

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR ENFERMEDADES

CEREBRALES

SOLICITUD RELACIONADA

La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional estadounidense N.º 61/859.157, presentada el 26 de julio de 2013, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

ANTECEDENTES

En la actualidad, la transferencia génica se reconoce ampliamente como una herramienta poderosa para el análisis de eventos biológicos y procesos de enfermedades a nivel celular y molecular. Más recientemente, la aplicación de terapia génica para el tratamiento de enfermedades humanas, ya sea hereditarias (p. ej., la deficiencia de ADA) o adquiridas (p. ej., el cáncer o enfermedades infecciosas), ha recibido una atención considerable. Con la aparición de técnicas de transferencia génica mejoradas y la identificación de una biblioteca en constante crecimiento de enfermedades relacionadas con genes defectuosos, la terapia génica ha evolucionado rápidamente de una teoría de tratamiento a una realidad práctica.

Tradicionalmente, la terapia génica se ha definido como un procedimiento en el cual se introduce un gen exógeno en las células de un paciente para corregir un error genético innato. Aunque más de 4500 enfermedades humanas se clasifican actualmente como genéticas, se han identificado mutaciones específicas en el genoma humano para una cantidad relativamente baja de estas enfermedades. Hasta hace poco tiempo, estas enfermedades genéticas raras representaban los objetivos exclusivos de los esfuerzos de la terapia génica. En consecuencia, la mayoría de los protocolos de terapia génica aprobados por los NIH hasta la fecha se han dirigido a la introducción de una copia funcional de un gen defectuoso en las células somáticas de un individuo que tiene un error genético innato conocido. Recién ahora los investigadores y los médicos comenzaron a apreciar que la mayoría de los cánceres humanos, algunas formas de enfermedades cardiovasculares y muchas enfermedades degenerativas también tienen componentes genéticos importantes y a los efectos del diseño de terapias génicas novedosas, se deberían considerar "trastornos genéticos". Por ende, más recientemente, la terapia génica se ha definido ampliamente como la corrección de un fenotipo de enfermedad mediante la introducción de información genética nueva en el organismo afectado.

En la terapia génica *in vivo*, se introduce un gen transferido en las células del organismo receptor *in situ*, es decir, dentro del receptor. La terapia génica *in vivo*

se ha analizado en diversos modelos de animales. Varias publicaciones recientes han informado la viabilidad de la transferencia génica directa *in situ* en órganos y tejidos como músculos, células madre hematopoyéticas, la pared arterial, el sistema nervioso y los pulmones. También se ha informado que la inyección directa de ADN en el músculo esquelético, el músculo cardíaco y la inyección de complejos de ADN-lípido en la vasculatura produce un nivel de expresión detectable de los productos génicos insertados *in vivo*. El tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central, p. ej., enfermedades genéticas heredadas del cerebro, sigue siendo un problema intratable. Algunos ejemplos de estas son las enfermedades de almacenamiento lisosómico y el mal de Alzheimer. Colectivamente, la incidencia de las enfermedades de almacenamiento lisosómico (LSD) es de 1 en 10.000 nacimientos en el mundo y en el 65 % de los casos, hay una participación importante del sistema nervioso central (SNC). Las proteínas deficientes en estos trastornos, cuando se administran por vía intravenosa, no atraviesan la barrera hematoencefálica o, cuando se administran directamente al cerebro, no se distribuyen bien. Por ende, es necesario desarrollar terapias para los déficits del SNC.

COMPENDIO

La presente invención proporciona un método para administrar un agente terapéutico (p. ej., una proteína o un ácido nucleico) al sistema nervioso central de un mamífero que comprende administrarle a la cisterna magna del mamífero una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside del AAV y un vector que comprende un ácido nucleico codificante de un agente terapéutico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV de una manera eficaz para infectar las células que están en contacto con el líquido cefalorraquídeo (LCR) en el mamífero, de modo que las células expresen el agente terapéutico en el mamífero.

La presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad en un mamífero que comprende administrarle a la cisterna magna del mamífero una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside del AAV y un vector que comprende un ácido nucleico codificante de un agente terapéutico (p. ej., un ácido nucleico terapéutico o un ácido nucleico codificante de una proteína) insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV de una manera eficaz para infectar las células que están en contacto con el líquido cefalorraquídeo (LCR) en el mamífero, en donde la célula expresa el agente terapéutico para tratar la enfermedad.

En determinadas modalidades, la partícula de AAV es una partícula de rAAV2. Según se utiliza en la presente, el término AAV2/1 se utiliza para referirse a una

ITR de AAV2 y una cápside de AAV1, el término AAV2/2 es una ITR de AAV2 y una cápside de AAV2, el término AAV2/4 es una ITR de AAV2 y una cápside de AAV4, etc. En determinadas modalidades, la partícula de AAV es una partícula de rAAV8. En determinadas modalidades, la partícula de AAV es una partícula de rAAV9. En determinadas modalidades, la partícula de AAV es una partícula de rAAVrh10. En determinadas modalidades, la cápside de rAAV tiene una homología de al menos el 80 % con la proteína de la cápside de AAV2 VP1, VP2 y/o VP3. En determinadas modalidades, la cápside de rAAV2 tiene una homología del 100 % con la cápside de AAV2 VP1, VP2 y/o VP3. En determinadas modalidades, la cápside de rAAV tiene una homología de al menos el 80 % con la proteína de cápside de AAV4 VP1, VP2 y/o VP3. En determinadas modalidades, la cápside de rAAV4 tiene una homología del 100 % con la cápside de AAV4 VP1, VP2 y/o VP3. En determinadas modalidades, la cápside de rAAV tiene una homología de al menos el 80 % con la proteína de cápside de AAV9 VP1, VP2 y/o VP3. En determinadas modalidades, la cápside de rAAV9 tiene una homología del 100 % con la cápside de AAV9 VP1, VP2 y/o VP3.

En determinadas modalidades, la partícula de rAAV es una partícula de rAAV2 que infecta la célula endotelial de un no roedor a una velocidad de más del 20 % que la velocidad de infectividad de AAV4, por ejemplo, a una velocidad de más del 50 % o del 100 %, el 1000 % o el 2000 % que la velocidad de infectividad de AAV4.

En determinadas modalidades, la célula expresa el agente terapéutico y secreta el agente terapéutico al LCR. En determinadas modalidades, la célula es una célula endotelial, pial, endotelial o de meninges. En determinadas modalidades, el método además comprende administrarle adicionalmente el rAAV al ventrículo cerebral, el espacio subaracnoide y/o el espacio intratecal del primate no humano.

La presente invención proporciona un método para administrar un ácido nucleico a una célula de cerebro de un mamífero que comprende administrarle a la célula de cerebro una partícula de AAV que contiene un vector que comprende el ácido nucleico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, mediante lo cual se administra el ácido nucleico a la célula de cerebro. En determinadas modalidades, rAAV es una partícula de rAAV2 que infecta la célula de cerebro a una velocidad de más del 20 % que la velocidad de infectividad de AAV4, por ejemplo, a una velocidad de más del 50 % o del 100 %, el 1000 % o el 2000 % que la velocidad de infectividad de AAV4.

En determinadas modalidades, la enfermedad es una enfermedad de almacenamiento lisosómico (LSD). En determinadas modalidades, la LSD es ceroidolipofuscinosis infantil o infantil tardía, enfermedad neuronopática de Gaucher, de Batten juvenil, Fabry, MLD, Sanfilippo A, Hunter, Krabbe, Morquio,

Pompe, Niemann-Pick C, Tay-Sachs, Hurler (MPS-I H), Sanfilippo B, Maroteaux-Lamy, Niemann-Pick A, cistinosis, Hurler-Scheie (MPS-I H/S), síndrome de Sly (MPS VII), Scheie (MPS-I S), de Batten infantil, gangliosidosis GM1, mucopolipidosis tipo II/III o de Sandhoff. En determinadas modalidades, la enfermedad es LINCL. En determinadas modalidades, la enfermedad es una enfermedad neurodegenerativa, como el mal de Alzheimer, enfermedad de Huntington, ALS, hemiplejia espástica hereditaria, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, enfermedad de Kennedy, una enfermedad de repetición de poliglutamina o enfermedad de Parkinson.

En determinadas modalidades, el mamífero es un mamífero no roedor, como un primate, un caballo, una oveja, una cabra, un cerdo o un perro. En determinadas modalidades, el primate es un ser humano.

En determinadas modalidades, el agente terapéutico es un ácido nucleico terapéutico. En determinadas modalidades, el agente terapéutico es una proteína.

En determinadas modalidades, el ácido nucleico codifica una hidrolasa lisosómica. En determinadas modalidades, el ácido nucleico codifica TPP1.

En determinadas modalidades, la proteína terapéutica es una proteína de isoforma ApoE protectora. Según se emplea en la presente, la expresión "isoforma de ApoE protectora" se utiliza para distinguir las isoformas de ApoE que disminuyen el riesgo de mal de Alzheimer en al menos el 5 %, por ejemplo el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 100 % o más.

En determinadas modalidades, la isoforma de ApoE protectora tiene al menos aproximadamente el 80 % de homología con ApoE ϵ 2. En determinadas modalidades, la isoforma de ApoE protectora tiene el 100 % de homología con ApoE ϵ 2.

En determinadas modalidades, la partícula rAAV se inyecta en 1-3 ubicaciones en el cerebro, por ejemplo, en una, dos o tres ubicaciones en el cerebro.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1A es un alineamiento de proteínas de AAV2 (SEQ ID NO:1) y AAV4 (SEQ ID NO:2) y la figura 1B es un alineamiento de nucleótidos de AAV2 (SEQ ID NO:3) y AAV4 (SEQ ID NO:4) basado en la secuencia de AAV2 (NC_001401) y AAV4 (NC_001829).

La figura 2 muestra una ilustración de "corrección cruzada" entre células. Sands y Davidson, Mol Ther 13(5):839-849, 2006.

Figura 3. Parte superior: tinción inmunohistoquímica para TPP1 humana después de que AAV2 media el suministro a un modelo de perros de LINCL con deficiencia de TPP1 canina. Izquierda, perro tratado. Derecha, animal deficiente sin tratar. Compare la tinción positiva fuerte a la izquierda con la tinción de fondo en el panel

derecho. Parte inferior. Análisis de transferencia Western para TPP1 que muestra la presencia de TPP1 humana en el perro (LINCL) deficiente tratado. Los perros normales y deficientes no muestran la presencia de la banda porque no expresan TPP1 humana.

Figura 4A. Microfotografías que muestran la autofluorescencia representante que ilustra la acumulación patológica de lipofuscina en la ceroidlipofuscinosis neuronal. Panel izquierdo, autofluorescencia en un perro con LINCL tratado con AAV2.TPP1. Panel derecho, autofluorescencia en un perro con LINCL no tratado de control. Observe la reducción en la autofluorescencia con la terapia.

Figura 4B. Escaneos de MRI de un perro con LINCL no tratado (izquierdo superior), un perro normal no tratado (derecho superior) y dos perros tratados con AAV.TPP1 (paneles inferiores). Los volúmenes de vector suministrados se indican en la parte inferior izquierda de los paneles inferiores. La titulación viral fue de aproximadamente 1×10^{13} genomas/mL.

Figura 4C. Reconstrucciones volumétricas de los ventrículos de los perros que se muestran en 4B (paneles izquierdos). La gráfica en el panel derecho indica los volúmenes de las imágenes de los paneles izquierdos. Observe la gran reducción del volumen ventricular incluso con estas dosis bajas de vector (establecido en la leyenda de la figura 4B).

Figura 4D. La tinción inmunohistoquímica en regiones del cerebro variadas muestra una distribución amplia de la proteína TPP1 después de la transferencia génica de AAV.TPP1 al sistema ventricular del perro con LINCL. Los paneles superiores son las secciones coronales del atlas del cerebro de los perros; los recuadros derechos inferiores presentan la vista sagital de la imagen coronal. Las secciones de tinción inmunohistoquímica debajo de los paneles del atlas muestran el grado de tinción en las secciones de esas regiones. En conjunto, los datos muestran una distribución amplia de la enzima.

Figura 5. Actividad enzimática de huTPP1 en CSF después de que el suministro de AAV.TPP1 disminuyó poco después de la transferencia génica viral. Panel izquierdo: actividad de TPP1 en CSF en animales tratados Co y S superan los niveles de actividad normales muy poco después de la transferencia génica de AAV.TPP1 y disminuyen rápidamente a niveles indetectables. N, Po y Pi de los animales son perros normales o heterocigotos y se muestran como referencia solamente del rango de los niveles de actividad de TPP1 en perros clínicamente normales.

La figura 6 muestra los resultados del pretratamiento con micofenolato sobre el suministro de actividad sostenida.

Figura 7. La introducción de micofenolato en el momento de la disminución de la actividad enzimática o antes de la transferencia génica mejora drásticamente la

durabilidad de la expresión de TPP1 en un perro después del suministro de AAV.TPP1 al epéndimo. Gráficas izquierda y derecha superiores: Actividad enzimática en función del tiempo. También se indica el momento en el cual se administró el micofenolato. Observe los niveles altos y sostenidos después de la recuperación de la pérdida de expresión en los animales SR y B y los niveles sostenidos extremadamente altos en el animal F. Por ende, el pretratamiento con micofenolato en los animales sin tratamiento previo de proteínas recombinantes ayuda a proporcionar una expresión génica sostenida en las células de cerebro transducidas. Gráfica inferior: la expansión de la gráfica derecha superior para demostrar que hay enzima por encima de los niveles de fondo y los niveles son casi normales o mayores (0,1-0,4 pmol/mg).

Figura 8. La expresión enzimática sostenida en CSF eleva los niveles intersticiales de la enzima. La actividad enzimática en diversas regiones del cerebro es mayor a la normal.

Figuras 9A y 9B. La tinción inmunohistoquímica en regiones del cerebro variadas muestra una distribución amplia de la proteína TPP1 después de la transferencia génica de AAV.TPP1 al sistema ventricular del perro con LINCL. Paneles representativos del atlas del cerebro de los perros muestran la región del cerebro que se está evaluando, lo que también es ilustrado por la línea. En conjunto, los datos muestran una distribución amplia de la enzima.

Figura 10. La terapia génica con AAV.TPP1 retrasa la aparición de fenotipos de enfermedades (aparición de la primera línea roja en la izquierda contra la primera línea azul en la izquierda) y el avance de la enfermedad (la separación entre las líneas rojas contra la separación entre las líneas azules). La esperanza de vida de los animales casi se duplicó en algunos perros, otros continúan en evaluación.

Figura 11. Los animales con secreción de TPP1 sostenida del epéndimo presentan pruebas de actividad enzimática en los órganos periféricos y en la duramadre del cerebro. Para dos animales, BG y SR, hubo actividad enzimática notoria en la duramadre del cerebro y también en el hígado.

Figura 12. El enfoque utilizado para proporcionar un beneficio clínico al perro con LINCL se puede traducir a los primates. Macacos Rhesus recibieron una inyección intraventricular de AAV2.TPP1 (1,5 mL de genomas de vector de 1×10^{13} /mL) y se midió la actividad de TPP1 en el troncoencéfalo (médula; gráfica izquierda) y CSF (gráfica derecha) 3 meses después de la transferencia génica. Estos son monos normales con niveles normales de actividad de TPP1 (intervalo anotado – control). En todos los animales excepto en uno, la actividad enzimática supera a la de los monos normales. Prueba de actividad de TPP1 en cerebro de mono 3 meses después de la transferencia génica utilizando tinción inmunohistoquímica contra TPP1 humana recombinante expresada a partir del vector de AAV.

La figura 13 muestra el área vestibular (tronco cerebral) en los primates no humanos.

La figura 14 proporciona la secuencia de aminoácidos de TPP1 humana.

La figura 15 proporciona la secuencia de ácidos nucleicos de TPP1 humana.

La figura 16 proporciona la secuencia de aminoácidos de TPP1 de *Macaca mulatta*.

La figura 17 proporciona la secuencia de aminoácidos de TPP1 de *Macaca fascicularis*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El virus adenoasociado (AAV) es un virus no patogénico pequeño de la familia parvoviridae. AAV es diferente de los otros miembros de esta familia por su dependencia de un virus auxiliar para la replicación. Ante la falta de un virus auxiliar, AAV se puede integrar de forma específica del locus en el brazo q del cromosoma 19. El genoma de aproximadamente 5 kb de AAV consiste en un segmento de ADN de cadena simple de polaridad positiva o negativa. Los extremos del genoma son repeticiones terminales invertidas cortas que se pueden plegar en estructuras de horquilla y actúan como el origen de la replicación del ADN viral. Físicamente, el virión del parvovirus es sin envoltura y su cápside icosaédrica es de aproximadamente 20 nm de diámetro.

A la fecha, se han identificado numerosos AAV serológicamente diferentes y se ha aislado más de una docena de seres humanos o primates. El genoma de AAV2 es de 4680 nucleótidos de longitud y contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF). El ORF izquierdo codifica las proteínas Rep no estructurales, Rep 40, Rep 52, Rep 68 y Rep 78, que participan en la regulación de la replicación y la transcripción además de la producción de genomas de progenie de cadena simple. Además, dos de las proteínas Rep se han asociado con la integración preferencial de genomas de AAV en una región del brazo q del cromosoma humano 19. También se ha demostrado que Rep68/78 poseen actividad de unión a NTP así como actividades de helicasa de ADN y ARN. Las proteínas Rep poseen una señal de localización nuclear así como varios sitios de fosforilación potenciales. La mutación de uno de estos sitios de cinasa produjo una pérdida de la actividad de replicación.

Los extremos del genoma son repeticiones terminales invertidas cortas (ITR) que tienen el potencial de plegarse en estructuras de horquilla con forma de T que actúan como el origen de la replicación del ADN viral. Dentro de la región de ITR, se han descrito dos elementos que son fundamentales para la función de las ITR, un motivo de repetición GAGC y el sitio de resolución terminal (trs). Se ha demostrado que el motivo de repetición se une a Rep cuando el ITR se encuentra

o bien en una conformación lineal o de horquilla. Esta unión actúa para posicionar Rep68/78 para la escisión en el trs que ocurre de forma específica del sitio y de la cadena. Además de su función en la replicación, estos dos elementos parecen ser fundamentales para la integración viral. Contenido dentro del locus de integración del cromosoma 19 hay un sitio de unión Rep con un trs adyacente. Se ha demostrado que estos elementos son funcionales y necesarios para la integración específica del locus.

El virión de AAV es una partícula icosaédrica sin envoltura, de aproximadamente 25 nm de diámetro, que consiste en tres proteínas relacionadas denominadas VP1, VP2 y VP3. El ORF derecho codifica las proteínas de la cápside de VP1, VP2 y VP3. Estas proteínas se encuentran en una proporción de 1:1:10 respectivamente y se derivan todas del ORF derecho. Las proteínas de la cápside difieren entre sí por el uso de empalme alternativo y un codón de inicio inusual. Los análisis de eliminación han mostrado que la eliminación o alteración de VP1 que se traduce de un mensaje de empalme alternativo produce un rendimiento reducido de partículas infecciosas. Las mutaciones dentro de la región codificante de VP3 provocan la no producción de ningún ADN de progenie de cadena simple o partícula infecciosa. Una partícula de AAV es una partícula viral que comprende una proteína de la cápside de AAV. Un polipéptido de la cápside de AAV puede codificar el polipéptido de VP1, VP2 y VP3 completo. La partícula puede ser una partícula que comprenda AAV2 y otras proteínas de la cápside de AAV (es decir, una proteína quimérica, como AAV4 y AAV2). Las variaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside de AAV2 están consideradas en la presente, siempre que la partícula viral resultante que comprende la cápside de AAV2 siga siendo antigénica o inmunológicamente diferente de AAV4, según se podrá determinar de forma rutinaria a través de métodos convencionales. Específicamente, por ejemplo, se pueden utilizar análisis ELISA y de transferencia Western para determinar si una partícula viral es antigénica o inmunológicamente diferente de AAV4. Además, la partícula viral AAV2 mantiene preferentemente un tropismo tisular diferente de AAV4.

Una partícula de AAV2 es una partícula viral que comprende una proteína de la cápside de AAV2. Un polipéptido de la cápside de AAV2 codificante del polipéptido de VP1, VP2 y VP3 completo puede tener, en general, al menos aproximadamente el 63 % de homología (o identidad) con el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos presentados en SEQ ID NO:1 (proteína de la cápside de AAV2). La proteína de la cápside puede tener aproximadamente el 70 % de homología, aproximadamente el 75 % de homología, el 80 % de homología, el 85 % de homología, el 90 % de homología, el 95 % de homología, el 98 % de homología, el 99 % de homología o incluso el 100 % de homología con la

proteína presentada en SEQ ID NO:1. La proteína de la cápside puede tener aproximadamente el 70 % de identidad, aproximadamente el 75 % de identidad, el 80 % de identidad, el 85 % de identidad, el 90 % de identidad, el 95 % de identidad, el 98 % de identidad, el 99 % de identidad o incluso el 100 % de identidad con la proteína presentada en SEQ ID NO:1. La partícula puede ser una partícula que comprende otra proteína de la cápside de AAV y AAV2, es decir, una proteína quimérica. Las variaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside de AAV2 están consideradas en la presente, siempre que la partícula viral resultante que comprende la cápside de AAV2 siga siendo antigénica o inmunológicamente diferente de AAV4, según se podrá determinar de forma rutinaria a través de métodos convencionales. Específicamente, por ejemplo, se pueden utilizar análisis ELISA y de transferencia Western para determinar si una partícula viral es antigénica o inmunológicamente diferente de AAV4. Además, la partícula viral de AAV2 preferentemente mantiene un tropismo tisular diferente de AAV4, como el que se ejemplifica en los ejemplos de la presente, aunque una partícula quimérica de AAV2 que comprenda al menos una proteína de recubrimiento de AAV2 puede tener un tropismo tisular diferente del de una partícula de AAV2 que consiste solamente en proteínas de recubrimiento de AAV2.

Como se indica en las figuras 1A y 1B, la secuencia de la cápside de AAV2 y la secuencia de la cápside de AAV4 tienen una homología de aproximadamente el 60 %. En determinadas modalidades, la cápside de AAV2 comprende (o consiste en) una secuencia que tiene una homología de al menos el 65 % con la secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO:1.

En determinadas modalidades, la invención además proporciona una partícula de AAV2 que contiene, es decir, que encapsida, un vector que comprende un par de repeticiones terminales invertidas de AAV2. La secuencia de nucleótidos de las ITR de AAV2 se conoce en la técnica. Además, la partícula puede ser una partícula que comprende la proteína de la cápside de AAV4 y AAV2, es decir, una proteína quimérica. Por otra parte, la partícula puede ser una partícula que encapsida un vector que comprende un par de repeticiones terminales invertidas de AAV de otros AAV (p. ej., AAV1-AAV9 y AAVrh10). El vector encapsidado en la partícula además puede comprender un ácido nucleico exógeno insertado entre las repeticiones terminales invertidas.

Las siguientes características de AAV lo han convertido en un vector atractivo para la transferencia génica. Se ha demostrado que los vectores de AAV se integran *in vitro* de forma estable en el genoma celular; poseen una amplia gama de huéspedes; transducen células en división y que no se dividen *in vitro* e *in vivo* y mantienen altos niveles de expresión de los genes transducidos. Las partículas

virales son termoestables, resistentes a disolventes, detergentes, cambios en el pH, temperatura y se pueden concentrar en gradientes de CsCl o de otras formas. La presente invención proporciona métodos para administrar partículas de AAV, vectores de AAV recombinantes y viriones de AAV recombinantes. Por ejemplo, una partícula de AAV2 es una partícula viral que comprende una proteína de la cápside de AAV2 o una partícula de AAV4 es una partícula viral que comprende una proteína de la cápside de AAV4. Un vector de AAV2 recombinante es una construcción de ácido nucleico que comprende al menos un ácido nucleico exclusivo de AAV2. Un virión de AAV2 recombinante es una partícula que contiene un vector de AAV2 recombinante. Para considerarse dentro del término "ITR de AAV2", la secuencia de nucleótidos debe mantener una o ambas de las características descritas en la presente que distinguen la ITR de AAV2 de la ITR de AAV4: (1) tres (en lugar de cuatro como en AAV4) repeticiones de "GAGC" y (2) en el sitio de unión de Rep de ITR de AAV2, el cuarto nucleótido en las dos primeras repeticiones de "GAGC" es una C en lugar de una T.

El promotor que impulsa la expresión de la proteína o la secuencia codificante de otro agente que se puede administrar puede ser cualquier promotor deseado, seleccionado mediante consideraciones conocidas, como el nivel de expresión de un ácido nucleico unido funcionalmente al promotor y el tipo celular en el cual se va a utilizar el vector. Los promotores pueden ser un promotor exógeno o endógeno. Los promotores pueden incluir, por ejemplo, promotores fuertes conocidos como SV40 o el promotor de metalotioneína inducible o un promotor de AAV, como un promotor p5 de AAV. Otros ejemplos de promotores incluyen promotores derivados de genes de actina, genes de inmunoglobulina, citomegalovirus (CMV), adenovirus, virus del papiloma bovino, promotores adenovirales, como el promotor tardío principal del adenovirus, un promotor de choque térmico inducible, virus sincitial respiratorio, virus de sarcoma de Rous (RSV), etc.

El vector de AAV también puede comprender un ácido nucleico exógeno (heterólogo) unido funcionalmente al promotor. "Ácido nucleico heterólogo" significa que cualquier ácido nucleico heterólogo o exógeno se puede insertar en el vector para transferir a una célula, tejido u organismo. El ácido nucleico puede codificar un polipéptido o proteína o un ARN antisentido, por ejemplo. "Unido funcionalmente" significa de modo que el promotor pueda promover la expresión del ácido nucleico heterólogo, según se conoce en la técnica, como la orientación adecuada del promotor con respecto al ácido nucleico heterólogo. Además, el ácido nucleico heterólogo, preferentemente, tiene todas las secuencias adecuadas para la expresión del ácido nucleico, según se conoce en la técnica, para codificar funcionalmente, es decir, permitir la expresión del ácido nucleico. El ácido nucleico

puede incluir, por ejemplo, secuencias de control de expresión, como un potenciador, y sitios de procesamiento de la información necesaria, como sitios de unión al ribosoma, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación de transcripción. El ácido nucleico puede codificar más de un producto génico, limitado solamente por el tamaño del ácido nucleico que se puede empaquetar.

El ácido nucleico heterólogo puede codificar proteínas beneficiosas que remplazan las proteínas faltantes o defectuosas requeridas por el sujeto al cual se transfiere el vector o puede codificar un polipéptido citotóxico que se puede dirigir, p. ej., a las células de cáncer u otras células cuya muerte sería beneficiosa para el sujeto. El ácido nucleico heterólogo también puede codificar ARN antisentido que se puede unir, y por lo tanto inactivar, ARNm hechos por el sujeto que codifican proteínas dañinas. En una modalidad, se pueden producir polinucleótidos antisentido a partir de un casete de expresión heterólogo en una construcción viral de AAV, en donde el casete de expresión contiene una secuencia que promueve la expresión específica del tipo celular.

Algunos ejemplos de ácidos nucleicos heterólogos que se pueden administrar a una célula o sujeto como parte del presente vector de AAV pueden incluir, entre otros, los ácidos nucleicos codificantes de agentes terapéuticos, como hidrolasas lisosómicas; factores de necrosis tumoral (TNF), como TNF-alfa; interferones, como interferón-alfa, interferón-beta e interferón-gamma; interleucinas, como IL-1, IL-1beta e IL-2 a -14; GM-CSF; adenosina desaminasa; factores secretados como factores de crecimiento; canales iónicos; quimioterapéuticos; proteínas lisosómicas; productos genéticos antiapoptóticos; proteínas que promueven la supervivencia neuronal como receptores de glutamato y factores de crecimiento; factores de crecimiento celular, como linfocinas; CD4 soluble; factor VIII; factor IX; receptores de linfocitos T; receptor de LDL; ApoE; ApoC; alfa-1 antitripsina; ornitina transcarbamilasa (OTC); receptor transmembrana de la fibrosis quística (CFTR); insulina; receptores de Fc para los dominios de unión al antígeno de anticuerpos, como inmunoglobulinas; y secuencias antisentido que inhiben la replicación viral, como secuencias antisentido que inhiben la replicación del virus de la hepatitis B o hepatitis no A, no B. Además, el ácido nucleico puede codificar más de un producto génico, limitado solamente por el tamaño del ácido nucleico que se puede empaquetar.

Una partícula de AAV2 es una partícula viral que comprende una proteína de la cápside de AAV2. Las variaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside de AAV2 están consideradas en la presente, siempre que la partícula viral resultante que comprende la cápside de AAV2 siga siendo antigénica o inmunológicamente diferente de AAV4, según se podrá determinar de

forma rutinaria a través de métodos convencionales. Específicamente, por ejemplo, se pueden utilizar análisis ELISA y de transferencia Western para determinar si una partícula viral es antigénica o inmunológicamente diferente de otros serotipos de AAV.

El término "polipéptido", según se utiliza en la presente, se refiere a un polímero de aminoácidos e incluye proteínas de longitud completa y fragmentos de estas. Por ende, "proteína" y "polipéptido" se suelen utilizar indistintamente en la presente. Se pueden seleccionar sustituciones mediante los parámetros conocidos que sean neutras. Como apreciarán los entendidos en la técnica, la invención también incluye polipéptidos que tienen variaciones ligeras en las secuencias de aminoácidos u otras propiedades. Dichas variaciones pueden surgir de forma natural como variaciones alélicas (p. ej., debido a un polimorfismo genético) o se pueden producir mediante intervención humana (p. ej., por mutagénesis de las secuencias de ADN clonadas), como mutantes puntuales, de eliminación, insertar y sustitución inducidos. Se prefieren los cambios menores en la secuencia de aminoácidos, generalmente, como reemplazos de aminoácidos conservadores, eliminaciones o inserciones internas pequeñas y adiciones o eliminaciones en los extremos de las moléculas. Estas modificaciones pueden provocar cambios en la secuencia de aminoácidos, proporcionar mutaciones silenciosas, modificar un sitio de restricción o proporcionar otras mutaciones específicas.

El presente método proporciona un método para administrar un ácido nucleico a una célula que comprende administrarle a la célula una partícula de AAV que contiene un vector que comprende el ácido nucleico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, mediante lo cual se administra el ácido nucleico a la célula. La administración a la célula se puede lograr mediante cualquier medio, incluido el simple contacto de la partícula, opcionalmente contenida en un líquido deseado como un medio de cultivo tisular o una solución salina amortiguada, con las células. Se puede dejar que la partícula permanezca en contacto con las células durante cualquier período deseado y, típicamente, la partícula se administra y se deja que permanezca allí indefinidamente. Para dichos métodos *in vitro*, se puede administrar el virus a la célula mediante métodos de transducción viral estándar, según se conocen en la técnica y se ejemplifican en la presente. Los títulos de los virus que se pueden administrar pueden variar, particularmente dependiendo del tipo de célula, pero serán típicos del que se utiliza para la transducción de AAV en general. Adicionalmente, se pueden utilizar los títulos utilizados para transducir las células particulares en los presentes ejemplos. Las células pueden incluir cualquier célula deseada en los seres humanos así como otros mamíferos grandes (no roedores), como primates, caballos, ovejas, cabras, cerdos y perros.

Más específicamente, la presente invención proporciona un método para administrar un ácido nucleico a una célula con contacto con el LCR en circulación, como una célula ependimal, una célula pial, una célula de meninges, una célula endotelial de cerebro, que comprende administrarle a la célula una partícula de AAV que contiene un vector que comprende el ácido nucleico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, mediante lo cual se administra el ácido nucleico a la célula.

La presente invención proporciona además un método para administrar un ácido nucleico a una célula en un sujeto que comprende administrarle al sujeto una partícula de AAV que comprende el ácido nucleico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, mediante lo cual se administra el ácido nucleico a una célula en el sujeto.

También se proporciona un método para administrar un ácido nucleico a una célula ependimal, pial u otra célula de meninges en un sujeto que comprende administrarle al sujeto una partícula de AAV que comprende el ácido nucleico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, mediante lo cual se administra el ácido nucleico a la célula ependimal, pial u otra célula de meninges en el sujeto.

En determinadas modalidades, la secuencia de aminoácidos que se dirige al endotelio vascular del cerebro se dirige al endotelio vascular del cerebro en un sujeto que tiene una enfermedad, p. ej., una enfermedad de almacenamiento lisosómico.

En determinadas modalidades, la secuencia de aminoácidos que se dirige al endotelio vascular del cerebro se dirige al endotelio vascular del cerebro en un sujeto que no tiene una enfermedad de almacenamiento lisosómico.

En determinadas modalidades, el vector viral comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente terapéutico. En determinadas modalidades, el agente terapéutico es TPP1.

Determinadas modalidades de la presente descripción proporcionan una célula que comprende un vector viral como se describe en la presente.

Determinadas modalidades de la presente descripción proporcionan un método para tratar una enfermedad en un mamífero que comprende administrar un vector viral o la célula según se describe en la presente al mamífero.

En determinadas modalidades, el mamífero es el ser humano.

En determinadas modalidades, la enfermedad es una enfermedad de almacenamiento lisosómico (LSD). En determinadas modalidades, la LSD es ceroidolipofuscinosis infantil o infantil tardía, enfermedad de Gaucher, Fabry, MLD, Sanfilippo A, Hunter, Krabbe, Morquio, Pompe, Niemann-Pick C, Tay-Sachs, Hurler (MPS-I H), Sanfilippo B, Maroteaux-Lamy, Niemann-Pick A, cistinosis,

Hurler-Scheie (MPS-I H/S), síndrome de Sly (MPS VII), Scheie (MPS-I S), de Batten infantil, gangliosidosis GM1, mucopolidosis tipo II/III o de Sandhoff.

En determinadas modalidades, la enfermedad es una enfermedad neurodegenerativa. En determinadas modalidades, la enfermedad neurodegenerativa es mal de Alzheimer, enfermedad de Huntington, ALS, hemiplejia espástica hereditaria, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, enfermedad de Kennedy, una enfermedad de repetición de poliglutamina o enfermedad de Parkinson.

Determinadas modalidades de la presente descripción proporcionan un método para administrar un agente al sistema nervioso central de un sujeto, que comprende administrar al LCR un vector viral descrito en la presente de modo que las células ependimales, piales, endoteliales y/u otras células de meninges transducidas expresen el agente terapéutico y suministren el agente al sistema nervioso central del sujeto. En determinadas modalidades, el vector viral transduce células ependimales, piales, endoteliales y/u otras células de meninges.

Determinadas modalidades de la presente descripción proporcionan un vector viral o célula, según se describe en la presente, para utilizar en tratamientos médicos.

Determinadas modalidades de la presente descripción proporcionan un uso de un vector viral o célula, según se describe en la presente, para preparar un medicamento útil para tratar una enfermedad, p. ej., una enfermedad de almacenamiento lisosómico, en un mamífero.

El vector puede comprender además una enzima lisosómica (p. ej., una hidrolasa lisosómica), una proteína secretada, una proteína nuclear o una proteína citoplásmica. Según se utiliza en la presente, el término "proteína secretada" incluye cualquier proteína secretada, ya sea secretada naturalmente o modificada para contener una secuencia señal de modo que se pueda secretar.

Determinadas modalidades de la presente descripción proporcionan un uso de un vector viral o célula, según se describe en la presente, para preparar un medicamento útil para tratar una enfermedad, p. ej., el mal de Alzheimer, en un mamífero.

El vector también puede comprender una proteína de isoforma ApoE protectora. Según se utiliza en la presente, el término "proteína secretada" incluye cualquier proteína secretada, ya sea secretada naturalmente o modificada para contener una secuencia señal de modo que se pueda secretar. El ácido nucleico está "unido de forma operativa" cuando está en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. En general, "unida de manera operativa" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se puede lograr mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se utilizan los adaptadores

o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional. Adicionalmente, múltiples copias de las enzimas codificantes de ácidos nucleicos pueden estar unidas en el vector de expresión. Dichos ácidos nucleicos múltiples pueden estar separados por enlazadores.

La presente descripción también proporciona una célula de mamífero que contiene un vector descrito en la presente. La célula puede ser humana y puede ser de cerebro. El tipo de célula puede ser una población de células progenitoras o madre.

La presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad, como una enfermedad genética o el cáncer en un mamífero mediante la administración de un polinucleótido, polipéptido, vector de expresión o célula descrita en la presente. La enfermedad genética o el cáncer pueden ser una enfermedad de almacenamiento lisosómico (LSD), como ceroidolipofuscinosis infantil o infantil tardía, enfermedad de Gaucher, Fabry, MLD, Sanfilippo A, Late Infantile Batten, Hunter, Krabbe, Morquio, Pompe, Niemann-Pick C, Tay-Sachs, Hurler (MPS-I H), Sanfilippo B, Maroteaux-Lamy, Niemann-Pick A, cistinosis, Hurler-Scheie (MPS-I H/S), síndrome de Sly (MPS VII), Scheie (MPS-I S), de Batten infantil, gangliosidosis GM1, mucopolidosis tipo II/III o de Sandhoff.

La enfermedad genética puede ser una enfermedad neurodegenerativa, como la enfermedad de Huntington, ALS, hemiplejia espástica hereditaria, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, enfermedad de Kennedy, mal de Alzheimer, una enfermedad de repetición de poliglutamina o exposición focal como la enfermedad de Parkinson.

Determinados aspectos de la descripción se refieren a polinucleótidos, polipéptidos, vectores y células modificadas genéticamente (modificadas *in vivo*) y su uso. En particular, la descripción se refiere a un método para la terapia génica o de proteína que es capaz de un suministro sistémico de una dosis terapéuticamente eficaz del agente terapéutico.

De acuerdo con un aspecto, se proporciona un sistema de expresión de células para expresar un agente terapéutico en un receptor mamífero. El sistema de expresión (también denominado en la presente "célula modificada genéticamente") comprende una célula y un vector de expresión para expresar el agente terapéutico. Los vectores de expresión incluyen, entre otros, virus, plásmidos y otros vehículos para suministrar material genético heterólogo a las células. En consecuencia, el término "vector de expresión", según se utiliza en la presente, se refiere a un vehículo para suministrar material genético heterólogo a una célula. En particular, el vector de expresión es un vector adenoviral, de virus asociado con adeno o de lentivirus o retrovirus recombinante.

El vector de expresión además incluye un promotor para controlar la transcripción

del gen heterólogo. El promotor puede ser un promotor inducible (descrito abajo). El sistema de expresión es adecuado para administración a un receptor mamífero. El sistema de expresión puede comprender múltiples células modificadas genéticamente no inmortalizadas, en donde cada célula contiene al menos un gen recombinante codificante de al menos un agente terapéutico.

El sistema de expresión celular se forma *in vivo*. De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un método para tratar un receptor mamífero *in vivo*. El método incluye introducir un vector de expresión para expresar un producto génico heterólogo en una célula del paciente *in situ*, como mediante administración intravenosa. Para formar el sistema de expresión *in vivo*, se introduce un vector de expresión para expresar el agente terapéutico *in vivo* en el receptor mamífero i.v., en donde el vector migra a través de la vasculatura hacia el cerebro.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un método para tratar un receptor mamífero *in vivo*. El método incluye introducir la proteína diana en el paciente *in vivo*.

El vector de expresión para expresar el gen heterólogo puede incluir un promotor inducible para controlar la transcripción del producto génico heterólogo. En consecuencia, la administración del agente terapéutico *in situ* se controla mediante la exposición de la célula *in situ* a afecciones que inducen la transcripción del gen heterólogo.

El receptor mamífero puede tener una afección que es susceptible a la terapia de reemplazo de genes. Según se utiliza en la presente, "terapia de reemplazo de genes" se refiere a la administración al receptor de material genético exógeno codificante de un agente terapéutico y la posterior expresión del material genético administrado *in situ*. Por ende, la frase "afección susceptible a la terapia de reemplazo de genes" abarca afecciones como enfermedades genéticas (es decir, una enfermedad que se puede atribuir a uno o más defectos genéticos), patologías adquiridas (es decir, una afección patológica que no se puede atribuir a un defecto innato), cánceres y procesos profilácticos (es decir, prevención de una enfermedad o de una afección médica no deseada). En consecuencia, según se emplea en la presente, el término "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente o material, que presenta un efecto beneficioso sobre el receptor mamífero. Por ende, "agente terapéutico" abarca moléculas terapéuticas y profilácticas que tienen componentes de ácido nucleico o proteínas.

De acuerdo con una modalidad, el receptor mamífero tiene una enfermedad genética y el material genético exógeno comprende un gen heterólogo codificante de un agente terapéutico para tratar la enfermedad. En otra modalidad, el receptor mamífero tiene una patología adquirida y el material genético exógeno comprende un gen heterólogo codificante de un agente terapéutico para tratar la patología. De

acuerdo con otra modalidad, el paciente tiene un cáncer y el material genético exógeno comprende un agente heterólogo codificante de un agente antineoplásico. En otra modalidad, el paciente tiene una afección médica no deseada y el material genético exógeno comprende un gen heterólogo codificante de un agente terapéutico para tratar la afección.

Según se utilizan en la presente, los términos "una isoforma ApoE protectora", "enzima lisosómica", una "proteína secretada", una "proteína nuclear" o una "proteína citoplásmica" incluyen variantes o fragmentos biológicamente activos o inactivos de estos polipéptidos. Una "variante" de uno de los polipéptidos es un polipéptido que no es completamente idéntico a una proteína natural. Dicha proteína variante se puede obtener mediante la modificación de la secuencia de aminoácidos mediante inserción, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de la proteína se modifica, por ejemplo, mediante sustitución, para crear un polipéptido que tiene sustancialmente las mismas cualidades o cualidades mejoradas en comparación con el polipéptido natural. La sustitución puede ser una sustitución conservada. Una "sustitución conservada" es una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Una sustitución conservada sería una sustitución con un aminoácido que produzca el menor cambio posible en la carga del aminoácido o el tamaño de la cadena lateral del aminoácido (alternativamente, en el tamaño, carga o tipo de grupo químico dentro de la cadena lateral), de modo que el péptido general mantenga su conformación espacial, pero tenga actividad biológica alterada. Por ejemplo, algunos cambios conservados comunes podrían ser Asp por Glu, Asn o Gln; His por Lys, Arg o Phe; Asn por Gln, Asp o Glu y Ser por Cys, Thr o Gly. La alanina se utiliza comúnmente para sustituir otros aminoácidos. Los 20 aminoácidos esenciales se pueden agrupar del siguiente modo: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina con cadenas laterales no polares; glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina con cadenas laterales polares sin carga; aspartato y glutamato con cadenas laterales ácidas; y lisina, arginina e histidina con cadenas laterales básicas.

Los cambios de aminoácidos se logran mediante el cambio de los codones de la secuencia de ácidos nucleicos correspondiente. Se sabe que dichos polipéptidos se pueden obtener basándose en la sustitución de determinados aminoácidos por otros aminoácidos en la estructura del polipéptido para modificar o mejorar la actividad biológica. Por ejemplo, mediante la sustitución de aminoácidos alternativos, se pueden realizar cambios conformacionales pequeños a un polipéptido que producen aumento de la actividad. Alternativamente, se pueden utilizar sustituciones de aminoácidos en determinados polipéptidos para

proporcionar residuos, que después se pueden unir a otras moléculas para proporcionar conjugados de péptido-molécula que conserven propiedades suficientes de los polipéptidos de partida para ser útiles para otros propósitos.

Se puede utilizar el índice hidropático de aminoácidos para conferir función biológica interactiva a un polipéptido, en donde se sabe que determinados aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tienen índices hidropáticos similares y que aun así conservan una actividad biológica similar. Alternativamente, la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar basándose en la hidrofiliidad, particularmente cuando la función biológica deseada en el polipéptido que se va a generar se pretende utilizar en modalidades inmunológicas. La mayor hidrofiliidad promedio local de una "proteína", regida por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad. En consecuencia, cabe destacar que las sustituciones se pueden realizar basándose en la hidrofiliidad asignada a cada aminoácido.

Al utilizar el índice de hidrofiliidad o hidropático, que asigna valores a cada aminoácido, se prefiere realizar sustituciones de aminoácidos cuando estos valores son ± 2 , con ± 1 como preferentemente preferido, y aquellas con $\pm 0,5$ como las sustituciones más preferidas.

La proteína variante tiene al menos el 50 %, al menos aproximadamente el 80 % o incluso al menos aproximadamente el 90 %, pero menos que el 100 %, de homología o identidad de secuencia de aminoácidos contigua con la secuencia de aminoácidos de una proteína natural correspondiente.

La secuencia de aminoácidos del polipéptido variante corresponde esencialmente a la secuencia de aminoácidos del polipéptido natural. Según se utiliza en la presente, "que corresponde esencialmente a" se refiere a una secuencia de polipéptidos que producirá una respuesta biológica sustancialmente igual a la respuesta generada por la proteína natural. Dicha respuesta puede ser de al menos el 60 % del nivel generado por la proteína natural e incluso puede ser de al menos el 80 % del nivel generado por la proteína natural.

Una variante puede incluir residuos de aminoácidos que no están presentes en la proteína natural correspondiente o eliminaciones con respecto a la proteína natural correspondiente. Una variante también puede ser un "fragmento" truncado en comparación con la proteína natural correspondiente, es decir, solo una parte de una proteína de longitud completa. Los variantes de proteínas también incluyen péptidos que tienen al menos un D-aminoácido.

La proteína variante se puede expresar a partir de una secuencia de ADN aislada codificante de la proteína variante. "Recombinante" se define como un péptido o ácido nucleico producido por los procesos de modificación genética. Cabe destacar que se conoce en la técnica que, debido a la redundancia en el código

genético, los nucleótidos individuales se pueden intercambiar fácilmente en un codón, y aun así producir una secuencia de aminoácidos idéntica.

La presente descripción proporciona métodos para tratar una enfermedad en un mamífero mediante la administración de un vector de expresión a una célula o paciente. Para los métodos de terapia génica, un entendido en la técnica de la biología molecular y la terapia génica sería capaz de determinar, sin experimentación innecesaria, las dosificaciones y vías de administración adecuadas del vector de expresión utilizado en los métodos novedosos de la presente descripción.

De acuerdo con una modalidad, las células se transforman o se modifican genéticamente de otro modo *in vivo*. Las células del receptor mamífero se transforman (es decir, se transducen o transfectan) *in vivo* con un vector que contiene material genético exógeno para expresar un gen heterólogo (p. ej., recombinante) codificante de un agente terapéutico y el agente terapéutico se administra *in situ*.

Según se utiliza en la presente, "material genético exógeno" se refiere a un ácido nucleico o un oligonucleótido, ya sea natural o sintético, que no se encuentra naturalmente en las células; o si se encuentra naturalmente en las células, no se transcribe ni expresa en niveles biológicamente significativos por las células. Por ende, "material genético exógeno" incluye, por ejemplo, un ácido nucleico de origen no natural que se puede transcribir en un ARN antisentido, así como un "gen heterólogo" (es decir, un gen codificante de una proteína que no se expresa o que se expresa a niveles biológicamente insignificantes en una célula de origen natural del mismo tipo).

En determinadas modalidades, el receptor mamífero tiene una afección que es susceptible a la terapia de reemplazo de genes. Según se utiliza en la presente, "terapia de reemplazo de genes" se refiere a la administración al receptor de material genético exógeno codificante de un agente terapéutico y la posterior expresión del material genético administrado *in situ*. Por ende, la frase "afección susceptible a la terapia de reemplazo de genes" abarca afecciones como enfermedades genéticas (es decir, una enfermedad que se puede atribuir a uno o más defectos genéticos), patologías adquiridas (es decir, una afección patológica que no se puede atribuir a un defecto innato), cánceres y procesos profilácticos (es decir, prevención de una enfermedad o de una afección médica no deseada). En consecuencia, según se emplea en la presente, el término "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente o material, que presenta un efecto beneficioso sobre el receptor mamífero. Por ende, "agente terapéutico" abarca moléculas terapéuticas y profilácticas que tienen componentes de ácido nucleico (p. ej., ARN antisentido) y/o proteínas.

Alternativamente, la afección susceptible a la terapia de reemplazo de genes es un proceso profiláctico, es decir, un proceso para prevenir la enfermedad o una afección médica no deseada. Por ende, la presente descripción abarca un sistema de expresión celular para administrar un agente terapéutico que tiene una función profiláctica (es decir, un agente profiláctico) al receptor mamífero.

En resumen, el término "agente terapéutico" incluye, entre otros, agentes asociados con las afecciones enumeradas arriba, así como sus equivalentes funcionales. Por lo tanto, tal como se usa en la presente, "equivalente funcional" hace referencia a una molécula (p. ej., un péptido o proteína) que tiene el mismo efecto beneficioso, o un efecto beneficioso mejor, en el receptor mamífero que el agente terapéutico del que se considera equivalente funcional.

Los agentes terapéuticos descritos arriba y las afecciones susceptibles a la terapia de reemplazo de genes son meramente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente descripción. La selección de un agente terapéutico adecuado para tratar una afección conocida se considera dentro de los conocimientos de un entendido en la técnica sin experimentación innecesaria.

Vectores AAV

En una modalidad, un vector viral de la descripción es un vector AAV. Un vector "AAV" se refiere a un virus adenoasociado y puede ser utilizado para referirse al propio virus de tipo salvaje de origen natural o a derivados de este. El término cubre todos los subtipos, serotipos y pseudotipos y tanto a las formas de origen natural como a las recombinantes, excepto cuando se requiere de otra forma. Según se utiliza en la presente, el término "serotipo" se refiere a un AAV que se identifica mediante y se distingue de otros AAV basándose en la reactividad de la proteína de la cápside con antisueros definidos, p. ej., existen ocho serotipos conocidos de AAV de primate, AAV-1 a AAV-9 y AAVrh10. Por ejemplo, el serotipo AAV2 se utiliza para referirse a un AAV que contiene proteínas de la cápside codificadas a partir del gen cap de AAV2 y un genoma que contiene las secuencias de ITR 5' y 3' del mismo serotipo AAV2. Según se utiliza en la presente, por ejemplo, rAAV1 se puede utilizar para referirse a un AAV que tiene ambas proteínas de la cápside e ITR 5'-3' del mismo serotipo o se puede referir a un AAV que tiene proteínas de la cápside de un serotipo e ITR 5'-3' ITR de un serotipo de AAV diferente, p. ej., cápside del serotipo 2 de AAV e ITR del serotipo 5 de AAV. Para cada ejemplo ilustrado en la presente, la descripción del diseño y la producción del vector describen el serotipo de la cápside y las secuencias de ITR 5'-3'. La abreviatura "rAAV" se refiere al virus adenoasociado recombinante, también denominado vector AAV recombinante (o "vector rAAV").

Un "virus AAV" o "partícula viral AAV" se refiere a una partícula viral compuesta de al menos una proteína de la cápside de AAV (preferentemente, por todas las

proteínas de la cápside de un AAV de tipo salvaje) y un polinucleótido encapsidado. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido diferente del genoma de AAV de tipo salvaje tal como un transgén que va a ser administrado en una célula mamífero), típicamente se denomina "rAAV".

En una modalidad, los vectores de expresión de AAV se construyen utilizando técnicas conocidas para proporcionar al menos como componentes unidos operativamente en la dirección de la transcripción, elementos de control incluido una región de inicio de transcripción, el ADN de interés y una región de terminación de transcripción. Los elementos de control se seleccionan de modo que sean funcionales en una célula de mamífero. La construcción resultante que contiene los componentes unidos operativamente está flanqueada (5' y 3') por secuencias de ITR de AAV funcionales.

"Repeticiones terminales invertidas de virus adenoasociado" o "ITR de AAV" significa las regiones que se reconoce en la técnica que se encuentran en cada extremo del genoma de AAV que funcionan juntas en cis como orígenes de replicación de ADN y como señales de empaquetamiento para el virus. Las ITR de AAV, junto con la región codificante de rep de AAV, proporcionan la escisión eficaz y el rescate, y la integración de una secuencia de nucleótidos interpuesta entre dos ITR de flanco en un genoma de célula de mamífero.

Las secuencias de nucleótidos de las regiones de ITR de AAV son conocidas. Según se utiliza en la presente, una "ITR de AAV" no necesita tener la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje ilustrada, sino que se puede alterar, p. ej., mediante la inserción, eliminación o sustitución de nucleótidos. Además, la ITR de AAV se puede derivar de cualquiera de diversos serotipos de AAV, incluido, entre otros, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV7, etc. Por otra parte, no es necesario que las ITR 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector de AAV sean idénticas o derivadas del mismo serotipo de AAV o aislado, siempre que funcionen según lo previsto, es decir, para permitir la escisión y el rescate de la secuencia de interés de un genoma de célula hospedadora o vector, y para permitir la integración de la secuencia heteróloga en el genoma de la célula receptora cuando los productos génicos de Rep de AAV están presentes en la célula.

En una modalidad, las ITR de AAV se puede derivar de cualquiera de diversos serotipos de AAV, incluido, entre otros, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV7, etc. Por otra parte, no es necesario que las ITR 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector de expresión de AAV sean idénticas o derivadas del mismo serotipo de AAV o aislado, siempre que funcionen según lo previsto, es decir, para permitir la escisión y el rescate de la secuencia de

interés de un genoma de célula hospedadora o vector, y para permitir la integración de la molécula de ADN en el genoma de la célula receptora cuando los productos génicos de Rep de AAV están presentes en la célula.

En una modalidad, las cápsides de AAV se pueden derivar de AAV2. Las moléculas de ADN adecuadas para utilizar en los vectores de AAV serán de menos de aproximadamente 5 kilobases (kb), menos de aproximadamente 4,5 kb, menos de aproximadamente 4 kb, menos de aproximadamente 3,5 kb, menos de aproximadamente 3 kb, menos de aproximadamente 2,5 kb de tamaño y son conocidas en la técnica.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos seleccionada está unida operativamente a los elementos de control que dirigen su transcripción o expresión en el sujeto *in vivo*. Dichos elementos de control pueden comprender secuencias de control normalmente asociadas con el gen seleccionado. Alternativamente, se pueden emplear secuencias de control alternativas. Las secuencias de control heterólogas útiles generalmente incluyen aquellas derivadas de las secuencias codificantes de genes virales o de mamíferos. Algunos ejemplos incluyen, de modo no taxativo, el promotor temprano SV40, el promotor LTR del virus de tumor mamario en ratones; el promotor tardío principal del adenovirus (Ad MLP); un promotor del virus del herpes simple (VHS), un promotor del citomegalovirus (CMV) tal como la región del promotor temprano inmediato de CMV (CMVIE), un promotor del virus del sarcoma de rous (RSV), promotores pol II, promotores pol III, promotores sintéticos, promotores híbridos y similares. Además, las secuencias derivadas de genes no virales, como el gen de metalotioneína murina, también resultarán útiles en la presente. Dichas secuencias promotoras están disponibles a nivel comercial, p. ej., por Stratagene (San Diego, Calif.).

En una modalidad, ambos promotores heterólogos y otros elementos de control, como promotores específicos del SNC y promotores inducibles, potenciadores y similares, resultarán útiles. Algunos ejemplos de promotores heterólogos incluyen el promotor del CMV. Algunos ejemplos de promotores específicos del SNC incluyen aquellos aislados de los genes de la proteína básica de mielina (MBP), proteína gliofibrilar ácida (GFAP) y enolasa específica de neuronas (NSE). Algunos ejemplos de promotores inducibles incluyen elementos que responden al ADN para ecdisona, tetraciclina, hipoxia y aufin.

En una modalidad, el vector de expresión de AAV que aloja la molécula de ADN de interés unida por las ITR de AAV, se puede construir mediante la inserción directa de cualquier secuencia seleccionada en un genoma de AAV al cual se le han quitado los marcos de lectura abierta de AAV principales ("ORF"). Otras partes del genoma de AAV también se pueden eliminar, siempre que una parte suficiente de las ITR permanezca para permitir las funciones de replicación y

empaquetamiento. Dichas construcciones se pueden diseñar utilizando técnicas conocidas en la técnica.

Alternativamente, las ITR de AAV se pueden retirar del genoma viral o de un vector de AAV que lo contiene y fusionarse en 5' y 3' a una construcción de ácido nucleico seleccionada que está presente en otro vector utilizando técnicas de ligado estándar. Por ejemplo, las ligaduras se pueden lograr en 20 mM Tris-Cl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 33 µg/ml BSA, 10 mM-50 mM NaCl, y 40 uM ATP, 0,01-0,02 (Weiss) unidades de ligasa de ADN de T4 a 0 °C (para ligadura de "extremo pegajoso") o 1 mM ATP, 0,3-0,6 (Weiss) unidades de ADN ligasa T4 a 14 °C (para ligadura de "extremo romo"). Las ligaduras de "extremo pegajoso" intermoleculares se realizan generalmente con concentraciones de ADN total de 30-100 µg/ml (concentración final total de 5-100 nM). Vectores de AAV que contienen ITR.

Además, los genes quiméricos se pueden producir sintéticamente para incluir las secuencias de ITR de AAV dispuestas 5' y 3' de una o más secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas. Se pueden utilizar los codones preferidos para la expresión de la secuencia génica quimérica en células de SNC de mamífero. La secuencia quimérica completa se ensambla a partir de oligonucleótidos superpuestos preparados mediante métodos estándar.

Para producir viriones de rAAV, se introduce un vector de expresión de AAV en una célula hospedadora adecuada utilizando técnicas conocidas, como la transfección. Un número de técnicas de transfección son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York. Algunos métodos de transfección particularmente adecuados incluyen co-precipitación de fosfato de calcio, microinyección directa en células cultivadas, electroporación, transferencia génica mediada por liposoma, transducción mediada por lípidos y administración de ácido nucleico utilizando microproyectiles de alta velocidad.

En una modalidad, las células hospedadoras adecuadas para producir viriones de rAAV incluyen microorganismos, células de levadura, células de insectos y células de mamífero que se pueden utilizar o se han utilizado como receptores de una molécula de ADN heteróloga. El término incluye la progenie de la célula original que se ha transfectado. Por ende, una "célula hospedadora", según se utiliza en la presente, generalmente se refiere a una célula que se ha transfectado con una secuencia de ADN exógena. Las células de la línea celular humana estable, 293 (disponibles fácilmente, p. ej., a través de la Colección Americana de Cultivos Tipo con el número de acceso ATCC CRL1573) se pueden utilizar en la práctica de la presente descripción. Particularmente, la línea celular humana 293 es una línea celular de riñón embrionario humano que se ha transformado con fragmentos de

ADN de adenovirus tipo-5 y expresa los genes adenovirales E1a y E1b. La línea celular 293 se transfecta fácilmente y proporciona una plataforma particularmente conveniente para producir los viriones de rAAV.

"Región codificante de rep de AAV" significa la región reconocida en la técnica del genoma de AAV que codifica las proteínas de replicación Rep 78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40. Se ha demostrado que estos productos de expresión Rep poseen muchas funciones, incluido el reconocimiento, unión y corte del origen de replicación de ADN de AAV, la actividad helicasa de ADN y la modulación de la transcripción a partir de los promotores de AAV (u otros heterólogos). Los productos de expresión Rep se requieren colectivamente para replicar el genoma de AAV. Los homólogos adecuados de la región codificante de rep de AAV incluyen el gen rep de herpesvirus 6 humano (HHV-6) que también se sabe que media la replicación del ADN de AAV-2.

"Región codificante de cap de AAV" significa la región reconocida en la técnica del genoma de AAV que codifica las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 o sus homólogos funcionales. Estos productos de expresión de cap suministran las funciones de empaquetamiento que se necesitan colectivamente para empaquetar el genoma viral.

En una modalidad, se introducen funciones auxiliares de AAV en la célula hospedadora mediante la transfección de la célula hospedadora con una construcción auxiliar de AAV ya sea antes o simultáneamente con la transfección del vector de expresión de AAV. Las construcciones auxiliares de AAV, por lo tanto, se utilizan para proporcionar al menos la expresión transitoria de genes de rep y/o cap de AAV para complementar las funciones de AAV faltantes que son necesarias para la infección de AAV productiva. Las construcciones auxiliares de AAV carecen de ITR de AAV y no se pueden replicar ni empaquetar. Estas construcciones pueden estar en forma de un plásmido, fago, transposon, cósmido, virus o virión. Se ha descrito una cantidad de construcciones auxiliares de AAV, como los plásmidos utilizados comúnmente pAAV/Ad y pIM29+45 que codifican los productos de expresión Rep y Cap. Se ha descrito una cantidad de otros vectores que codifican los productos de expresión de Rep y/o Cap.

Algunos métodos de suministro de vectores virales incluyen la inyección de AAV2 en el LCR. Generalmente, los viriones de rAAV se pueden introducir en las células del SNC utilizando técnicas de transducción *in vivo* o *in vitro*. Si se transduce *in vitro*, la célula 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 células del SNC, p. ej., en un medio adecuado, y la detección de las células que albergan el ADN de interés se puede realizar 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 más completamente abajo, y la composición se puede introducir en el sujeto mediante diversas técnicas, como injertos, inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal.

En una modalidad, las composiciones farmacéuticas comprenden material genético suficiente para producir una cantidad terapéuticamente eficaz del ácido nucleico de interés, es decir, una cantidad suficiente para reducir o mejorar los síntomas del estado de enfermedad en cuestión o una cantidad suficiente para conferir el beneficio deseado. Las composiciones farmacéuticas también contendrán un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos excipientes 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, sorbitol, Tween 80 y líquidos como agua, 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, benzoatos y similares. De manera adicional, dichos vehículos pueden contener sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsificantes, sustancias amortiguadoras del pH y similares. Una planteamiento completo de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Se debe entender que más de un transgen se puede expresar por el vector viral suministrado. Alternativamente, vectores separados, cada uno expresa uno o más transgenes diferentes, también se pueden administrar al SNC como se describió en la presente. Por otra parte, también se busca que los vectores virales administrados por los métodos de la presente descripción se combinen con otras composiciones y terapias adecuadas.

Como resultará evidente para los entendidos en la técnica en virtud de los principios de la presente memoria descriptiva, se puede determinar empíricamente una cantidad eficaz de vector viral que se debe añadir. La administración se puede efectuar en una dosis, continua o intermitente durante todo el curso del tratamiento. Los métodos para determinar los medios y dosificaciones de

administración más eficaces son conocidos por los entendidos en la técnica y varían con el vector viral, la composición de la terapia, las células diana y el sujeto tratado. Se puede realizar una única administración y múltiples administraciones con el nivel de dosis y el patrón seleccionados por el médico tratante.

En determinadas modalidades, el rAAV se administra en una dosis de aproximadamente 1-5 ml de 1×10^5 - 1×10^{16} vg/ml. En determinadas modalidades, el rAAV se administra en una dosis de aproximadamente 1-3 ml de 1×10^7 - 1×10^{14} vg/ml. En determinadas modalidades, el rAAV se administra en una dosis de aproximadamente 1-2 ml de 1×10^8 - 1×10^{13} vg/ml.

Las formulaciones que contienen las partículas de rAAV contendrán una cantidad eficaz de las partículas de rAAV en un vehículo, la cantidad eficaz será determinada fácilmente por un entendido en la técnica. Las partículas de rAAV pueden oscilar típicamente entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 95 % (p/p) de la composición o incluso más o menos si corresponde. La cantidad que se administrará depende de factores como la edad, el peso y la condición física del animal o el sujeto humano considerado para el tratamiento. Un experto en la técnica puede establecer las dosificaciones eficaces mediante ensayos de rutina que establecen curvas de respuesta a la dosis. El sujeto se trata mediante la administración de las partículas de rAAV en una o más dosis. Se pueden administrar múltiples dosis según sea necesario para mantener una actividad enzimática adecuada.

Se pueden emplear vehículos como agua, solución salina acuosa, LCR artificial u otras sustancias conocidas con el sujeto de la invención. Para preparar una formulación, se puede aislar, liofilizar y estabilizar la composición purificada. La composición se puede ajustar a una concentración adecuada, combinar opcionalmente con un agente antiinflamatorio y empaquetar para su uso.

Proteína TPP1

En determinadas modalidades, el ácido nucleico que se administra codifica TPP1, una TPP1 que tiene identidad sustancial con la TPP1 de tipo salvaje y/o una variante, mutante o fragmento de TPP1. La secuencia de aminoácidos de TPP1 humana se proporciona en la figura 14 y la secuencia de ácidos nucleicos se proporciona en la figura 15. La figura 16 proporciona la secuencia de aminoácidos de TPP1 de *Macaca mulatta* y la figura 17 proporciona la secuencia de aminoácidos de TPP1 de *Macaca fascicularis*. En determinadas modalidades, la proteína de TPP1 puede tener aproximadamente el 70 % de homología, aproximadamente el 75 % de homología, el 80 % de homología, el 85 % de homología, el 90 % de homología, el 95 % de homología, el 98 % de homología, el 99 % de homología o incluso el 100 % de homología con la proteína presentada en las figuras 14, 16 o 17. La proteína de TPP1 puede tener aproximadamente el

70 % de identidad, aproximadamente el 75 % de identidad, el 80 % de identidad, el 85 % de identidad, el 90 % de identidad, el 95 % de identidad, el 98 % de identidad, el 99 % de identidad o incluso el 100 % de identidad con la proteína presentada en las figuras 14, 16 o 17.

Una proteína mutante se refiere a la proteína codificada por un gen que tiene una mutación, p. ej., una mutación de cambio de sentido o sin sentido en TPP1. El término "ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de estos en forma de cadena simple o doble, compuestos por monómeros (nucleótidos) que contienen un azúcar, fosfato y una base que es o bien una purina o pirimidina. A menos que se restrinja de manera específica, el término abarca los ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que poseen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácidos nucleicos en particular también abarca las variantes modificadas de manera conservadora de esta (por ejemplo, sustituciones de codones redundantes) y secuencias complementarias así como también la secuencia indicada de manera explícita. En específico, las sustituciones de codones redundantes pueden lograrse mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxinosina.

Un "fragmento de ácido nucleico" es una parte de una molécula de ácido nucleico determinada. El ácido desoxirribonucleico (ADN) en la mayoría de los organismos es el material genético mientras que el ácido ribonucleico (ARN) participa en la transferencia de la información contenida dentro del ADN en las proteínas. Los fragmentos y variantes de las secuencias de nucleótidos descritas y las proteínas o proteínas de longitud parcial codificadas por estas también están comprendidos por la presente invención. "Fragmento" o "parte" significa una longitud completa o menos de una longitud completa de la secuencia de nucleótidos codificante, o la secuencia de aminoácidos, de un polipéptido o proteína. En determinadas modalidades, el fragmento o parte es biológicamente funcional (es decir, conserva el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 99 % o el 100 % de la actividad enzimática de TPP1 de tipo salvaje).

Una "variante" de una molécula es una secuencia que es sustancialmente similar a la secuencia de la molécula natural. Para las secuencias de nucleótidos, las variantes incluyen aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos idéntica de la proteína natural. Las variantes alélicas de origen natural como estas se pueden identificar con el

uso de técnicas de biología molecular, como por ejemplo con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación. Las secuencias de nucleótidos variantes también incluyen secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente, como aquellas generadas, por ejemplo, mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio, que codifican la proteína nativa, así como aquellas que codifican un polipéptido que tiene sustituciones de aminoácidos. Generalmente, las variantes de secuencias de nucleótidos de la invención tendrán al menos el 40 %, el 50 %, el 60 % al 70 %, p. ej., el 71 %, el 72 %, el 73 %, el 74 %, el 75 %, el 76 %, el 77 %, el 78 % al 79 %, generalmente al menos el 80 %, p. ej., el 81 %-84 %, al menos el 85 %, p. ej., el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 89 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 % al 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos natural (endógena). En determinadas modalidades, la variante es biológicamente funcional (es decir, conserva el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 99 % o el 100 % de la actividad enzimática de TPP1 de tipo salvaje).

Las "variaciones modificadas de forma conservadora" de una secuencia de ácido nucleico particular se refieren a aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas. Debido a la degradación del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido determinado. Por ejemplo, los codones CGT, CGC, CGA, CGG, AGA y AGG todos codifican el aminoácido arginina. Por lo tanto, en cada posición en donde una arginina se especifica por un codón, el codón se puede alterar para obtener cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar la proteína codificada. Dichas variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de "variaciones modificadas de manera conservadora". Cada secuencia de ácido nucleico descrita en la presente que codifica un polipéptido también describe cada variación silenciosa posible, excepto cuando se indique lo contrario. Un experto en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto ATG, que comúnmente es el único codón para la metionina) puede ser modificado para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica mediante técnicas estándar. Por consiguiente, cada "variación silenciosa" de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

El término "identidad sustancial" de las secuencias de polinucleótidos significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos el 70 %, el 71 %, el 72 %, el 73 %, el 74 %, el 75 %, el 76 %, el 77 %, el 78 % o el 79 % o al menos el 80 %, el 81 %, el 82 %, el 83 %, el 84 %, el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 % o el 89 % o al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 % o el 94 %, o incluso al menos

el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia utilizando uno de los programas de alineamiento descritos utilizando parámetros estándar. Un experto en la técnica reconocerá que estos valores se pueden ajustar de manera apropiada para determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas mediante dos secuencias de nucleótidos considerando la degradación de los codones, la similitud de aminoácidos, la posición del marco de lectura y similares. La identidad sustancial de las secuencias de aminoácidos para estos fines normalmente significa una identidad de secuencia de al menos el 70 %, al menos el 80 %, el 90 % o incluso al menos el 95 %.

El término "identidad sustancial" en el contexto de un péptido indica que un péptido comprende una secuencia con al menos el 70 %, el 71 %, el 72 %, el 73 %, el 74 %, el 75 %, el 76 %, el 77 %, el 78 % o el 79 % o el 80 %, el 81 %, el 82 %, el 83 %, el 84 %, el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 % o el 89 %, o al menos el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 % o el 94 %, o incluso el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de referencia en una ventana de comparación específica. Una indicación de que dos secuencias de péptidos son sustancialmente idénticas es que un péptido reacciona inmunológicamente con los anticuerpos generados contra el segundo péptido. Por lo tanto, un péptido es sustancialmente idéntico a un segundo péptido, por ejemplo, cuando los dos polipéptidos difieren únicamente en una sustitución conservadora.

Apolipoproteína E (ApoE)

Hay varias isoformas de apolipoproteína E humana (ApoE) diferentes; la presencia de algunas de estas isoformas en el cerebro aumenta el riesgo de enfermedad de Alzheimer (AD), mientras que la presencia de otras isoformas disminuye el riesgo de AD. La presencia de la isoforma $\epsilon 4$ de ApoE es un factor de riesgo genético fuerte para AD esporádica, de aparición tardía. (Casellano et al., *Sci Transl Med*, 3(89):89ra57 (29 de junio de 2011).) El alelo $\epsilon 4$ de ApoE aumenta fuertemente el riesgo de AD y disminuye la edad de inicio. Por otra parte, la presencia del $\epsilon 2$ de ApoE parece disminuir el riesgo de AD. Se sugiere que las isoformas de ApoE humana afectan diferencialmente la eliminación o síntesis de β -amiloide ($A\beta$) *in vivo*.

En determinadas modalidades, el ácido nucleico que se administra codifica ApoE, una ApoE que tiene identidad sustancial con ApoE de tipo salvaje, o una variante, mutante y/o fragmento de ApoE. En determinadas modalidades, el ácido nucleico codifica ApoE $\epsilon 2$, una $\epsilon 2$ de ApoE que tiene identidad sustancial con $\epsilon 2$ de ApoE de tipo salvaje, y/o una variante, mutante o fragmento de $\epsilon 2$ de ApoE.

Agentes de inmunosupresión

En determinadas modalidades, también se administra un agente de inmunosupresión al mamífero. En determinadas modalidades, el agente de inmunosupresión es un agente antiinflamatorio. En determinadas modalidades, el agente antiinflamatorio es micofenolato. En determinadas modalidades, el agente antiinflamatorio se administra antes de la administración de las partículas de rAAV. En determinadas modalidades, el agente antiinflamatorio se administra concurrentemente con la administración de las partículas de rAAV. En determinadas modalidades, el agente antiinflamatorio se administra posteriormente a la administración de las partículas de rAAV.

En determinadas modalidades, el agente antiinflamatorio se administra parenteralmente, por ejemplo a través de inyección intramuscular o subcutánea en un vehículo adecuado. Sin embargo, también son aceptables otros modos de administración, por ejemplo administración oral, intranasal o intraderma. En determinadas modalidades, se prepara una composición que comprende la partícula de rAAV y el agente antiinflamatorio y el agente antiinflamatorio y la partícula de rAAV se administran simultáneamente a la cisterna magna del mamífero y/o al ventrículo cerebral del mamífero, el espacio subaracnoide y/o el espacio intratecal.

Métodos para introducir material genético en células

El material genético exógeno (p. ej., un ADNc que codifica una o más proteínas terapéuticas) se introduce en la célula *in vivo* a través de métodos de transferencia genética, por ejemplo transfección o transducción, para proporcionar una célula modificada genéticamente. Diversos vectores de expresión (es decir, vehículos para facilitar la administración de material genético exógeno a una célula diana) son conocidos por los entendidos en la técnica.

Tal como se utiliza en la presente, "transfección de células" se refiere a la adquisición a través de una célula de material genético nuevo mediante la incorporación de ADN agregado. Por ende, transfección se refiere a la inserción de ácido nucleico en una célula utilizando métodos físicos o químicos. Varias técnicas de transfección son conocidas por los entendidos en la técnica, las cuales incluyen: coprecipitación de ADN de fosfato de calcio; DEAE-dextrano; electroporación; transfección mediada por liposoma catiónica; y bombardeo de micropartículas facilitado por partículas de tungsteno. Coprecipitación de ADN de fosfato de estroncio es otro método de transfección posible.

Por el contrario, "transducción de células" se refiere al proceso de transferir ácido nucleico a una célula utilizando un virus de ADN o ARN. Un virus de ARN (es decir, un retrovirus) para transferir un ácido nucleico a una célula en la presente se denomina retrovirus quimérico de transducción. El material genético exógeno

contenido dentro del retrovirus se incorpora en el genoma de la célula transducida. Una célula que ha sido transducida con un virus de ADN quimérico (p. ej., un adenovirus que porta un ADNc que codifica un agente terapéutico), no tendrá el material genético exógeno incorporado en su genoma pero será capaz de expresar el material genético exógeno que se encuentra retenido de forma extracromosómica dentro de la célula.

Típicamente, el material genético exógeno incluye el gen heterólogo (usualmente en forma de un ADNc que comprende los exones que codifican la proteína terapéutica) junto con un promotor para controlar la transcripción del gen nuevo. El promotor tiene característicamente una secuencia de nucleótidos específica necesaria para iniciar la transcripción. Opcionalmente, el material genético exógeno además incluye secuencias adicionales (es decir, potenciadores) necesarias para obtener la actividad de transcripción del gen deseada. A los efectos de esta descripción discusión, un "potenciador" es simplemente cualquier secuencia de ADN no traducida que funciona contigua con la secuencia de codificación (en cis) para cambiar el nivel de transcripción basal indicado por el promotor. El material genético exógeno se puede introducir en el genoma de la célula inmediatamente corriente abajo desde el promotor de modo que el promotor y la secuencia codificante se unan operativamente para permitir la transcripción de la secuencia codificante. Un vector de expresión retroviral puede incluir un elemento promotor exógeno para controlar la transcripción del gen exógeno insertado. Dichos promotores exógenos incluyen tanto promotores constitutivos como inducibles.

Los promotores constitutivos de origen natural controlan la expresión de funciones de células esenciales. Como resultado, un gen bajo el control de un promotor constitutivo se expresa en todas las condiciones de crecimiento celular. Los promotores constitutivos ejemplares incluyen promotores para los siguientes genes que codifican determinadas funciones constitutivas o "de limpieza": hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), dihidrofolato reductasa (DHFR), adenosina desaminasa, fosfoglicerol cinasa (PGK), piruvato cinasa, fosfoglicerol mutasa, el promotor de actina, y otros promotores constitutivos conocidos por los entendidos en la técnica. Además, muchos promotores virales funcionan constitutivamente en células eucariotas. Estos incluyen: los promotores tempranos y tardíos de SV40; las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de leucemia de Moloney y otros retrovirus; y el promotor de timidina cinasa de virus del herpes simple, entre muchos otros. En consecuencia, cualquiera de los promotores constitutivos mencionados anteriormente se puede utilizar para controlar la transcripción de un inserto de gen heterólogo.

Los genes que se encuentran bajo el control de los promotores inducibles se

expresan solos o a un grado superior, en presencia de un agente de inducción, (p. ej., la transcripción bajo el control del promotor de metalotioneína aumenta considerablemente en presencia de determinados iones de metal). Los promotores inducibles incluyen elementos de respuesta (RE) que estimulan la transcripción cuando sus factores de inducción están unidos. Por ejemplo, hay RE para factores de suero, hormonas esteroides, ácido retinoico y AMP cíclico. Se pueden elegir promotores que contienen un RE particular para obtener una respuesta inducible y, en algunos casos, el propio RE se puede unir a un promotor diferente, confiriendo inducibilidad al gen recombinante. Por ende, al seleccionar el promotor adecuado (constitutivo contra inducible; fuerte contra débil), es posible controlar tanto la existencia como el nivel de expresión de un agente terapéutico en la célula modificada genéticamente. Si el gen que codifica el agente terapéutico se encuentra bajo el control de un promotor inducible, la administración del agente terapéutico *in situ* es activada por la exposición de la célula modificada genéticamente *in situ* a condiciones para permitir la transcripción del agente terapéutico, p. ej., a través de inyección intraperitoneal de inductores específicos de los promotores inducibles que controlan la transcripción del agente. Por ejemplo, la expresión *in situ* a través de células modificadas genéticamente de un agente terapéutico codificado por un gen bajo el control del promotor de metalotioneína, mejora por el contacto de las células modificadas genéticamente con una solución que contiene los iones de metal adecuados (es decir, de inducción) *in situ*.

En consecuencia, la cantidad de agente terapéutico que se administra *in situ* se regula a través del control de factores tales como: (1) la naturaleza del promotor utilizado para dirigir la transcripción del gen insertado, (es decir, ya sea si el promotor es constitutivo o inducible, fuerte o débil); (2) la cantidad de copias del gen exógeno que se insertan en la célula; (3) la cantidad de células transducidas/transfectadas que se administran (p. ej., implantadas) al paciente; (4) el tamaño del implante (p. ej., injerto o sistema de expresión encapsulado); (5) la cantidad de implantes; (6) el período en el que las células transducidas/transfectadas se dejan en su lugar; y (7) la tasa de producción del agente terapéutico por la célula modificada genéticamente. Se considera que la selección y optimización de estos factores para la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico particular se encuentran dentro del alcance del entendido en la técnica sin experimentación innecesaria, teniendo en cuenta los factores descritos anteriormente y el perfil clínico del paciente.

Además de al menos un promotor y al menos un ácido nucleico heterólogo que codifica el agente terapéutico, el vector de expresión puede incluir un gen de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a la neomicina, para facilitar la

selección de células que se han transfectado o transducido con el vector de expresión. Alternativamente, las células son transfectadas con dos o más vectores de expresión, donde al menos un vector contiene los genes que codifican los agentes terapéuticos, y el otro vector contiene un gen de selección. Se considera que la selección de un promotor adecuado, potenciador, gen de selección y/o secuencia de señal (descrita abajo) se encuentra dentro del alcance del entendido en la técnica sin experimentación innecesaria.

El agente terapéutico puede ser dirigido para la administración a una ubicación extracelular, intracelular o de la membrana. Si se desea que el producto génico sea secretado de las células, se designa que el vector de expresión incluya una secuencia de "señal" de secreción adecuada para secretar el producto génico terapéutico de la célula al entorno extracelular. Si se desea que el producto génico sea retenido dentro de la célula, esta secuencia de señal de secreción se omite. De una manera similar, el vector de expresión se puede construir para que incluya secuencias de señal de "retención" para anclar el agente terapéutico dentro de la membrana plasmática celular. Por ejemplo, todas las proteínas de la membrana tienen regiones transmembrana hidrofóbicas, las cuales detienen la traslocación de la proteína en la membrana y no permiten que la proteína sea secretada. Se considera que la construcción de un vector de expresión que incluye secuencias de señal para dirigir un producto génico a una ubicación particular se encuentra dentro del alcance del entendido en la técnica sin la necesidad de experimentación innecesaria.

Ejemplo 1

Métodos de transferencia de genes en mamíferos grandes

Los trastornos de almacenamiento lisosómico (LSD) constituyen una amplia clase de trastornos metabólicos heredados. La mayoría de los LSD son provocados por deficiencias de la enzima lisosómica que dan lugar a daños en los órganos y frecuentemente a la degeneración del sistema nervioso central (CNS). La Lipofuscinosis cerioidea neuronal infantil tardía (LINCL) es una enfermedad neurodegenerativa recesiva autosómica provocada por mutaciones en un gen *CLN2* ceroidlipofuscinosis (CLN), neuronal 2, que codifica la proteasa lisosómica tripeptidil peptidasa 1 (TPP1). LINCL se caracteriza clínicamente por el nacimiento normal y el desarrollo temprano, el inicio de convulsiones a los 18-24 meses, el deterioro motor y cognitivo progresivo y la muerte prematura. La enfermedad se debe a una deficiencia en TPP1, que es una enzima lisosómica decorada M-6-P soluble.

En la actualidad se encuentra disponible la terapia de reemplazo de enzimas (ERT) para enfermedades de almacenamiento lisosómico que afectan tejidos

periféricos, pero no se ha utilizado en pacientes con implicación del sistema nervioso central (CNS). Un estudio reciente investigó si la administración de enzimas a través del fluido cerebroespinal era una vía alternativa potencial hacia CNS para LINCL (Chang et al., *Molecular Therapy* 16:649-656, 2008). Los ratones tratados mostraron neuropatología atenuada y una disminución de temblores en posición de descanso con respecto a ratones tratados con vehículos.

En el presente trabajo, se investigó si se puede realizar una administración global de un vector de forma eficaz para lograr niveles es estado estable de la enzima en el fluido cerebroespinal (CSF) por medio de inyección en el cerebro. Se realizaron estudios en un modelo de perro de LINCL. Los perros con LINCL son normales al nacer, pero desarrollan signos neurológicos alrededor de los 7 meses, déficits cognitivos comprobables a los ~ 5-6 meses, convulsiones a los 10-11 meses y pérdida visual progresiva. La mutación del gen *CLN2* en el perro con LINCL hace que la proteína TPP1 no sea funcional, y la proteína TPP1 no se puede detectar. Con la progresión de la enfermedad, los tejidos del cerebro se contraen, dando lugar a espacios ventriculares agrandados en el cerebro. Los síntomas neurológicos incluyen disminución de las funciones motoras y de equilibrio, pérdida de la visión, temblores.

Se les proporcionó terapia génica a las crías con LINCL afectadas a los tres meses de edad. Para la terapia génica, se generó AAV2-*CLN2* (véase WO 2012/135857) y se inyectó en un solo sitio (ventrículo lateral) o en dos sitios (ventrículo lateral más cisterna magna) en el cerebro. Se colocaron agujas en el ventrículo, o el ventrículo y la cisterna magna, y el vector recibió una infusión lenta durante varios minutos. Aunque gran parte de TPP1 hecho dentro de una célula permaneció en esa célula, una parte se secretó y fue tomada por célula vecinas. Esta propiedad de secreción y absorción se denominada "corrección cruzada" (figura 2). La corrección cruzada es valiosa en el contexto de terapia génica ya que si el gen *CLN2* se transfiere a células situadas estratégicamente en el cerebro con LINCL, esto puede permitir la corrección cruzada de muchas células circundantes.

En el presente estudio, el problema de administrar globalmente el vector terapéutico aprovechó el flujo de CSF en el cerebro al dirigirse a células que alinean los ventrículos y las células que componen la meninges. Se inyectó AAV2-*CLN2* en un solo sitio (ventrículo lateral) o en dos sitios (ventrículo lateral más cisterna magna) en el cerebro. Se observó la expresión de TPP1 en perros *Cln2*^{-/-} después de la administración de AAV (figura 3). Se observó un impacto positivo significativo en el volumen ventricular. También se evaluó el efecto de AAV.TPP1 sobre autofluorescencia (figura 4A). LA figura 4B muestra imágenes T1-MRI de perros tratados y no tratados. La figura 4C muestra los efectos de AAV.TPP1 en

perros con LINCL. La figura 4D muestra la distribución de huTPP1 después de la administración de AAV2/2-huCLN2.

En perros afectados no tratados, los espacios ventriculares agranda hasta diez veces el tamaño de los perros normales, mientras que la terapia con gen AAV2-CLN2 redujo significativamente este efecto. Además, se observó una amplia distribución de enzima, así como fue un beneficio clínico (examen clínico y esperanza de vida). Sin tratamiento, los perros afectados muestran signos de enfermedad en las 22 pruebas a las 30 semanas de edad. Alcanzan enfermedad en etapa terminal y se deben sacrificar entre las 45 y las 48 semanas de edad. En los perros que recibieron que recibieron terapia génica AAV2-CLN2, el inicio de cada uno de estos signos se retrasó o evitó.

Se observó un aumento en la actividad de TPP1 en el LCR después de la administración combinada a la cisterna y ventricular.

Por ende, en el perro con LINCL, la transferencia génica de AAV2-CLN2 produjo la reposición de la proteína TPP1 a muchas áreas del cerebro y los resultados indicaron que la transferencia génica de AAV2-CLN2 proporcionó efectos terapéuticos significativos, síntomas reducidos o retrasados y mejoró la calidad de vida para los perros con LINCL.

La actividad de huTPP1 en el LCR disminuyó poco después de la inyección (figura 5). Se observó una distribución amplia de enzima, pero los niveles fueron bajos en el momento del sacrificio 6-8 meses después de la terapia génica. Se postuló que la disminución en la actividad fue el resultado de una respuesta inmunitaria a la enzima humana en los perros. Para inhibir la disminución de la actividad, se introdujo un agente antiinflamatorio (micofenolato). Los resultados indicaron que el agente antiinflamatorio no inhibió la actividad enzimática del huTPP1 y fue eficaz para aumentar el período durante el cual la actividad enzimática estuvo presente (figura 6) y se observaron niveles de actividad enzimática sostenidos.

Se observó una alta actividad de caTPP1 en el LCR en el tiempo después de la inyección intraventricular de AAV2caCLN2 y el tratamiento con micofenolato temprano (figura 7).

Se observó un aumento en la actividad enzimática de TPP1 en muchos tejidos dos meses después de la administración (figura 8, 9A y 9B).

La figura 10 muestra la aparición de signos clínicos en los perros con LINCL. Se observó la actividad de caTPP1 en las meninges y el tejido periférico, como el hígado (figura 11).

Por ende, los inventores han demostrado la transformación de células pendimales mediante AAV2/2, que la enzima de TPP1 canina era producida y fluía con el LCR y que el tratamiento con micofeolato con inyección pro rot caCLN2 podía impedir la inmunorrespuesta en los perros.

Ejemplo 2

Estudios en primates no humanos

Utilizando técnicas similares a las descritas arriba, los inventores observaron que AAVeGFP transdujo el epéndimo en un cerebro de primates no humanos. Se realizó la evaluación *in vivo* del suministro de AAV2/2.TPP1 en cerebro de rhesus mediante inyección de AAV.TPP1 en el ventrículo o la cisterna magna, recolección del tejido 4-12 semanas más tarde y evaluación de la actividad de TPP1 en LCR o lisados tisulares (figura 12). Se observó la actividad en el área vestibular (tronco cerebral) en los primates no humanos (figura 13). Por ende, las células de recubrimiento ventriculares proporcionaron una fuente de enzima recombinante para la distribución del SNC amplio.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes se incorporan a la presente a modo de referencia. Aunque en la memoria descriptiva anterior, se ha descrito la invención con relación a determinadas modalidades preferidas y muchos detalles se han presentado con fines ilustrativos, resultará evidente para los entendidos en la técnica que la invención es susceptible de modalidades adicionales y que algunos de los detalles descritos en la presente se pueden variar considerablemente sin apartarse de los principios básicos de la invención.

El uso de los términos "un", "uno" y "el" y términos similares utilizados en el contexto de la descripción de la invención se debe interpretar como abarcativo tanto del singular como del plural, salvo que se indique lo contrario en la presente o que el contexto lo contradiga claramente. Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como expresiones abiertas (es decir, como expresiones que significan "que incluye, de modo no taxativo"), a menos que se indique lo contrario. La mención de intervalos de valores en la presente meramente pretende servir como un método taquigráfico para referirse individualmente a cada valor independiente comprendido en el intervalo, a menos que se indique lo contrario en la presente, y cada valor separado se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en la presente. Todos los métodos descritos en la presente se pueden realizar en cualquier orden adecuado, salvo que se indique lo contrario en la presente o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cualquiera de los ejemplos o las expresiones de ejemplo (por ejemplo, "tal como") que se proporcionan en la presente pretende meramente esclarecer mejor la invención y no representa una limitación al alcance de la invención, a menos que se reivindique lo contrario. No se debe interpretar nada de lo expresado en la memoria descriptiva como una indicación de que algún elemento no reivindicado es esencial para la puesta en práctica de la invención.

Las modalidades de la presente invención se describen aquí, inclusive la mejor manera conocida por los inventores de llevar a cabo la invención. Las variaciones de esas modalidades serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de la descripción que antecede. Los inventores esperan que los expertos utilicen tales variaciones según sea apropiado y pretenden que la invención se practique de una forma diferente a la que se describe específicamente en la presente. Por consiguiente, la presente invención incluye todas las modificaciones y los equivalentes del tema descrito en las reivindicaciones adjuntas según lo permitan las leyes correspondientes. Asimismo, la invención comprende toda combinación de los elementos antedichos en todas sus variaciones posibles, salvo que se indique lo contrario en la presente o que lo contradiga claramente el contexto.