotor, la estabilidad del mensaje y la proteína codificada por este, etc. Un experto en la técnica puede establecer fácilmente las dosificaciones eficaces mediante ensayos de rutina que establecen curvas de respuesta a la dosis.

La dosificación de tratamiento puede ser un cronograma de dosis individual o un cronograma de dosis múltiples para administrar, en última instancia, la cantidad especificada arriba. Además, se le pueden administrar al sujeto tantas
5 dosis como sea adecuado. Por lo tanto, se le pueden dar al sujeto, p. ej., entre 10^5 y 10^{16} viriones de rAAV en una única dosis, o dos, cuatro, cinco, seis o más dosis, lo que da como resultado en su conjunto la administración, p. ej., de entre 10^5 y 10^{16} viriones de rAAV. El experto en la técnica podrá
10 determinar fácilmente la cantidad de dosis que se deben administrar.

Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas comprenderán material genético suficiente para producir una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de interés, es decir,
15 una cantidad suficiente para reducir o mejorar los síntomas del estado de enfermedad en cuestión o una cantidad suficiente para conferir el beneficio deseado. Por ende, los viriones de rAAV estarán presentes en las composiciones en cuestión en una cantidad suficiente para proporcionar un
20 efecto terapéutico cuando se administran en una o más dosis. Los viriones de rAAV se pueden proporcionar como preparaciones liofilizadas y diluirse en las composiciones estabilizadoras de viriones para uso inmediato o futuro. Alternativamente, los viriones de rAAV se pueden proporcionar

inmediatamente después de la producción y almacenar para su uso futuro.

Las composiciones farmacéuticas también contendrán un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos excipientes

5 incluyen cualquier agente farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición y que se pueden administrar sin toxicidad indebida. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, de modo no taxativo, líquidos como agua,

10 solución salina, glicerol y etanol. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden incluir allí, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos,

15 benzoatos y similares. De manera adicional, dichos vehículos pueden contener sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsificantes, sustancias amortiguadoras del pH y similares. Un planteamiento completo de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en REMINGTON'S

20 PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Tal como se usa en la presente, "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" se refiere a un procedimiento o técnica en la cual se amplifican secuencias de ácido nucleico específicas, ARN y/o ADN, tal como se describe, p. ej., en la

patente estadounidense n.º 4,683,195. Generalmente, la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá se utiliza para diseñar los cebadores de oligonucleótidos. Estos cebadores serán idénticos o similares en secuencia a las cadenas opuestas de la plantilla que se amplificará. Los nucleótidos en el extremo 5' de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR puede utilizarse para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas del ADN genómico total, y ADNc transcrito a partir de ARN celular total, secuencias de plásmidos o bacteriófagos, etc. Ver generalmente Mullis et ál., (1987) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263; Erlich, ed., (1989) *PCR TECHNOLOGY* (Stockton Press, N.Y.) Tal como se usa en la presente, la PCR se considera como un ejemplo, pero no el único, de un método de reacción de polimerasa de ácido nucleico para amplificar una muestra de prueba de ácido nucleico, que comprende el uso de un ácido nucleico conocido como cebador y una polimerasa de ácido nucleico para amplificar o generar un trozo específico del ácido nucleico.

Ácidos nucleicos

La invención también comprende determinadas construcciones y ácidos nucleicos que codifican la proteína Glut1 descrita en la presente. Determinadas construcciones y secuencias,

incluidas las secuencias seleccionadas enumeradas en la tabla 1 que incluyen SEQ ID NO:28-75 y 80-97, y en determinados aspectos una o más de SEQ ID NO: 2-5, 7-9, 11-14, 16-18, 20-23, 25-27 y 80-95 pueden ser útiles en las modalidades de la presente invención. De manera inesperada, tal como se describe en la presente, se ha descubierto que la inclusión de las secuencias de ácido nucleico que codifican el péptido 2A no expresa los niveles deseados de Glut1. Por lo tanto, las construcciones de rAAV preferidas carecerán de los ácidos nucleicos SEQ ID NO: 6, 15 y/o 24, los cuales corresponden todos a las secuencias codificantes 2A.

Preferentemente, los ácidos nucleicos se hibridan en condiciones de rigurosidad baja, moderada o alta, y codifican una proteína Glut1 que mantiene la función biológica. Una primera molécula de ácido nucleico es "hibridable" con una segunda molécula de ácido nucleico cuando una forma de cadena simple de la primera molécula de ácido nucleico puede hibridarse con la segunda molécula de ácido nucleico en las condiciones adecuadas de temperatura y potencia iónica de la solución (véase Sambrook, et ál., supra). Las condiciones de temperatura y potencia iónica determinan la "rigurosidad" de la hibridación. Las condiciones de hibridación de rigurosidad baja típicas incluyen 55 °C, 5X SSC, SDS al 0.1 % y sin formamida; o formamida al 30 %, 5X SSC, SDS al 0.5 % a 42 °C.

Las condiciones de hibridación de rigurosidad moderada típicas son formamida al 40 %, con 5X o 6X SSC y SDS al 0.1 % a 42 °C. Las condiciones de hibridación de rigurosidad alta son formamida al 50 %, 5X o 6X SSC a 42 °C u, opcionalmente, a una mayor temperatura (p. ej., 57 °C, 59 °C, 60 °C, 62 °C, 63 °C, 65 °C o 68 °C). En general, SSC es NaCl 0.15 M y Na-citrato 0.015 M. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque, dependiendo de la rigurosidad de la hibridación, son posibles los mal apareamientos entre bases. La rigurosidad adecuada para la hibridación de los ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementación, variables que son conocidas en la técnica. Cuanto mayor sea el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor será la rigurosidad a la cual se pueden hibridar los ácidos nucleicos. Para híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han derivado las ecuaciones para calcular la temperatura de fusión (véase Sambrook, et ál., supra, 9.50-9.51). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, p. ej., oligonucleótidos, la posición de los mal apareamientos se vuelve más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook, et ál., supra, 11.7-11.8).

Los polipéptidos de Glut1 que comprenden secuencias de

aminoácidos que son al menos aproximadamente 70 % idénticas, preferentemente, al menos aproximadamente 80 % idénticas, más preferentemente, al menos aproximadamente 90 % idénticas y, más preferentemente, al menos aproximadamente 95% idénticas (p. ej., 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %) a las secuencias de aminoácidos de mGlut1 o hGlut1 proporcionadas en la presente (p. ej., SEQ ID NO:78 y SEQ ID NO:79) se consideran con respecto al restablecimiento de la función de Glut1, cuando la comparación se realiza mediante un algoritmo BLAST, en donde los parámetros del algoritmo se seleccionan para proporcionar la mayor coincidencia entre las respectivas secuencias a lo largo de la longitud completa de las respectivas secuencias de referencia. Los polipéptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos que son al menos aproximadamente 70 % similares, preferentemente, al menos aproximadamente 80 % similares, más preferentemente, al menos aproximadamente 90 % similares y, más preferentemente, al menos aproximadamente 95 % similares (p. ej., 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %) a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de Glut1 de referencia cuando la comparación se realiza con un algoritmo BLAST, en donde los parámetros del algoritmo se seleccionan para proporcionar la mayor coincidencia entre las respectivas secuencias a lo largo de la longitud completa de las respectivas secuencias de

referencia, también se incluyen en las construcciones y los métodos de la presente invención.

La identidad de secuencia se refiere al grado al que los aminoácidos de dos polipéptidos son iguales en posiciones
5 equivalentes cuando las dos secuencias se alinean de forma óptima. La similitud de secuencia incluye residuos idénticos y aminoácidos no idénticos, relacionados desde el punto de vista bioquímico. Los aminoácidos relacionados desde el punto de vista bioquímico que comparten propiedades similares y se
10 pueden intercambiar se plantean arriba.

“Homología” se refiere a una similitud de secuencia entre dos secuencias de polinucleótidos o entre dos secuencias de polipéptidos cuando se alinean en forma óptima. Cuando una posición en ambas de las secuencias comparadas está ocupada
15 por la misma subunidad de monómero de aminoácido o base, por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces las moléculas son homólogas en dicha posición. El porcentaje de homología es la cantidad de posiciones homólogas compartidas por las dos
20 secuencias dividida entre la cantidad total de posiciones comparadas $\times 100$. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones de dos secuencias coinciden o son homólogas cuando las secuencias se alinean de forma óptima, entonces las dos secuencias son 60 % homólogas. Generalmente, la comparación

se realiza cuando dos secuencias se alinean para proporcionar un porcentaje máximo de homología.

Las siguientes referencias se refieren a los algoritmos BLAST que se utilizan a menudo para el análisis de secuencias:

- 5 ALGORITMOS BLAST: Altschul, S.F., et ál., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., et ál., (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L., et ál., (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F., et ál., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., et ál., (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J.C., et ál., (1993) Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J.M. et ál., (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; SISTEMAS DE PUNTAJE DE ALINEACIÓN: Dayhoff, M.O., et ál., "A model of evolutionary change in proteins." en Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) tomo 5, suplemento 3. M.O. Dayhoff (ed.), págs. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Schwartz, R.M., et ál., "Matrices for detecting distant relationships." en Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) tomo 5, suplemento 3." M.O. Dayhoff (ed.), págs. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S.F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D.J., et ál., (1991) Methods 3:66-70; Henikoff, S., et ál., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 89:10915-10919; Altschul, S.F., et ál., (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; ESTADÍSTICA DE ALINEACIÓN: Karlin, S., et ál., (1990) Proc.

Natl. Acad. Sci. EUA 87:2264-2268; Karlin, S., et ál., (1993)
Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90:5873-5877; Dembo, A., et ál.,
(1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; y Altschul, S.F. "Evaluating
the statistical significance of multiple distinct local
5 alignments." en Theoretical and Computational Methods in
Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) p. 1-14, Plenum,
Nueva York.

La presente invención también proporciona vectores de
expresión que comprenden diversos ácidos nucleicos, en donde
10 el ácido nucleico está unido de forma operativa a las
secuencias de control que son reconocidas por una célula
hospedadora cuando la célula hospedadora se transfecta con el
vector. También se proporcionan los viriones que comprenden
AAV 9 recombinante y determinadas secuencias de AAV2, así
15 como las secuencias de ácido nucleico para expresar Glut-1
según la indicación del promotor de la β -actina de pollo y
un potenciador del CMV. Dentro de estas construcciones, las
secuencias de rAAV2 corresponden a las secuencias de ITR 5' y
3', p. ej., SEQ ID NOS: 2, 9, 29, 34, 36, 41 y otras, según
20 se describen en la tabla 1). Estas secuencias se empaquetaron
con la cápside de AAV9 para formar los viriones que son
terapéuticos para la deficiencia de Glut-1 en la presente
invención.

Composiciones farmacéuticas y administración

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles de las composiciones de la presente invención, los vectores de AAV9 o las composiciones relacionadas se pueden mezclar con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Véase, p. 5 ej., *Remington's Pharmaceutical Sciences* y *U.S. Pharmacopeia: National Formulary*, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984).

Las formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico se pueden preparar mediante la mezcla con portadores, 10 excipientes o estabilizantes aceptables en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, suspensiones, soluciones o suspensiones acuosas (véase, por ejemplo, Hardman, et ál. (2001) *The Pharmacological Basis of Therapeutics* de Goodman y Gilman, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro (2000) 15 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams y Wilkins, Nueva York, NY; Avis, et ál. (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et ál. (eds.) (1990) 20 *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et ál. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY).

La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones

terapéuticas, administradas solas o junto con otro agente, pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico (LD₅₀/ ED₅₀). En aspectos particulares, las composiciones terapéuticas que presentan índices terapéuticos altos son deseables. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y los estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración.

En una modalidad de la invención, se administra una composición de la invención a un sujeto de acuerdo con Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; 57^o edición (1 de noviembre de 2002)).

El modo de administración puede variar. Las vías de administración adecuadas incluyen la oral, rectal,

transmucosa, intestinal, parenteral; intramuscular, subcutánea, intradérmica, intramedular, intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, intraocular, inhalación, insuflación, tópica, cutánea, transdérmica o intraarterial.

En modalidades particulares, la composición o agente terapéutico se puede administrar mediante una vía invasiva, tal como mediante inyección (véase arriba). En otras modalidades de la invención, la composición, el agente terapéutico o la composición farmacéutica de estos, se administra por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraarterial, intraarticular (p. ej., en las articulaciones con artritis), intratumoral o mediante inhalación, suministro por aerosol. La administración mediante vías no invasivas (por ejemplo, por vía oral, por ejemplo, en una píldora, cápsula o comprimido) también se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

Las composiciones pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención se puede administrar mediante inyección con una aguja hipodérmica, lo que incluye, p. ej., una jeringa precargada o un autoinyector.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar con un dispositivo de inyección

hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos que se describen en las patentes estadounidenses n.º 6,620,135; 6,096,002; 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 o 4,596,556.

5 Alternativamente, se puede administrar el vector AAV9 o un compuesto relacionado de forma local, en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección o directamente en el sitio objetivo deseado, a menudo en una formulación de depósito o liberación sostenida. Asimismo, es posible administrar la
10 composición en un sistema de administración de fármaco dirigido, por ejemplo, en un liposoma revestido con un anticuerpo específico para un tejido, que se dirige, por ejemplo, al cerebro. Los liposomas estarán dirigidas al tejido deseado y serán absorbidas de manera selectiva por
15 este.

El régimen de administración depende de varios factores, que incluyen el índice de renovación del suero o tejido de la composición terapéutica, el nivel de los síntomas y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica.
20 Preferentemente, el régimen de administración suministra suficiente composición terapéutica para provocar una mejora del estado de la enfermedad diana, a la vez que minimiza los efectos secundarios no deseados. Por consiguiente, la cantidad de agente biológico administrado depende, en parte,

de la composición terapéutica particular y de la gravedad de la afección que se esté tratando.

La determinación de la dosis adecuada la realiza el médico, por ejemplo, usando los parámetros o factores que se sabe o
5 sospecha en la técnica que afectan el tratamiento. En general, la dosis comienza con una cantidad algo inferior a la dosis óptima y luego aumenta en pequeños incrementos hasta que se logra el efecto deseado u óptimo con respecto a cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de
10 diagnóstico importantes incluyen los síntomas, por ejemplo, de la inflamación o el nivel de citocinas inflamatorias producidos. En general, es deseable que el agente biológico que se utilice se obtenga de la misma especie que el animal al que se dirige el tratamiento, minimizando así cualquier
15 respuesta inmunológica al reactivo.

Tal como se utiliza en la presente, "inhibir" o "tratar" o "tratamiento" incluyen una postergación del desarrollo de los síntomas asociados con un trastorno y/o una reducción de la gravedad de los síntomas de dicho trastorno. Los términos
20 incluyen además mejorar los síntomas actuales no controlados o no deseados, evitar síntomas adicionales y mejorar o prevenir las causas subyacentes de dichos síntomas. Por ende, los términos denotan que se ha conferido un resultado beneficioso a un sujeto vertebrado con un trastorno, una

enfermedad o un síntoma, o con la posibilidad de desarrollar dicho trastorno, enfermedad o síntoma.

Tal como se utilizan en la presente, las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz", "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se refieren a una cantidad de un compuesto basado en rAAV9-Glut1 de la invención que, cuando se administra solo o combinado con otro agente terapéutico a una célula, tejido o sujeto, es eficaz para provocar una mejora medible en uno o más síntomas de una enfermedad o afección o el avance de dicha enfermedad o afección. Una dosis terapéuticamente eficaz además se refiere a la cantidad del compuesto suficiente para producir una mejora al menos parcial de los síntomas, p. ej., el tratamiento, la curación, la prevención o la mejora de la afección médica pertinente, o un aumento en la velocidad del tratamiento, la curación, la prevención o la mejora de dichas afecciones. Cuando se aplica a un individuo el ingrediente activo que se administra solo, una dosis terapéuticamente eficaz hace referencia a dicho ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente eficaz hace referencia a cantidades combinadas de los ingredientes activos que generan el efecto terapéutico, ya sea que se administren combinadas, en serie o de forma simultánea. Una cantidad eficaz de un agente terapéutico generará una mejora de una medida o parámetro de

diagnóstico en al menos 10 %; generalmente en al menos 20 %; preferentemente al menos alrededor de 30 %; más preferentemente al menos 40 %, y más preferentemente en al menos 50 %. Una cantidad eficaz también puede generar una mejora de una medida subjetiva en los casos en los que se usen medidas subjetivas para evaluar la gravedad de la enfermedad.

Kits

La presente invención también proporciona kits que comprenden los componentes de las combinaciones de la invención en forma de kit. Un kit de la presente invención incluye uno o más componentes que incluyen, entre otros, un compuesto basado en rAAV9-Glut1, tal como se planteó en la presente, asociado con uno o más componentes adicionales que incluyen, entre otros, un portador farmacéuticamente aceptable y/o un agente quimioterapéutico, tal como se planteó en la presente. El compuesto o la composición basados en rAAV9-Glut1 y/o el agente terapéutico se pueden formular como una composición pura o junto con un portador farmacéuticamente aceptable, en una composición farmacéutica.

En una modalidad, un kit incluye un compuesto/una composición basados en rAAV9-Glut1 de la invención o una composición farmacéutica de estos en un recipiente (por ejemplo, en un recipiente de plástico o vidrio esterilizado) y una

composición farmacéutica de estos y/o un agente quimioterapéutico en otro recipiente (por ejemplo, en un recipiente de plástico o vidrio esterilizado).

En otra modalidad de la invención, el kit comprende una
5 combinación de la invención, que incluye un compuesto basado en rAAV9-Glut1, junto con un portador farmacéuticamente aceptable, opcionalmente junto con uno o más componentes de agentes quimioterapéuticos formulados en conjunto, opcionalmente, en una composición farmacéutica, en un único
10 recipiente común.

Si el kit incluye una composición farmacéutica para administración parenteral a un sujeto, el kit puede incluir un dispositivo para llevar a cabo dicha administración. Por ejemplo, el kit puede incluir una o más agujas hipodérmicas u
15 otros dispositivos de inyección como se describió anteriormente.

El kit puede incluir un prospecto que incluye información relacionada con las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación en el kit. En general, dicha información
20 ayuda a los pacientes y a los médicos a utilizar las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación contenidas de manera eficaz y segura. Por ejemplo, la siguiente información con respecto a una combinación de la invención puede proporcionarse en el prospecto:

farmacocinética, farmacodinámica, estudios clínicos, parámetros de eficacia, indicaciones y uso, contraindicaciones, avisos, precauciones, reacciones adversas, sobredosis, dosificación y administración
5 adecuadas, modo de administración, condiciones de almacenamiento adecuadas, referencias, información sobre el fabricante/distribuidor e información sobre los pacientes.

MÉTODOS GENERALES

10 Los métodos estándar en biología molecular se describen en Sambrook, Fritsch y Maniatis (1982 y 1989 2ª edición, 2001 3ª edición) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3ª ed., Cold Spring Harbor
15 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, tomo 217, Academic Press, San Diego, CA). Los métodos estándar también figuran en Ausbel, et ál. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, tomos 1-4, John Wiley and Sons, Inc. Nueva York, NY, que describe la clonación en
20 células bacterianas y mutagénesis de ADN (tomo 1), clonación en células de mamífero y levadura (tomo 2), expresión de proteínas y glicoconjugados (tomo 3) y bioinformática (tomo 4).

Se describen métodos para la purificación de proteínas que

incluyen inmunoprecipitación, cromatografía, electroforesis, centrifugación y cristalización (Coligan, et ál. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, tomo 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York). Se describen análisis químico, modificación química, modificación postraducciona, producción de proteínas de fusión, glicosilación de proteínas (véase, p. ej., Coligan, et ál. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, tomo 2, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Ausubel, et ál. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, tomo 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, p. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; p. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., p. 384-391). Se describen la producción, purificación y fragmentación de anticuerpos policlonales y monoclonales (Coligan, et ál. (2001) *Current Protocols in Immunology*, tomo 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, *supra*). Se encuentran disponibles las técnicas estándar para la caracterización de interacción entre ligando/receptor (véase, p. ej., Coligan, et ál. (2001) *Current Protocols in Immunology*, tomo 4, John Wiley, Inc., Nueva York).

Abreviaturas

AAV: virus adeno-asociado

rAAV virus adeno-asociado recombinante o vector viral

BBB: barrera hematoencefálica

FMDV: virus de la fiebre aftosa

5 GFP: proteína fluorescente verde

Glut1: transportador de glucosa 1, también conocido como familia portadora de solutos 2, miembro 1 del transportador de glucosa facilitado (SLC2A1), es una proteína uniporte que en los seres humanos está codificada por el gen *SLC2A1*. El

10 Glut1 facilita el transporte de la glucosa a través de las membranas plasmáticas de las células mamíferas. Glut1 fue el primer transportador de glucosa que se caracterizó. Glut1 1 se encuentra altamente conservado con la proteína Glut1 humana (hGlut1) (n.º de acceso: NP_006507.2; SEQ ID NO:79) y

15 la proteína Glut1 de ratón (mGlut1) (n.º de acceso: NP_035530.2; SEQ ID NO:78), comparten el 98 % de homología. Glut1 presenta 40 % de homología con otros Glut.

SLC2A1: gen codificante del transportador de glucosa humano 1 (hGlut1). *SLC2A1* humano (n.º de acceso: NG_008232.1; ID de

20 gen - 6513).

Slc2a1: gen codificante de Glut1 de ratón (mGlut1) (n.º de acceso: N.º genómico: NC_000070.6; ID de gen - 20525).

GLUT1 DS: síndrome de deficiencia de Glut1

PND: día posnatal

PND3: día posnatal 3

EJEMPLOS**Tabla 1-Plásmidos de Glut1 recombinantes**

Construcciones de EGFP-2A-Glut1			
5	Humano	pAAV CB6 PI EGFP-2A-hGlut1 (SEQ ID NO: 1) Características claves de la construcción 5' ITR (SEQ ID NO: 2) potenciador de CMV IE (SEQ ID NO: 3) promotor de CB (SEQ ID NO: 4) eGFP (SEQ ID NO: 5) 2A-enlazador (SEQ ID NO: 6) ADNc de hGlut1 y 3'UTR (SEQ ID NO: 7) Señal poli A (SEQ ID NO: 8) 3' ITR (SEQ ID NO: 9)	No expresó hGlut1
10	ratón	pAAV CB6 PI EGFP-2A-mGlut1 (SEQ ID NO: 10) Características claves de la construcción 5' ITR (SEQ ID NO: 11) potenciador de CMV IE (SEQ ID NO: 12) promotor de CB (SEQ ID NO: 13) eGFP (SEQ ID NO: 14) 2A-enlazador (SEQ ID NO: 15) ADNc de mGlut1 y 3'UTR (SEQ ID NO: 16) Señal poli A (SEQ ID NO: 17) 3' ITR (SEQ ID NO: 18)	No expresó mGlut1
Construcciones de Glut1-2A-EGFP			
15	humano	pAAV CB6 PI hGlut1-2A-EGFP (SEQ ID NO: 19) Características claves de la construcción 5' ITR (SEQ ID NO: 20) potenciador de CMV IE (SEQ ID NO: 21) promotor de CB (SEQ ID NO: 22) ADNc de hGlut1 (SEQ ID NO: 23) 2A-enlazador (SEQ ID NO: 24) eGFP (SEQ ID NO: 25) Señal poli A (SEQ ID NO: 26) 3' ITR (SEQ ID NO: 27)	No expresó hGlut1
20	ratón	pAAV CB6 PI mGlut1-2A-EGFP SEQ ID NO:88 Características claves de la construcción 5' ITR (SEQ ID NO: 89) potenciador de CMV IE (SEQ ID NO:90) promotor de CB (SEQ ID NO:91) eGFP (SEQ ID NO:92) ADNc de mGlut1 y 3'UTR (SEQ ID NO: 93) Señal poli A (SEQ ID NO: 94) 3' ITR (SEQ ID NO: 95)	No expresó mGlut1

5	Construcciones de Glut1 naturales		
	humano	pAAV9-CB6 PI hGlut1 pAAV CB6 PI hGlut1 (SEQ ID NO: 28) Características claves de la construcción 5' ITR (SEQ ID NO: 29) potenciador de CMV IE (SEQ ID NO: 30) promotor de CB (SEQ ID NO: 31) ADNc de hGlut1 (SEQ ID NO: 32) Señal poli A (SEQ ID NO: 33) 3' ITR (SEQ ID NO: 34)	Expresa hGlut1
	ratón	pAAV9-CB6 PI mGlut1 pAAV CB6 PI mGlut1 (SEQ ID NO: 35) Características claves de la construcción 5' ITR (SEQ ID NO: 36) potenciador de CMV IE (SEQ ID NO: 37) promotor de CB (SEQ ID NO: 38) ADNc de mGlut1 (SEQ ID NO: 39) Señal poli A (SEQ ID NO: 40) 3' ITR (SEQ ID NO: 41)	Expresa mGlut1
	Construcciones de Glut1-mir122		
	humano	pAAV CB6 PI hGlut1-out3xmiR-122 BS (SEQ ID NO: 42) Características claves de la construcción 5' ITR (SEQ ID NO: 43) potenciador de CMV IE (SEQ ID NO: 44) promotor de CB (SEQ ID NO: 45) ADNc de hGlut1 (SEQ ID NO: 46) 3' UTR (SEQ ID NO: 47) 3xmiR-122 BS (SEQ ID NO: 48) Señal poli A (SEQ ID NO: 49) 3' ITR (SEQ ID NO: 50)	expresión de hGlut1 TBD
15	Humano	pAAV CB6 PI hGlut1-in3xmiR-122 BS (SEQ ID NO: 51) Características claves de la construcción 5' ITR (SEQ ID NO: 52) potenciador de CMV IE (SEQ ID NO: 53) promotor de CB (SEQ ID NO: 54) ADNc de hGlut1 (SEQ ID NO: 55) 3' UTR y 3xmiR-122 (SEQ ID NO: 56) Señal poli A (SEQ ID NO: 57) 3' ITR (SEQ ID NO: 58)	expresión de hGlut1 TBD
	ratón	pAAV CB6 PI mGlut1-in3xmiR-122 BS (SEQ ID NO: 59) Características claves de la construcción 5' ITR (SEQ ID NO: 60) potenciador de CMV IE (SEQ ID NO: 61) promotor de CB (SEQ ID NO: 62) ADNc de mGlut1 (SEQ ID NO: 63) 3' UTR y 3x-miR122BS (SEQ ID NO: 64) Señal poli A (SEQ ID NO: 65) 3' ITR (SEQ ID NO: 66)	expresión de mGlut1 TBD
20			

5	ratón	pAAV CB6 PI mGlut1-out3xmiR-122 BS (SEQ ID NO: 67) Características claves de la construcción 5' ITR (SEQ ID NO: 68) potenciador de CMV IE (SEQ ID NO: 69) promotor de CB (SEQ ID NO: 70) ADNc de mGlut1 (SEQ ID NO: 71) 3' UTR (SEQ ID NO: 72) 3xmiR-122BS (SEQ ID NO: 73) Señal poli A (SEQ ID NO: 74) 3' ITR (SEQ ID NO: 75)	expresión de mGlut1 TBD
	Construcción de EGFP humana		
10		pAAV CB6 PI hGlut1-EGFP SEQ ID NO:80 Características claves de la construcción 5' ITR (SEQ ID NO: 81) potenciador de CMV IE (SEQ ID NO: 82) promotor de CB (SEQ ID NO: 83) eGFP (SEQ ID NO: 84) ADNc de mGlut1 (SEQ ID NO: 85) Señal poli A (SEQ ID NO: 86) 3' ITR (SEQ ID NO: 87)	Expresa hGlut1

Desarrollo de construcción de AAV recombinante

Se generaron cuatro construcciones de ADN que poseían el gen *SLC2A1* murino o humano unido al casete de nucleótidos que

15 codifica el indicador de proteína fluorescente verde (GFP), tal como se muestra en las figuras 1A-B. Estas cuatro construcciones también contienen una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido 2A de 16 aminoácidos de longitud del virus de la fiebre aftosa (FMDV) incorporado

20 entre los marcos de lectura abiertos de GFP y Glut1. El péptido 2A se incluye en la construcción para evitar la posibilidad de que las proteínas de fusión Glut1-GFP puedan alterar la estructura o la actividad de la proteína Glut1. El péptido 2A media la "escisión" cis primaria de la

poliproteína de FMDV en una cascada de eventos de procesamiento que, en última instancia, genera las proteínas de FMDV maduras (Donnelly, M.L. et ál. (2001)). Se esperaba que esta estrategia creara construcciones en las cuales la
5 proteína Glut1 se generara en su estado natural. Sin embargo, tal como se describe abajo, ninguna de estas construcciones expresó Glut1 en niveles satisfactorios.

También se desarrollaron seis construcciones de ADN adicionales sin el ácido nucleico que codifica el péptido 2A
10 (figura 1C-D), varias de las cuales incluyen elementos que proporcionan que la expresión del gen *SLC2A1* se desactiva selectivamente en el hígado (figura 1D). Estas construcciones se desarrollaron para abordar la posibilidad de que el aumento sistemático del gen *SLC2A1* en experimentos de terapia
15 génica futuros podría dar lugar a la expresión de niveles altos de la proteína en el hígado, lo que podría aumentar el proceso de glicogénesis y, por ende, inducir un estado hipoglicémico. Por último, también se han generado construcciones que contienen exclusivamente el gen *SLC2A1*
20 humano o de ratón natural con fines de control (figura 1C). pAAV9 CB6 PI hGlut1, pAAV9 CB6 PI hGlut1 out3xmiR122BS y pAAV9 CB6 PI hGlut1 in3xmiR122BS se utilizarán en los experimentos de validación. Las secuencias y las características claves de estas construcciones se enumeran en

la tabla 1 y en el listado de secuencias correspondiente SEQ ID NO:1-97.

Análisis de expresión inicial de plásmidos de rAAV transfectados en células CHO

5 Se utilizaron dos líneas celulares para evaluar los diversos plásmidos recombinantes en el cultivo celular. Una línea celular es una línea de ovario de hámster chino (CHO), la otra es una línea de fibroblastos derivada de un paciente de Glut1 (Yang et ál. 2011). Los experimentos de cultivo celular
10 y los análisis de transferencia Western posteriores indicaron que las construcciones de plásmidos que contenían el péptido 2A no expresaron ni Glut1 ni GFP en niveles satisfactorios. Aunque es inesperado, es posible que en el contexto del gen *SLC2A1/slc2A1*, el péptido 2A afecte de forma adversa la
15 expresión de la proteína. Por el contrario, se descubrió que las construcciones de control que contienen solo los genes *SLC2A1* humanos y de ratón expresan niveles elevados de proteína. No se buscó adicionalmente ninguna de las construcciones de Glut1 que contenían 2A (figura 1A-B) para
20 restablecer la expresión de Glut1 en los sistemas de modelos mutantes.

Para evitar las dificultades de expresión introducidas por la presencia del péptido 2A en las primeras cuatro construcciones (figura 1A-B), se evaluó una proteína de

fusión hGlut1-eGFP (denominada phGlut1::eGFP). Los experimentos de cultivo celular indicaron que la proteína de fusión no solo se expresa, sino que también es funcional en el ensayo de absorción de glucosa. Esta construcción
5 (phGlut1::eGFP), junto con las construcciones que contienen solo los genes *slc2a1* de ratón o *SLC2A1* humano se consideran para su uso en experimentos *in vivo* que comprenden la terapia génica de los ratones del modelo de Glut1.

Clonación del plásmido AAV9 y empaquetamiento posterior del 10 **vector viral**

La construcción de la proteína de fusión hGlut1-eGFP (phGlut1::eGFP) se clonó nuevamente en el plásmido AAV9 para el empaquetamiento posterior en el vector viral. Para garantizar que la construcción clonada nuevamente continuara
15 expresando la proteína, se transfectó transitoriamente en células de ovario de hámster chino (CHO) y se analizaron los niveles de proteína mediante análisis de transferencia western (figura 2A). El análisis de la expresión de la proteína en las células CHO mostró que con respecto a las
20 construcciones que expresan solo el ADNc codificante de hGlut1 o la fusión hGlut-eGFP impulsada por un elemento promotor diferente, el plásmido AAV9-hGlut1-eGFP expresó niveles inferiores de Glut1 (figura 2A). Sin embargo, la construcción de fusión modificada (AAV9-hGlut1-eGFP) continuó

expresando la proteína Glut1 en una cantidad eficaz y satisfactoria. Además, la proteína de fusión pareció ser significativamente más grande que la proteína hGlut1 natural, según lo esperado debido a la etiqueta GFP en el extremo 3' del ADNc de Glut1 (figura 2A). Estos resultados están en consonancia con los ensayos de absorción de glucosa en los cuales se descubrió que la proteína hGlut-eGFP aumentaba la absorción de la glucosa en las células CHO (figura 2B). La figura 2C muestra la fluorescencia de GFP de esta construcción después de la transfección en las células CHO. En paralelo, los genes *SLC2A1* humano y *slc2a1* de ratón también se clonaron en el plásmido de AAV9 y, tras la transfección a los fibroblastos de los pacientes, se descubrió que impulsaban la expresión de Glut1 y aumentaban la absorción de glucosa. En consecuencia, se empaquetó cada uno en la cápside de AAV9 y $\sim 10^{13}$ se prepararon copias de genoma para la administración en los ratones del modelo de DS de Glut1. (De acuerdo con los métodos que se describen en la patente estadounidense n.º 8,734,809, y en Grieger y Samulski 2005 y Grieger y Samulski 2012).

Condiciones de empaquetamiento/distribución

Para optimizar las condiciones para la administración de las construcciones que expresan Glut1 empaquetadas en vectores de AAV9, se analizó la distribución de un vector de AAV9-GFP

(Foust, K.D. et ál. 2009) en ratones de tipo silvestre. (De acuerdo con los métodos que se describen en Gao, G.P. y Sena-Esteves, M. (2012), In Molecular Cloning, tomo 2: A Laboratory Manual (M.R. Green y J. Sambrook eds.)).

5 Se evaluó la distribución de la construcción de AAV9-GFP en diferentes tejidos en ratones adultos o neonatales de tipo silvestre. Se encontró fluorescencia verde brillante en los tejidos evaluados de los ratones inyectados con AAV9-GFP, pero no en los ratones inyectados con PBS/control.

10 Esencialmente, se administraron sistémicamente $\sim 4 \times 10^{12}$ copias de genoma del vector en un volumen de $\sim 40 \mu\text{l}$ en los ratones a través del seno retroorbital y la vena temporal. Los resultados de estos experimentos indican que el virus de AAV9 se distribuye en diversos tejidos nerviosos y no

15 nerviosos. En particular, se descubrió que niveles altos se dirigían al músculo esquelético, el corazón y el hígado. Sin embargo, se observó fluorescencia de GFP sustancial en el tejido cerebral, incluido en las células endoteliales positivas para Glut1 que recubren la microvasculatura del

20 cerebro. De manera importante, estas células son los sitios putativos de una terapia dirigida para la DS de Glut1.

Construcciones de AAV9-mGlut1 de control

Tabla 2–

mGlut1 = pAAV9 CB6 PI mGlut1 (SEQ ID NO:35-41).

Tabla 2 - Compendio de Glut1 o vehículo

Cantidad de animales	Sexo	Fecha de inyección	Inyectado con
4	Hembra	5/19	mGlut1
1	Macho	5/15	mGlut1
2	Macho	5/25	mGlut1
2	Hembra	5/25	mGlut1
1	Hembra	5/25	PBS
1	Macho	5/31	PBS
3	Macho	6/1	PBS
2	Macho	6/6	PBS

Una de las construcciones que expresaba las cantidades deseadas de la proteína mGlut1 se empaquetó en el vector viral de AAV9. Aunque esta construcción no tiene una etiqueta marcada (p. ej., GFP), la expresión de Glut1 de esta construcción en los ratones del modelo se puede seguir mediante la evaluación de la proteína mGlut1 total mediante análisis de transferencia Western y experimentos de inmunohistoquímica.

La construcción pAAV9 CB6 PI mGlut1 (SEQ ID NO:35) se introdujo en crías de ratón de Glut1 mutante en el día posnatal (PND) 2 a través del seno retroorbital. Los ratones inyectados con esta construcción actúan como controles para los mutantes inyectados con AAV9-hGlut1-eGFP (SEQ ID NO: 80; véase las características de SEQ ID NO:81-87). Se han inyectado nueve ratones mutantes con la construcción de AAV9-

mGlut1 pAAV9 CB6 PI mGlut1 (tabla 2). Como controles adicionales, se han inyectado siete mutantes con vehículo (PBS) solo. Estos ratones se evaluarán en cuanto a la mejora funcional del fenotipo de la enfermedad. Esto se llevará a cabo determinando los niveles de absorción de glucosa en el tejido cerebral, mediante escaneos PET y mediante la medición del desempeño motriz en las pruebas del cilindro giratorio o el poste vertical de acuerdo con las técnicas estándar (véase Kariya et ál., 2012).

Una de las construcciones utilizadas en los experimentos de reemplazo génico con los ratones del modelo de Glut1DS es la construcción AAV9-hGlut1-eGFP (SEQ ID NO:80). La proteína Glut1 marcada producida a partir de esta construcción permitirá la distribución de la proteína en los diversos sistemas de órganos que se deben seguir, incluidas las células endoteliales que expresan Glut1 de los cerebros de los ratones experimentales. Esto permitirá las condiciones de optimización para la detección de mGlut1 en el cerebro de ratón. La expresión elevada de la proteína mGlut1 en el cerebro se puede detectar utilizando un anticuerpo específico.

El restablecimiento de Glut1 en los ratones mutantes con DS de Glut1 rescata el fenotipo de la enfermedad, según lo ejemplificado por el rescate de la disfunción en el andar

La capacidad del virus adeno-asociado recombinante 9 (rAAV9) de infectar múltiples tipos de células se utilizó como una característica para reintroducir el gen *Slc2a1* murino en un modelo de ratón de la enfermedad humana. Debido a la ausencia de un alelo de *Slc2a1* de tipo silvestre, los ratones con DS de Glut1 presentan un desempeño bajo en el ensayo de cilindro giratorio, una medida de resultado que se cree que modela los defectos del comportamiento motriz, es decir, los fenotipos motrices, observados en los pacientes humanos. Los ratones mutantes se inyectaron con $\sim 4 \times 10^{11}$ copias de genoma de AAV9-Glut1 proporcionadas por la construcción pAAV9 CB6 PI mGlut1 (SEQ ID NO:35) o el vehículo (PBS) en PND3. Se calcularon los valores P utilizando ANOVA de una vía. El restablecimiento del gen *Slc2a1* en los ratones mutantes en PND3 produjo una mejora significativa en el desempeño en el cilindro giratorio (en condiciones estándar; véase Wang et ál. 2006), a las 6 semanas (figura 3A). La mejora en el desempeño persistió hasta las 20 semanas, momento en el cual finalizó el experimento.

Además de la mejora en el desempeño en el ensayo de cilindro giratorio (figura 3A), los ratones tratados también manejan un poste vertical con mayor agilidad que sus contrapartes tratadas con vehículo (figura 3B). Los mutantes tratados tuvieron un desempeño no distinguible de los compañeros de

camada de control de tipo silvestre cuando las cohortes se evaluaron entre 6 y 12 semanas de edad. Estos resultados proporcionan pruebas contundentes de que el restablecimiento de Glut1 en los ratones con DS de Glut1 mitiga las características del fenotipo motriz de la enfermedad humana, lo que indica que el restablecimiento del gen *Slc2a1* en los ratones del modelo mutante es un indicio de valor terapéutico.

El restablecimiento de Glut1 en los ratones mutantes con DS de Glut1 produce un aumento de la expresión del gen en múltiples tejidos.

Para analizar la base molecular del desempeño mejorado de los animales tratados con AAV9-Glut1, se evaluó la expresión del gen *Slc2a1* murino en el tejido cerebral y hepático de los animales. Los animales mutantes tratados con el pAAV9 CB6 PI mGlut1 (SEQ ID NO:35) presentaron mayores niveles del gen *Slc2a1* en el tejido cerebral y hepático (figuras 4A-B). Se extrajo tejido cerebral y hepático de ratones tratados y de control, se preparó el ARN y después se transcribió de forma inversa antes de ampliar la transcripción de *Slc2a1* en un ensayo de Q-PCR. Se utilizó β -actina para normalizar la expresión del gen *Slc2a1*. La figura 4A muestra la expresión del gen *Slc2a1* relativa en los mutantes tratados y los controles pertinentes. La figura 4B muestra la expresión de

Slc2a1 como un porcentaje de la expresión en los ratones *Glut1^{+/+}* de tipo silvestre. Los cebadores que se extienden por el intrón 1 se utilizaron para ampliar la transcripción codificante de *Glut1* por PCR cuantitativa en mutantes

5 tratados (*Glut1^{+/-}*) y controles pertinentes (mutantes *Glut1^{+/-}* tratados con *Glut1^{+/+}* y PBS). Se sometieron a eutanasia los ratones y se extrajeron tejidos después de la perfusión transcardíaca con PBS. Se preparó ARN utilizando el kit Qiagen RNAeasy según las instrucciones del fabricante

10 (Qiagen, Valencia, CA). El ARN se transcribió de forma inversa de acuerdo con los procedimientos estándar y se utilizaron los siguientes cebadores para ampliar la transcripción codificante de *Glut1*: *Glut1QPCR F1*: 5' CTT GCT TGT AGA GTG ACG ATC 3' (SEQ ID NO:76) y *Glut1QPCR R1*: 5' CAG

15 TGA TCC GAG CAC TGC TC 3' (SEQ ID NO:77). Se cuantificó la banda de 212bp esperada en un Eppendorf Realplex Cycler (Eppendorf, Alemania).

De manera inesperada, la expresión del gen en el hígado mutante tratado superó los niveles en el mismo tejido de los

20 controles de *Glut1^{+/+}*, lo que coincide con los informes anteriores (Foust et ál., 2010) de que el virus AAV9-*Glut1* tiene un tropismo particular para el hígado. En una cohorte pequeña de ratones WT a los que se les administró el virus, esto también produjo hipoglicemia, probablemente como

consecuencia de la regulación por aumento de *Slc2a1* en este tejido y, por lo tanto, la eliminación de la glucosa de la sangre. En consecuencia, se considera la supresión de la expresión de *Slc2a1* utilizando las construcciones que
 5 contienen sitios de unión a ARNmi-122 (tal como se muestra en la figura 1D y comprendidos por SEQ ID NO:42-75). ARNmi-122 se expresa específicamente en el hígado y suprime la expresión de los genes a cuyas transcripciones se une (Xie et ál., 2011). Las consecuencias fisiológicas de este hallazgo
 10 serán objeto de investigaciones posteriores.

Proteína cerebral Glut1 potenciada y glucosa en LCR en ratones mutantes tratados con AAV9-Glut1; el restablecimiento de Glut1 mitiga la hipoglucorraquia en los ratones del modelo de DS de Glut1.

15 Una característica que define la DS de Glut1 es la hipoglucorraquia (baja glucosa del líquido cefalorraquídeo). Los ratones del modelo de DS de Glut1 presentan este fenotipo. Para determinar si el restablecimiento de Glut1 en los ratones del modelo revirtió o mitigó la hipoglucorraquia,
 20 se extrajeron sangre y líquido cefalorraquídeo (LCR) de los animales y se midieron los niveles de glucosa. Se sometieron a ayuno todos los ratones durante la noche antes de tomar las mediciones. Se aisló el LCR de la cisterna magna esencialmente como se describió anteriormente (Wang et ál.,

2006; Fleming et ál., 1983). En resumen, se realizó una incisión desde la parte superior del cráneo hasta el tórax dorsal, y se retiró la musculatura desde la base del cráneo hasta las primeras vértebras para exponer las meninges que cubren la cisterna magna. Se extirpó el tejido que recubre la cisterna magna con cuidado de no perforar las meninges traslúcidas. Una vez que se limpió la sangre/fluido intersticial residuales en el área circundante, se utilizó una micropipeta unida a una aguja de 30G para perforar la membrana aracnoidea que cubre la cisterna magna y se extrajeron 5-15 μ l de LCR. Se finalizó el procedimiento completo en 5 minutos y se midió la glucosa en el LCR con un medidor de glucosa Ascensia Elite XL (Bayer Corp.). Se determinó de forma similar la glucosa en sangre, antes de la extracción del LCR, mediante la extracción de ~10 μ l de sangre de una incisión en la cola. Se evaluaron dos lecturas de cada una de las concentraciones de glucosa en sangre y LCR para cada ratón. Se informará el valor promedio.

Con respecto a los valores de glucosa en el LCR y las etapas de la enfermedad, los siguientes intervalos son típicos: más del 90 % de pacientes de Glut1 tienen valores de glucosa en LCR de < 40 mg/dl (2.2 mM) y el resto de los pacientes se encuentran dentro del intervalo de 41-52 mg/dl. Por ende, el intervalo normal para los niveles de glucosa en LCR es $\geq$

aproximadamente 53 mg/dl. Para los ratones del modelo de DS de Glut1, el nivel de glucosa en LCR típico es de aproximadamente 23.3 ± 7.17 mg/dL (se encuentra dentro de un intervalo de $< 25.0 \pm 8.00$ mg/dl); mientras que para los
5 ratones de tipo silvestre, el nivel es de aproximadamente 74.6 ± 14.1 mg/dL (se encuentra dentro de un intervalo de $\geq$ aproximadamente 70.0 ± 15.0 mg/dL).

Además, el ensayo de función de absorción de glucosa por GR se suele utilizar como un sustituto para la
10 haploinsuficiencia de Glut1. En este ensayo, las muestras del paciente que presentan DS de Glut1 se agrupan con una absorción de aproximadamente el 50 %, con un intervalo de 36-73 %. Se calcula que ≥ 75 % de actividad coincide con un intervalo normal. Cabe destacar que < 25 % es grave y 0 % se
15 aproxima a la mortalidad embrionaria.

El restablecimiento del gen *slc2a1* en los ratones mutantes con DS de Glut1 mediante transfección con la construcción pAAV9 CB6 PI mGlut1 (SEQ ID NO:35) produce un aumento de la expresión del Glut1 (figura 5A). Además, los ratones mutantes
20 con DS de Glut1 tratados expresan mayores niveles de la proteína Glut1 en el tejido cerebral (figura 5B). En la figura 5C, las concentraciones de glucosa en LCR en los mutantes tratados fueron significativamente mayores que las de los mutantes sin tratamiento, pero no alcanzaron los

niveles observados en los controles de tipo silvestre. Los ratones mutantes con *slc2a1* restablecido presentaron mayores niveles de glucosa en LCR/sangre (figura 5D). Los tamaños de las muestras son n=8 para los ratones mutantes no tratados y n=9 para los ratones mutantes tratados. Además, la cohorte de tipo silvestre es n=18. Estos datos muestran que el restablecimiento de Glut1 en los ratones mutantes con DS de Glut1 aumenta los niveles de glucosa en LCR y mitiga a la hipoglucorraquia de los animales afectados. En forma colectiva, estos resultados son un indicio claro de los beneficios terapéuticos del restablecimiento de Glut1 en un sujeto con deficiencia de Glut1. Los resultados preliminares de estos experimentos indican que el restablecimiento de Glut1 en estos ratones adultos sintomáticos no rescata el fenotipo de la enfermedad, lo que propone una ventana de oportunidad terapéutica limitada en los ratones y, probablemente, también en los seres humanos.

Restablecimiento de Glut1 en ratones sintomáticos—momento de la administración de Glut1.

El restablecimiento de la expresión de Glut1 en los ratones del modelo al principio del transcurso de la enfermedad (ejemplificado por la inyección de PN3 de las construcciones de AAV9-mGlut1) en ratones con DS de Glut1 tiene un valor terapéutico claro. Para determinar el marco de tiempo del

restablecimiento de Glut1 en los ratones sintomáticos, se han iniciado experimentos que comprenden la inyección de construcciones de pAAV CB6 PI mGlut1 (SEQ ID NO:35) en ratones mutantes a las 8 semanas de edad. Los ratones con DS de Glut1 son claramente sintomáticos en este momento con un desempeño inferior que los compañeros de camada de tipo silvestre de control en el cilindro giratorio. En consecuencia, se inyectó sistémicamente una cohorte de ratones de DS de Glut1 con vehículo o 1×10^{12} copias de genoma de AAV9-mGlut1. Todos los ratones toleraron el procedimiento, lo que indica que la inyección del virus en los roedores adultos es segura. Se están evaluando ensayos moleculares, celulares y conductuales similares a los descritos arriba para determinar los marcos de tiempo que permitirán el tratamiento/alivio de los síntomas de la deficiencia de Glut1, así como cualquier límite de tiempo para invertir el curso del fenotipo de la enfermedad.

Refinamiento de la ventana de oportunidad terapéutica en un modelo de DS de Glut1

Los presentes datos demuestran que la repleción mediada por AAV9 de la proteína Glut1 (murina) en ratones neonatales con DS de Glut1 (PND3) aumenta la expresión de Glut1, mitiga la hipoglucorraquia observada de forma característica en la enfermedad, restablece el tamaño del cerebro y da como

resultado una mejora notoria en el desempeño motriz. Por el contrario, la repleción de *Glut1* a las 8 semanas de edad no logró rescatar el fenotipo de la enfermedad. Estos resultados sugieren que existe una ventana de oportunidad terapéutica limitada en los ratones del modelo de DS de *Glut1*, un hallazgo que probablemente refleje la afección humana. Los datos preliminares también indican niveles de glucosa en LCR significativamente reducidos en los ratones mutantes desde las 2 semanas de edad (mutantes: 23.25 ± 3.77 mg/dL; controles: 53.33 ± 5.20 mg/dL, $P < 0.01$, prueba *t*). Sin embargo, no queda claro si el restablecimiento de *Glut1* en esta coyuntura, antes de un fenotipo visible discernible, proporcionará beneficio terapéutico.

Para determinar el resultado del restablecimiento de *Glut1* en esta etapa temprana de la enfermedad - *similar al tratamiento de pacientes que han sido diagnosticados en la infancia, pero sin embargo han estado sujetos a los efectos causantes de la enfermedad de la deficiencia de Glut1 durante la infancia*, los ratones mutantes se transducirán sistémicamente con el vector pAAV9 CB6 PI m*Glut1* (SEQ ID NO:35). En resumen, se inyectarán $\sim 10^{12}$ copias de genoma del vector terapéutico de vehículo en un volumen de $\sim 50 \mu\text{l}$ en la vena temporal de ratones de 2 semanas de edad. Se evaluará posteriormente a los animales utilizando una batería integral de ensayos

moleculares (análisis de transferencia western, ensayos de Q-PCR, niveles de glucosa en LCR y sangre), de imagenología (escaneos PET) y conductuales (análisis de cilindro giratorio, pruebas de poste vertical) para determinar el resultado del restablecimiento de la proteína funcional en esta etapa “juvenil” en los ratones. Estos experimentos complementarán los resultados obtenidos después del tratamiento en los neonatos (PND3) por un lado y en el modelo adulto (8 semanas) por otro lado, y refinarán la ventana de oportunidad terapéutica para la DS de Glut1.

Evaluación de los efectos combinados del tratamiento temprano con la dieta cetogénica y la repleción tardía de la proteína Glut1 en los ratones del modelo de DS de Glut1

Aunque está claro que el restablecimiento de Glut1 en los ratones adultos (8 semanas) no mitigó el fenotipo de DS de Glut1, es posible que el tratamiento anterior de estos ratones con una dieta alta en grasas pudiera haber producido un resultado más favorable. Los ratones con dichas dietas representan de forma más precisa la cohorte de los pacientes con DS de Glut1 mayores que pueden haber perdido la ventana de tratamiento terapéutico ideal, pero que podrían, no obstante, beneficiarse de un restablecimiento tardío de la proteína Glut1 debido a los efectos protectores tempranos de una dieta cetogénica. Estas dietas proporcionan cuerpos de

cetona al cerebro, una fuente alternativa, aunque imperfecta, de energía que atraviesa la barrera hematoencefálica a través de los transportadores monocarboxílicos. En consecuencia, además de nuestros experimentos en ratones de dos semanas, 5 evaluaremos los efectos del restablecimiento de Glut1 en mutantes adultos (6-8 semanas) que han recibido (desde PND7) la triheptanoína de triglicéridos 7C. La triheptanoína, que se encuentra actualmente en ensayos clínicos para la DS de Glut1, no solo se metaboliza a CoA de acetilo para el ciclo 10 de TCA, sino que también se cree que proporciona sustratos anapleróticos esenciales para el ciclo ya que los nutrientes se descomponen eventualmente para suministrar los requisitos energéticos de la célula. En resumen, este experimento comprenderá el tratamiento de los mutantes con (82mg/g) o sin 15 triheptanoína hasta que se les administre la construcción de AAV9-Glut1 (pAAV9 CB6 PI mGlut1). Las diferentes cohortes de ratones luego se evaluarán tal como se describió arriba como forma de predecir el resultado terapéutico del restablecimiento de la expresión de Glut1 en pacientes 20 mayores con los tratamientos disponibles actualmente (dieta cetogénica).

Optimización de las construcciones de Glut1 para los ensayos clínicos

Aunque hasta ahora no se han observado efectos adversos de la

expresión de *slc2a1* en ratones con DS de Glut1, los estudios preliminares en una pequeña muestra de ratones de tipo silvestre a los que se les administró el vector de la construcción pAAV9 CB6 PI mGlut1 (SEQ ID NO:35) indicaron

5 niveles reducidos de glucosa en LCR y sangre. Este evento inesperado podría deberse al aumento de la expresión de *slc2a1* en el hígado, un órgano diana de AAV9 preferido y, en consecuencia, al transporte mejorado de la glucosa hacia este tejido. El resultado neto es una caída en la glucosa

10 circulante, que se refleja en un estado hipoglucémico. Con antelación a dicho evento, la construcción de hGlut1 (pAAV CB6 PI hGlut1) se modificará para excluir su expresión a niveles altos en el hígado, un órgano para el cual AAV9 tiene un tropismo particularmente alto (Zincarelli et ál., 2008;

15 Pacak et ál., 2006). Para hacerlo, los sitios de unión (BS) para ARNmi - miR-122 (expresado específicamente en hepatocitos) se introducirán en las construcciones. Esta estrategia se ha implementado con éxito anteriormente (véase Xie et ál., 2011) y aprovecha la escisión endonucleolítica

20 mediada por ARNmi de los ARNm diana y limita así la expresión de la transcripción a los tejidos de interés. Las construcciones que se muestran en la figura 1 D y la tabla 1 (pAAV CB6 PI hGlut1-in3xmiR-122 BS, pAAV CB6 PI hGlut1-out3xmiR-122 BS, pAAV CB6 PI mGlut1-in3xmiR-122, pAAV CB6 PI

mGlut1-out3xmiR-122) se evaluarán en un subgrupo de ratones junto con los vectores de expresión de Glut1 originales (no modificados), analizando cada uno para detectar los niveles de expresión de Glut1 y la eficacia terapéutica. Una mayor
5 tendencia de la construcción original a causar hipoglucemia indicará el beneficio del uso de las nuevas construcciones de Glut1-ARNmi-BS en experimentos y ensayos posteriores.

Para optimizar la expresión de las construcciones de ensayo descritas en la presente no solo como un medio para reducir
10 las titulaciones virales durante el proceso de fabricación, sino también para abordar las preocupaciones de seguridad asociadas con las altas concentraciones del virus, se evaluarán los genes *SLC2A1* y *slc2a1* utilizando un proceso de optimización de codones empleando el software disponible de
15 forma gratuita (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>). Además, se introducirán secuencias de Kozak de consenso en las construcciones según sea necesario. Por ende, se puede optimizar por codones cualquiera de las construcciones o elementos descritos en la tabla 1 de este modo. Se evaluará
20 cada una de las construcciones modificadas en paralelo con las construcciones parentales en los ratones. En resumen, las construcciones se administrarán de forma sistémica a través de la vena temporal en crías de ratón PND3. Luego se someterá a eutanasia a los animales dos o tres semanas más tarde y se

determinarán los niveles de proteína de cada una de las construcciones mediante Q-PCR y análisis de transferencia western. Las construcciones que presenten los niveles de expresión más rápidos y altos se considerarán para un uso eventual en estudios de primates no humanos y eventualmente en ensayos clínicos para pacientes humanos.

Estudios en primates no humanos

Para determinar la biodistribución, la expresión y la toxicidad de nuestras construcciones seleccionadas en un modelo mamífero grande, se administrarán vectores virales a una cohorte de monos cynomolgus. En resumen, se les administrará a 6 animales, cada uno en PND1, PND90 y 2 años de edad de forma sistémica el vector AAV9 en una dosis de 5×10^{13} copias de genoma/kg. Para determinar la toxicidad aguda de las construcciones, se extraerá sangre a los animales 1 día, 3 días y 7 días después de la administración del vector. Además, se les extraerá sangre a los animales 2, 3 y 4 semanas después de la inyección del vector. En cada caso, se evaluarán parámetros de química clínica y hematología importantes. Las titulaciones de los anticuerpos neutralizantes para AAV9 se monitorizarán en muestras de suero mediante un ensayo de anticuerpos neutralizante cuantitativo basado en la transducción (Rapti et ál., 2012) y determinan la presencia de linfocitos T específicos de

cápside o transgén en PBMC utilizando ELISPOT, técnicas de tinción de citocinas intracelulares y citometría de flujo (Walker et ál., 2001). Para complementar los estudios inmunológicos anteriores, se someterán a eutanasia tres
5 animales de cada cohorte en la semana 4 para la histopatología, estudios de biodistribución de vectores y análisis de expresión de transgenes en todos los sistemas de órganos principales. Estos experimentos también permitirán el análisis y la comparación de las respuestas inmunitarias
10 celulares de los linfocitos B y T a la cápside o el transgén en suero, linfocitos y PBMC en un momento temprano frente a un momento tardío después de la administración del virus. Con el fin de realizar un estudio de seguridad a largo plazo, se hará un seguimiento a los 3 animales restantes en cada grupo
15 durante un período de 3 meses durante el cual se les extraerá sangre todos los meses para realizar estudios de química clínica y hematología, tal como se describió arriba. En última instancia, se someterá a eutanasia a estos animales 3 meses después de las inyecciones y se analizarán tal como se
20 describe en los estudios de toxicidad aguda. Es posible que la proteína Glut1 humana, a pesar de compartir ~99 % de homología con Glut1 de cynomolgus, produce una respuesta inmunitaria agresiva. Para evitar esto, se introducirán dos sitios de unión a ARNmi para miR-142-3p y miR-155 en las

construcciones de ensayo. Los resultados preliminares de un estudio independiente indican que estos ARNmi se expresan en células presentadoras de antígenos y, en consecuencia, suprimen la expresión de las proteínas cuyas transcripciones
 5 contienen los sitios de unión para los ARNmi. De forma colectiva, estos estudios facilitarán el uso eventual de las construcciones de Glut1 de prueba descritas en la presente en ensayos clínicos humanos.

10

REFERENCIAS

1. De Vivo DC, Trifiletti RR, Jacobson RI, Ronen GM, Behmand RA, Harik SI. (1991). Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay. *N. Engl. J. Med.*, 325, 703-709.
 15
2. Donnelly, M.L. et ál. (2001). The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J. Gen. Virol.* 82, 1027-1041.
- 20 3. Foust, K.D., Nurre, E., Montgomery, C.L., Hernandez, A., Chan, C.M. y Kaspar, B.K. (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat. Biotech.* 27, 59-65.
4. Pearson TS, Akman C, Hinton VJ, Engelstad K, De Vivo DC.

- (2013) Phenotypic spectrum of glucose transporter type 1 deficiency syndrome (Glut1 DS). *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 13, 342.
5. De Giorgis V and Veggiotti, P. (2013) Glut1 deficiency syndrome 2013: Current state of the art. *Seizure* 22, 803-811.
 6. Wang D, Pascual JM, Yang H, Engelstad K, Mao X, Cheng J, Yoo J, Noebels JL, De Vivo DC (2006) A mouse model for Glut-1 haploinsufficiency. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1169-1179.
 7. Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229, 941-945.
 8. Seidner G, Alvarez MG, Yeh JI, O'Driscoll KR, Klepper J, Stump TS, Wang D, Spinner NB, Birnbaum MJ, De Vivo DC (1998) GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nat Genet.* 18, 188-191.
 9. Yang H, Wang D, Engelstad K, Bagay L, Wei Y, Rotstein M, Aggarwal V, Levy B, Ma L, Chung WK, De Vivo DC (2011) Glut1 deficiency syndrome and erythrocyte glucose uptake assay. *Ann Neurol* 70, 996-1005.
 10. Grieger JC, Samulski RJ (2005) Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 99, 119-

145.

11. Grieger JC, Samulski RJ (2012) Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods Enzymol.* 507, 229-254.
- 5 12. Kariya S, Re DB, Jacquier A, Nelson K, Przedborski S, Monani UR (2012) Mutant superoxide dismutase 1 (SOD1), a cause of amyotrophic lateral sclerosis, disrupts the recruitment of SMN, the spinal muscular atrophy protein to nuclear Cajal bodies. *Hum Mol Genet.* 21,3421-3434.
- 10 13. Foust KD, Wang X, McGovern VL, Braun L, Bevan AK, Haidet AM, Le TT, Morales PR, Rich MM, Burghes AH, Kaspar BK (2010) Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat. Biotech.* 28, 271-274.
- 15 14. Fleming JO, Ting JY, Stohlman SA, Weiner LP (1983) Improvements in obtaining and characterizing mouse cerebrospinal fluid. Application to mouse hepatitis virus-induced encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 4,129-140.
- 20 15. Gao, G.P. y Sena-Esteves, M. (2012). Introducing Genes into Mammalian Cells: Viral Vectors. In *Molecular Cloning, Vol 2: A Laboratory Manual* (M.R. Green and J. Sambrook eds.) pp. 1209-1313. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
16. Rapti K, Louis-Jeune V, Kohlbrenner E, Ishikawa K,

Ladage D, Zolotukhin S, Hajjar RJ, Weber (2012) Neutralizing antibodies against AAV serotypes 1, 2, 6, and 9 in sera of commonly used animal models. *Mol. Ther.* 20, 73-83.

17. Goulder PJ, Addo MM, Altfeld MA, Rosenberg ES, Tang Y, Govender U, Mngqundaniso N, Annamalai K, Vogel TU, Hammond M, Bunce M, Coovadia HM, Walker BD (2001) Rapid definition of five novel HLA-A*3002-restricted human immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte epitopes by elispot and intracellular cytokine staining assays. *J. Virol.* 75, 1339-1347.

Como resultará evidente para los entendidos en la técnica, se pueden realizar muchas modificaciones y variaciones a esta invención sin apartarse de su espíritu y alcance. La invención se define por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con la totalidad del alcance de los equivalentes a los cuales dichas reivindicaciones autorizan. Las modalidades específicas descritas en la presente, incluidos los siguientes ejemplos, se ofrecen solamente a modo de ejemplo, y no limitan en virtud de sus detalles el alcance de la invención.

Todas las referencias citadas en la presente se incorporan mediante referencia en la misma medida que si cada publicación, entrada de base de datos (p. ej., secuencias de Genbank o entradas de GeneID), solicitud de patente o patente

individual se indicara específica e individualmente como incorporada mediante referencia. Con la presente declaración de incorporación mediante referencia los solicitantes pretenden, conforme al título 37 del C.F.R. §1.57(b)(1),
5 hacer referencia a cada publicación, entrada de base de datos (p. ej., secuencias de Genbank o entradas de GeneID), solicitud de patente o patente individuales, cada una de las cuales se identifica claramente de conformidad con el título 37 del C.F.R. §1.57(b)(2), incluso si dicha cita no se
10 encuentra inmediatamente adyacente a una declaración de incorporación mediante referencia dedicada. La inclusión de declaraciones de incorporación mediante referencia dedicadas, si las hubiera, dentro de la memoria descriptiva no debilita, en ningún sentido, la presente declaración general de
15 incorporación mediante referencia. La mención de las referencias en la presente no es una admisión de que las referencias sean técnica previa pertinente ni constituye admisión alguna de los contenidos o la fecha de estas publicaciones o documentos.

20 El alcance de la presente invención no se limita a las modalidades específicas descritas en la presente. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las se describen en la presente serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción que antecede y las

figuras adjuntas. Se pretende que tales modificaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

La memoria descriptiva escrita que precede se considera
5 suficiente para permitir que el experto en la técnica ponga
en práctica la invención. Para los expertos en la técnica
serán evidentes diversas modificaciones de la invención
además de las que se ilustran y describen en la presente a
partir de la descripción que antecede y estas se encuentran
10 dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

15

20

REIVINDICACIONES

1. Un vector adeno-asociado recombinante (rAAV) que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende un transgén que codifica Glut1.
- 5 2. El AAV recombinante de la reivindicación 1, que además comprende un promotor de Beta-actina de pollo y en donde el rAAV es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (BBB).
3. El AAV recombinante de la reivindicación 2, en donde el transgén es capaz de expresarse en células endoteliales que
10 recubren la microvasculatura del cerebro.
4. El AAV recombinante de la reivindicación 2, en donde el promotor de Beta-actina de pollo se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:31, 38, 45, 54, 62 y 70.
5. El AAV recombinante de la reivindicación 1, en donde el
15 AAV es AAV8 o AAV9.
6. El AAV recombinante de la reivindicación 1, en donde el Glut1 comprende SEQ ID NO:78 o 79.
7. El AAV recombinante de la reivindicación 1, que además comprende elementos de ARNmi seleccionados del grupo que
20 consiste en SEQ ID NO:48, 56, 59, 64 y 73.
8. El AAV recombinante de la reivindicación 1, en donde el vector recombinante además comprende repeticiones terminales invertidas (ITR) que flanquean los elementos de ARNmi.
9. Una composición que comprende el AAV recombinante de la

reivindicación 1.

10. La composición de la reivindicación 9, que además comprende un portador farmacéutico.

11. Un kit que comprende una cubierta de un recipiente que
5 comprende la composición de la reivindicación 9.

12. El kit de la reivindicación 11, en donde el recipiente es una jeringa.

13. Un método para restablecer el transporte de Glut1 en la barrera hematoencefálica (BBB) de un sujeto, que comprende
10 administrarle al sujeto una cantidad eficaz del vector AAV recombinante de la reivindicación 1.

14. Un método para tratar el síndrome de deficiencia de Glut1 en un sujeto que lo necesita, en donde el método comprende administrarle al sujeto una cantidad eficaz del
15 vector AAV recombinante de la reivindicación 1.

15. Un método para aliviar en un sujeto al menos uno de los síntomas asociados con el síndrome de deficiencia de Glut1 seleccionado del grupo que consiste en hipoglucoorraquia, microcefalia adquirida, disfunción motora atáxica y
20 distónica, en donde el método comprende administrarle al sujeto una cantidad eficaz del vector AAV recombinante de la reivindicación 1.

16. El método de la reivindicación 13, 14 o 15, en donde el AAV recombinante además comprende un promotor de Beta-actina

de pollo y en donde el rAAV es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (BBB).

17. El método de la reivindicación 16, en donde el transgén es capaz de expresarse en células endoteliales que recubren la microvasculatura del cerebro.

18. El método de la reivindicación 16, en donde el promotor de Beta-actina de pollo se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:31, 38, 45, 54, 62 y 70.

19. El método de la reivindicación 13, 14 o 15, en donde el AAV es AAV8 o AAV9.

20. El método de la reivindicación 13, 14 o 15, en donde el Glut1 comprende SEQ ID NO:78 o 79.

21. El método de la reivindicación 13, 14 o 15, en donde el AAV recombinante además comprende elementos de ARNmi seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO:48, 56, 59, 64 y 73.

22. El método de la reivindicación 13, 14 o 15, en donde el vector recombinante además comprende repeticiones terminales invertidas (ITR) que flanquean los elementos de ARNmi.

23. El método de la reivindicación 13, 14 o 15, en donde el AAV recombinante está comprendido dentro de una composición que además comprende un portador farmacéutico.

RESUMEN

La presente invención se refiere a construcciones de vectores virales adeno-asociados (rAAV) de Glut1 recombinantes y métodos relacionados para restablecer la expresión de Glut1 en mamíferos con deficiencia de Glut1. En determinadas modalidades, el rAAV además comprende un promotor de β -actina de pollo, en donde el rAAV es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (BBB). En determinadas modalidades, la presente invención se refiere a una composición que comprende cualquiera de los AAV recombinantes descritos en la presente. En determinadas modalidades, la presente invención se refiere a un kit que comprende una cubierta de un recipiente que comprende la composición descrita en la presente. En determinadas modalidades, la presente invención se refiere a métodos para restablecer el transporte de Glut1 en la BBB de un sujeto, que comprende administrarle al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los vectores AAV recombinantes descritos en la presente. En determinadas modalidades, la presente invención se refiere a un método para tratar el síndrome de deficiencia de Glut1 en un sujeto que lo necesita.