

REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos Núm. de Serie 63/482,495, presentada el 30 de enero de 2022, el contenido completo de la cual se incorpora a la presente mediante esta referencia.

ANTECEDENTES

1. Campo

La presente divulgación se refiere en general a los campos de la medicina, virología y neurología. Más particularmente, se refiere a péptidos dirigidos que dirigen la administración de vectores virales a distintas estructuras en el cerebro, particularmente en el tratamiento de la enfermedad de CLN2/deficiencia de TPP1.

2. Descripción de la técnica relacionada

La enfermedad de CLN2/deficiencia de TPP1 es una enfermedad neurodegenerativa infantil provocada por la deficiencia en la enzima lisosomal soluble TPP1 debido a mutaciones de CLN2. Puesto que los pacientes con CLN2 no pueden producir ningún TPP1 funcional por sí mismos, el reemplazo génico es la mejor opción terapéutica. TPP1 es una enzima decorada con manosa-6-fosfato que se puede usar para la corrección cruzada de células deficientes mediante reemplazo enzimático o terapia génica. Para la eficacia, la terapia génica para la deficiencia de TPP1 requiere una amplia distribución en todo el cerebro. La transducción de las células endoteliales que recubren los ventrículos en perros enfermos con CLN2 mostró la eficacia del tratamiento con una neuropatología mejorada, una vida útil prolongada y la mejora de los síntomas (Katz, et al, 2013). Sin embargo, la transducción de estructuras cerebrales profundas y epéndimo en el cerebro de NHP es poco alcanzable con los actuales serotipos de AAV.

Los virus adenoasociados (AAV) representan fuertes candidatos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Los AAV son virus de ADN de hebra individual sin envoltura que pueden infectar tanto a las células en división como a las que no lo están. Después de la infección, el virus no exhibe una integración sólida dentro del genoma

del huésped, pero persiste como un episoma en el núcleo celular. La expresión de las cargas del AAV se controla espacialmente a nivel de la cápside del empaque y por el promotor transgénico. Debido a que el uso del AAV para el tratamiento de la enfermedad puede requerir la intervención en el tejido enfermo, puede surgir un problema en ese tejido diana que contiene un perfil de expresión génica diferente al de su contraparte sana. Encontrar la secuencia promotora correcta para impulsar la expresión transgénica terapéutica es un objetivo importante.

Se han desarrollado diferentes estrategias para generar variantes de vectores de AAV, incluido el diseño racional y la evolución dirigida. El enfoque de diseño racional utiliza el conocimiento de las cápsides de AAV para realizar cambios dirigidos a la cápside para alterar la eficiencia o especificidad de transducción, tal como mutaciones de tirosina en la superficie de la cápside para aumentar la eficiencia de transducción. El enfoque de evolución dirigida no requiere ningún conocimiento de la estructura de la cápside y se realiza a través de mutagénesis aleatoria, barajado de la cápside o inserciones aleatorias de péptidos. Estas estrategias generalmente usan sistemas *in vitro* o ratones, que son ideales para estudios basados en células o ratones, pero no implican traducción a la clínica. De hecho, ninguna variante del AAV se dirige a estructuras cerebrales distintas de manera específica o eficiente. Como tal, se necesitan variantes del AAV que sean capaces de dirigirse a distintas estructuras cerebrales.

BREVE DESCRIPCIÓN

Por lo tanto, de acuerdo con la presente divulgación, se proporciona un método para expresar una tripeptidil peptidasa 1 (TPP1) en una neurona o célula endotelial de un sujeto, que comprende administrar al sujeto un virus adenoasociado modificado (AAV) que codifica para una TPP1 bajo el control de un promotor operable en la neurona o célula endotelial, en donde el AAV comprende una proteína de cápside modificada que comprende una secuencia de direccionamiento para dirigirse al epéndimo y las neuronas del CNS, y en donde el AAV modificado evita la transducción de los ganglios de la raíz dorsal. El promotor puede ser un promotor constitutivo o un promotor específico de tejido. El promotor puede ser un potenciador temprano de CMV/promotor de β actina de pollo (CAG).

El promotor CAG puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 1. El AAV modificado puede ser AAV1. La secuencia de direccionamiento se puede insertar cerca o después de la posición 590 de la SEQ ID NO: 2. La secuencia de direccionamiento puede comprender o consistir en ERDRTRG (SEQ ID NO: 3). La TPP1 puede comprender o consistir en la

secuencia de SEQ ID NO: 4.

La secuencia de direccionamiento puede estar flanqueada por secuencias enlazadoras, en donde las secuencias enlazadoras en cada lado de la secuencia de direccionamiento tienen dos o tres aminoácidos de longitud. Las secuencias enlazadoras pueden ser SSA en el lado N-terminal de la secuencia de direccionamiento y AS en el lado C-terminal de la secuencia de direccionamiento. La proteína de cápside modificada puede comprender o consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 5. La secuencia de TPP1 puede estar unida operativamente a una señal de poliadenilación.

La administración puede ser por administración directa intracerebroventricular o intracisternal magna o intratecal. El AAV modificado puede administrarse más de una vez, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más administraciones. La administración modificada del AAV puede ocurrir mensualmente, anualmente o cada 5 años o con menor frecuencia.

Se puede administrar una pluralidad de partículas virales, tal como mediante la dosificación de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{14} genomas de vector por kilogramo (vg/kg), o la dosificación de aproximadamente 1×10^7 - 1×10^{14} , aproximadamente 1×10^8 - 1×10^{14} , aproximadamente 1×10^9 - 1×10^{14} , aproximadamente 1×10^{10} - 1×10^{14} , aproximadamente 1×10^{10} - 1×10^{13} , aproximadamente 1×10^{10} - 1×10^{13} , aproximadamente 1×10^{10} - 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{11} - 1×10^{12} , o aproximadamente 1×10^{12} - 1×10^{13} vg/kg del paciente.

El sujeto puede padecer Lipofuscinosciosis Neuronal Ceroidea tipo 2 (CLN2) infantil tardía/enfermedad de Batten. El sujeto puede tener menos de 4 años o estar entre el nacimiento y los 25 años.

En otra modalidad, se proporciona un virus adenoasociado modificado (AAV) que codifica para una TPP1 bajo el control de un promotor operable en una neurona o célula endimaria, en donde el AAV comprende una proteína de cápside modificada que comprende una secuencia de direccionamiento, y en donde el AAV modificado no se dirige a los ganglios de la raíz dorsal. El promotor puede ser un promotor constitutivo o un promotor específico de tejido. El promotor puede ser un potenciador temprano de CMV/promotor de β actina de pollo (CAG).

El promotor CAG puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 1. El AAV modificado puede basarse en AAV1, pero con una secuencia de direccionamiento cerca o después de la

posición 590 de la SEQ ID NO: 2. La secuencia de direccionamiento puede comprender o consistir en ERDRTRG (SEQ ID NO: 3). La TPP1 puede comprender o consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 4.

5 La secuencia de direccionamiento puede estar flanqueada por secuencias enlazadoras, en donde las secuencias enlazadoras en cada lado de la secuencia de direccionamiento tienen dos o tres o más aminoácidos de longitud. Las secuencias enlazadoras pueden ser SSA en el lado N-terminal de la secuencia de direccionamiento y AS en el lado C-terminal del péptido de secuencia. La proteína de cápside modificada puede comprender o consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 5. La secuencia de TPP1 puede estar
10 unida operativamente a una señal de poliadenilación.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende el AAV modificado como se describe en la presente, así como un kit que comprende el AAV modificado como se describe en la presente.

En aun otra modalidad, se proporciona un uso de un virus adenoasociado (AAV)
15 modificado que codifica para una tripeptidil peptidasa 1 (TPP1) bajo el control de un promotor operable en una célula neuronal o ependimaria, en donde el AAV comprende una proteína de cápside modificada que comprende una secuencia de direccionamiento tal como ERDRTRG (SEQ ID NO: 3), para expresar TPP1 en una neurona o célula ependimaria, en donde el AAV modificado no se dirige a los ganglios de la raíz dorsal; un uso de un virus adenoasociado
20 (AAV) modificado que codifica para una tripeptidil peptidasa 1 (TPP1) bajo el control de un promotor operable en una neurona o célula ependimaria, en donde el AAV comprende una proteína de cápside modificada que comprende la secuencia de direccionamiento ERDRTRG (SEQ ID NO: 3), para tratar la enfermedad de Lipofuscinoses Neuronal Ceroidea tipo 2 (CLN2) infantil tardía/enfermedad de Batten en un sujeto afectado por la misma, en donde el AAV
25 modificado no se dirige a los ganglios de la raíz dorsal; y un uso de un virus adenoasociado modificado (AAV) que codifica para una tripeptidil peptidasa 1 (TPP1) bajo el control de un promotor operable en una célula de neurona o ependimaria, en donde el AAV comprende una proteína de cápside modificada que comprende la secuencia de direccionamiento ERDRTRG (SEQ ID NO: 3), en la preparación de un medicamento para tratar la enfermedad de
30 Batten/Lipofuscinoses Neuronal Ceroidea tipo 2 (CLN2) infantil tardía en un sujeto afectado por la misma, en donde el AAV modificado no se dirige a los ganglios de la raíz dorsal.

El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno(a)", pero también es

consistente con el significado de "uno(a) o más", "al menos uno(a)" y "uno(a) o más de uno(a)". La palabra "aproximadamente" significa más o menos el 5% del número indicado.

Se contempla que cualquier método o composición descrita en la presente se puede implementar con respecto a cualquier otro método o composición descrita en la presente.

- 5 Otros objetos, características y ventajas de la presente divulgación serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican modalidades específicas de la divulgación, se proporcionan solo a modo de ilustración, ya que varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la divulgación serán evidentes para los
- 10 expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente divulgación. La divulgación se puede entender mejor mediante referencia a uno o más de estos dibujos en combinación
- 15 con la descripción detallada de modalidades específicas presentadas en la presente.

- La Figura 1. epAAV: El parénquima cerebral y el epéndimo muestran una fuerte señal en todo momento.** Una cápside del AAV dirigida a epéndimo/neurona (epAAV) que expresa el fluoróforo mTFP1 (cian) se inyectó de forma introcerebroventricular (ICV) a un primate no humano a $1,85 \times 10^{13}$ vg. Las células endoteliales que recubren los ventrículos lateral y cuarto, incluido el plexo coroideo, tuvieron una fuerte señal positiva de mTFP1
- 20 observada mediante microscopía confocal. En el parénquima cerebral, hubo células positivas en el subículo y parasubículo, así como en las áreas corticales de todo el cerebro (corteza entorrinal, motora y temporal). También se observó una señal positiva de mTFP1 en múltiples núcleos del tálamo (dorsal lateral, dorsal medial y tálamo lateral anterior ventral). Las
- 25 imágenes confocales se capturaron con un microscopio Leica SP8. Barra de escala de 50 μm .

- Figura 2. epAAV: Los ganglios de la raíz dorsal (DRG) son negativos para nuestro transgén.** La cápside del AAV dirigida al endotelio (epAAV) que expresa el fluoróforo mTFP1 (cian) se inyectó de forma introcerebroventricular (ICV) a un primate no humano a $1,85 \times 10^{13}$ vg. Se sabe que la toxicidad de los ganglios de la raíz dorsal se presenta en presencia
- 30 de una fuerte expresión exógena de la administración del AAV. Los núcleos celulares se visualizaron usando contratinción con DAPI (azul; columna izquierda). Hibridación in situ de fluorescencia de RNAscope sondeada para transcritos de interés (columna central, sonda

indicada dentro de la imagen). Se usó un control positivo (+control) para detectar ubiquitina C (UBC), un transcrito que se sabe que se expresa en DRG; se usó una sonda aleatorizada (Scramble) como control negativo (-control); y se detectó mTFP1 con una sonda para nuestro transgén (mTFP1) en DRG cervicales, torácicos y lumbares. Las imágenes combinadas se muestran en la columna derecha. No hubo transcripciones detectables en las regiones cervical, torácica o lumbar de los DRG. Por lo tanto, el epéndimo/neurona que se dirige a la cápside no transduce los DRG. Imágenes confocales con un microscopio Leica SP8. Barra de escala de 50 μ m.

Figura 3. epAAV: La médula espinal es negativa para nuestro transgén. Una cápside del AAV dirigida a epéndimo/neurona (epAAV) que expresa el fluoróforo mTFP1 (cian) se inyectó de forma introcerebroventricular (ICV) a un primate no humano a $1,85E13$ vg. Los núcleos celulares se visualizaron usando contratinción con DAPI (azul; columna izquierda). Hibridación in situ de fluorescencia de RNAscope sondeada para transcritos de interés (columna central, sonda indicada dentro de la imagen). Se usó un control positivo (+control) para detectar ubiquitina C (UBC), un transcrito que se sabe que se expresa en la médula espinal; se detectó mTFP1 con una sonda para nuestro transgén (mTFP1; cian) en las regiones cervical, torácica y lumbar de la médula espinal. Las imágenes combinadas se muestran en la columna derecha. No hubo transcripciones detectables en las regiones cervical, torácica o lumbar de la médula espinal. Imágenes confocales con un microscopio Leica SP8. Barra de escala de 50 μ m.

Figura 4. epAAV: Los órganos periféricos muestran células escasas o no positivas. Una cápside del AAV dirigida a epéndimo/neurona (epAAV) que expresa el fluoróforo mTFP1 (cian) se inyectó de forma introcerebroventricular (ICV) en el CSF a un primate no humano a $1,85E13$ vg. Los núcleos celulares se visualizaron usando contratinción con DAPI (azul; columna izquierda). Se detectó epifluorescencia para mTFP1 (cian). Las células con altos niveles de acumulación de autofluorescencia se muestran en rojo (autofluorescencia). Las imágenes combinadas se muestran en la columna derecha. El **hígado (paneles superiores)** tiene un bajo número de células con señal positiva para nuestro transgén, mTFP1, mientras que no hubo detección de nuestro transgén en el **Corazón (paneles inferiores)**. Todas las imágenes se capturaron en un microscopio Leica DM6000B. Barra de escala de 50 μ m.

Figura 5. Curva de supervivencia que representa un aumento en la esperanza de vida en ratones *Cln2^{-/-}* tratados con nuestra nueva construcción terapéutica en relación

con ratones normales o enfermos no tratados. La gráfica muestra el porcentaje de supervivencia de ratones $Cln2^{+/+}$, $Cln2^{-/-}$ y $Cln2^{-/-} + 5,0 E + 10 \text{ vg epAAV}$ a lo largo del tiempo. En general, el índice de supervivencia más baja se observó en ratones $Cln2^{-/-}$ ($n=10$) con un promedio de 17,1 semanas y una vida útil máxima de 19,7 semanas. El tratamiento de terapia
5 génica con 5,0E + 10vg de epAAV aumenta significativamente la vida media de $Cln2^{-/-}$ ($n=10$) hasta 18,6 semanas en promedio y un máximo de 28,6 semanas. Se observó un índice de supervivencia del 100% en ratones $Cln2^{+/+}$ ($n=9$). * $p<0,05$ mediante la prueba de Mantel-Cox.

Figura 6. El inicio del fenotipo del temblor en reposo se retrasa y es menos agresivo en $Cln2^{-/-}$ tratado con nuestra nueva construcción terapéutica en relación con el no tratado. La gráfica muestra una evaluación de temblor en reposo en ratones $Cln2^{+/+}$, $Cln2^{-/-}$ y $Cln2^{-/-} + 5,0 E + 10 \text{ vg epAAV}$. El fenotipo de temblor en reposo se puede detectar en ratones $Cln2^{-/-}$ no tratados a las 13 semanas de edad con respecto a $Cln2^{+/+}$, con un aumento agresivo de la gravedad a lo largo del tiempo. Los ratones $Cln2^{-/-}$ tratados con 5,0E + 10vg de epAAV retrasaron significativamente el inicio del temblor en reposo hasta las 16
10 semanas, con una atenuación notable del fenotipo y una progresión más lenta a lo largo del tiempo.

Figura 7. La actividad de TPP1 en el sistema nervioso central aumenta en relación con los niveles endógenos después del tratamiento con la nueva construcción terapéutica. Los gráficos muestran la actividad de TPP1 en ratones $Cln2^{+/+}$ y $Cln2^{-/-}$ no
20 tratados o tratados con una inyección unilateral de 5,0 E +10 vg epAAV. Los ratones inyectados con epAAV tienen una mayor actividad de TPP1 en las diferentes áreas cerebrales analizadas en comparación con la actividad de TPP1 endógena en ratones $Cln2^{-/-}$ no inyectados y también están muy elevados con respecto a los ratones normales. El corazón y el bazo de los ratones $Cln2^{-/-}$ inyectados, aunque no son la diana directa de la terapia, tienen
25 niveles mínimamente aumentados de actividad de TPP1 en relación con los ratones $Cln2^{-/-}$ no inyectados.

Figuras 8A-D. Cuantificación de la transducción endodimaria en 5 NHP que recibieron infusión ICV de AAV-EP+. AAV-Ep+ administrado a ($n=5$) macacos rhesus a través de infusión ventricular intracerebral (ICV) a $1E13 \text{ vg}$ por sujeto. Células endodimarias
30 transducidas y neuronas parenquimales identificadas por fluorescencia y morfología mediante microscopía de cerebros seccionados. Número total y transducido de células contadas mediante un algoritmo automatizado, usando Cellpose y QuPath. (Figura 8A) Imagen representativa de 40x que muestra una transducción robusta y la expresión de mRuby3 de la

capa endotelial de células que recubren el ventrículo. (Figura 8B) Cuantificación de células endoteliales y parenquimatosas transducidas en 75 imágenes (40x), 15.096 células totales y 5.852 células endoteliales. (Figura 8C) imágenes de escaneo de mosaico 10x tomadas que muestran una amplia transducción endotelial en el área del revestimiento endotelial del ventrículo lateral anterior (slab 4). (Figura 8D) Cuantificación de imágenes de escaneo de mosaico 10x del ventrículo lateral en los slab 4 y 5 de 4 escaneo de mosaico de NHP 8, y se cuantificaron 34 734 células endoteliales totales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la presente se proporcionan métodos para expresar una tripeptidil peptidasa 1 (TPP1) en el epéndimo y las neuronas de un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cápside de virus adenoasociado (AAV) modificado que encapsida un transgén que codifica para una TPP1 bajo el control de un promotor operable en la neurona/epéndimo, en donde el AAV comprende una proteína de cápside modificada que comprende una secuencia de direccionamiento.

En algunas modalidades, cada uno de los vectores virales comprende una cápside modificada, en donde la cápside modificada comprende una secuencia de aminoácidos que dirige el vector viral a una estructura cerebral distinta. En determinadas modalidades, la estructura cerebral es el tronco encefálico, caudado, corteza cerebelosa, corteza cerebral, epéndimo, globo pálido, hipocampo, meninges, nervio óptico, putamen, médula espinal, sustancia negra, núcleos subtalámicos, tálamo o células endoteliales. En determinadas modalidades, el péptido de direccionamiento es ERDRTRG (SEQ ID NO: 3).

En determinadas modalidades, el vector viral es un vector viral adenoasociado (AAV). En determinadas modalidades, el AAV se deriva del AAV1. Una secuencia de proteína de cápside del AAV1 de referencia de tipo silvestre de ejemplo se proporciona en la SEQ ID NO: 1, que no transduce el epéndimo en ningún grado apreciable después del parto en el CSF. En determinados aspectos, el péptido de direccionamiento se inserta en la posición 590 de la cápside del AAV1. Una secuencia de proteína de la cápside del AAV1 modificada de ejemplo se proporciona en la SEQ ID NO: 4, que muestra la inserción del péptido de direccionamiento después de la posición 590 como SSAX₇AS, donde la SSA principal y las AS posteriores son secuencias enlazadoras y X7 representa el péptido de direccionamiento.

I. Enfermedad de Batten/Deficiencia de TPP1

En algunos aspectos, la presente divulgación puede dirigirse al uso para tratar un trastorno neurológico, tal como enfermedad de Lipofuscinosi Neuronal Ceroidea tipo 2 (CLN2) infantil tardía/enfermedad de Batten. La enfermedad de Batten es una enfermedad fatal del sistema nervioso que habitualmente comienza en la infancia, habitualmente entre los 5 y 10 años de edad. A menudo, es autosómico recesivo, un nombre común para la Lipofuscinosi Neuronal Ceroidea (NCL). Aunque la enfermedad de Batten generalmente se considera la forma juvenil de NCL (o "tipo 3"), algunos médicos usan el término enfermedad de Batten para describir todas las formas de NCL. Históricamente, los NCL se clasificaron por edad de inicio de la enfermedad como NCL infantil (INCL), NCL infantil tardía (LINCL), NCL juvenil (JNCL) o NCL adulto (ANCL). Se han identificado al menos 20 genes asociados con la enfermedad de Batten, pero la NCL juvenil, la forma más prevalente de la enfermedad de Batten, se ha relacionado con mutaciones en el gen CLN3.

La enfermedad de Batten es una enfermedad terminal. Brineura es el primer tratamiento aprobado por la FDA para retrasar la pérdida de la capacidad de caminar (deambulaci3n) en pacientes pediátricos sintomáticos de 3 años de edad o más con Lipofuscinosi Neuronal Ceroidea tipo 2 (CLN2) infantil tardía, también conocida como deficiencia de tripeptidil peptidasa-1 (TPP1). TPP1, también conocida como proteasa insensible a la pepstatina lisosómica, es una enzima que en humanos est3 codificada para el gen TPP1. Las mutaciones en el gen TPP1 conducen a la Lipofuscinosi Neuronal Ceroidea infantil tardía. El gen humano TPP1 codifica para un miembro de la familia de sedolisina de serina proteasas. El gen humano tiene 13 exones y se localiza en la banda cromosómica 11p15.

La secuencia de ácid3 nucleic3 de TPP1 humano se expone como SEQ ID NO: 4. La TPP1 humana comprende actividad de tripeptidil peptidasa I (actividad de la enzima TPP1). La actividad de TPP1 comprende una actividad de peptidasa lisosómica no específica que genera tripéptidos a partir de los productos de degradaci3n producidos por las proteinasas lisosómicas. Los estudios de especificidad de sustrato indican que TPP1 escinde principalmente tripéptidos de extremos amino no sustituidos en péptidos y proteínas. El TPP1 expresado endógenamente se sintetiza como una enzima catalíticamente inactiva. Después de dirigirse a los lisosomas, debido al entorno ácid3, TPP1 se procesa autocatalíticamente en una enzima activa madura. La actividad de TPP1 se puede medir y/o cuantificar *in vitro* usando métodos conocidos. Ver, por ejemplo, Junaid et al., 1999.

El TPP1 humano tiene un tamaño de 61 kDa y est3 compuesto por 563 aminoácidos.

Se genera una isoforma de 34,5 kDa y 320 aminoácidos mediante corte y empalme alternativo y falta un fragmento peptídico de 1-243 aminoácidos. TPP1 contiene una estructura globular con un pliegue similar a la subtilisina, una tríada catalítica Ser 475-Glu 272-Asp 360. También contiene un sitio de unión a Ca^{2+} coordinado octaédricamente que son rasgos característicos de la familia de peptidasas de sedolisina S53. A diferencia de otras peptidasas S53, tiene restricciones estéricas en el bolsillo del sustrato P4, lo que podría contribuir a su escisión preferencial de tripéptidos del extremo N no sustituido de las proteínas. Dos conformaciones alternativas del Asp276 catalítico están asociadas con el estado de activación de TPP1.

La alta expresión de TPP1 se encuentra en la médula ósea, la placenta, los pulmones, la pineal y los linfocitos. La proteasa funciona en el lisosoma para escindir tripéptidos N-terminales de sustratos y tiene una actividad endopeptidasa más débil. Se sintetiza como una enzima catalíticamente inactiva que se activa y autoproteoliza tras la acidificación.

Las lipofuscinoses neuronales ceroides (NCL) son un grupo de trastornos neurodegenerativos hereditarios con fenotipos patológicos que presentan lipopigmentos autofluorescentes en las neuronas y otros tipos de células. Durante las últimas dos décadas, la evidencia acumulada indica que los NCL son provocados por mutaciones en ocho genes diferentes, incluidos los genes que codifican para varias proteínas solubles (catepsina D, PPT1 y TPP1). Las mutaciones del gen TPP1 dan como resultado lipofuscinoses neuronal ceroides infantiles tardías que se asocia con la incapacidad de degradar neuropéptidos específicos y una subunidad de ATP sintasa en el lisosoma. Las mutaciones en el gen TPP1 conducen a la lipofuscinoses neuronal ceroides infantil tardía, una enfermedad neurodegenerativa fatal de la infancia. Se ha demostrado que una inyección individual de implantación intravítrea de células madre autólogas derivadas de médula ósea transducidas con una construcción de expresión de TPP1 en una etapa temprana de la progresión de la enfermedad podría inhibir sustancialmente el desarrollo de déficits de función retiniana relacionados con la enfermedad y cambios estructurales. Este resultado implica que la terapia génica ex vivo usando células madre autólogas puede ser un medio efectivo para lograr la administración sostenida de compuestos terapéuticos a tejidos tal como la retina para los cuales la administración sistémica sería inefectiva.

En algunas modalidades, TPP1 puede estar bajo el control de un promotor, tal como un potenciador temprano de CMV/promotor de β actina de pollo (CAG). El promotor CAG es un promotor sintético fuerte que se usa con frecuencia para impulsar altos niveles de expresión génica en vectores de expresión de mamíferos. El promotor CAG se construyó a

partir de las siguientes secuencias:

(C) el elemento potenciador temprano del citomegalovirus (CMV),

(A) el promotor, el primer exón y el primer intrón del gen de beta-actina de pollo,

(G) el aceptor de empalme del gen de beta-globina de conejo

5 El elemento sintético resultante se usó en el vector de expresión pCAGGS. El codón de iniciación ubicado en la región proximal del segundo exón se alteró mediante digestión con la enzima de restricción NcoI y reemplazando el sitio con un enlazador HindIII. Aunque la construcción completa se conoce comúnmente como el "promotor CAG", incluye una parte de la secuencia transcrita (el primer exón y el primer intrón del gen de la beta-actina de pollo) y
10 elementos potenciadores. Además del potenciador temprano inmediato del CMV, el intrón del gen de la beta actina de pollo contiene un elemento potenciador, que está altamente conservado entre los vertebrados. La porción 3' del promotor tiene un alto contenido de GC y, por lo tanto, es refractaria a la amplificación por PCR.

II. Vectores de virus adenoasociados (AAV)

15 El virus adenoasociado (AAV) es un pequeño virus no patógeno de la familia Parvoviridae. Hasta la fecha, se han identificado numerosos AAV serológicamente distintos, y se han aislado más de una docena de humanos o primates. El AAV se distingue de otros miembros de esta familia por su dependencia de un virus auxiliar para la replicación.

Los genomas del AAV pueden existir en un estado extracromosómico sin integrarse
20 en los genomas celulares del huésped; poseen una amplia gama de huéspedes; transducen células en división y no en división *in vitro* e *in vivo* y mantienen altos niveles de expresión de los genes transducidos. Las partículas virales del AAV son estables al calor; resistentes a solventes, detergentes, cambios en el pH y la temperatura; y se pueden purificar en columna y/o concentrar en gradientes de CsCl o por otros medios. El genoma del AAV comprende un
25 ácido desoxirribonucleico de hebra individual (ADNhi), con detección positiva o negativa. El genoma de aproximadamente 4,7 kb del AAV consiste en un segmento de ADN de hebra individual de polaridad positiva o negativa. Los extremos del genoma son repeticiones terminales invertidas (ITR) cortas que pueden plegarse en estructuras de horquilla y servir como origen de la replicación del ADN viral.

30 Un "genoma" de AAV se refiere a una secuencia de ácido nucleico recombinante que

finalmente se empaqueta o encapsula para formar una partícula del AAV. Una partícula del AAV a menudo comprende un genoma del AAV empaquetado con proteínas de la cápside del AAV. En los casos en que se usan plásmidos recombinantes para construir o fabricar vectores recombinantes, el genoma del vector del AAV no incluye la porción del "plásmido" que no
5 corresponde a la secuencia del genoma del vector del plásmido recombinante. Esta porción del genoma no vectorial del plásmido recombinante se denomina "estructura principal del plásmido", que es importante para la clonación y amplificación del plásmido, un proceso que es necesario para la propagación y producción del plásmido, pero que no está empaquetado o encapsulado en partículas virales. Por lo tanto, un "genoma" de vector del AAV se refiere a
10 ácido nucleico que se empaqueta o encapsula por proteínas de la cápside del AAV.

El virión (partícula) de AAV es una partícula icosaédrica sin envoltura de aproximadamente 25 nm de diámetro que comprende una cápside del AAV. La partícula del AAV comprende una simetría icosaédrica compuesta por tres proteínas de la cápside relacionadas, VP1, VP2 y VP3, que interactúan conjuntamente para formar la cápside. El
15 genoma de la mayoría de los AAV nativos a menudo contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF), a veces denominados ORF izquierdo y ORF derecho. El ORF derecho a menudo codifica para las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3. Estas proteínas a menudo se encuentran en una proporción de 1:1:10 respectivamente, pero pueden estar en proporciones variadas y todas derivan del ORF derecho. Las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3
20 difieren entre sí por el uso de corte y empalme alternativo y un codón de inicio inusual. El análisis de delección ha demostrado que la remoción o alteración de VP1 que se traduce a partir de un mensaje empalmado alternativamente da como resultado un rendimiento reducido de partículas infecciosas. Las mutaciones dentro de la región codificante de VP3 dan como resultado la falta de producción de ADN de progenie de hebra individual o partículas
25 infecciosas. En determinadas modalidades, el genoma de una partícula del AAV codifica para uno, dos o los tres polipéptidos VP1, VP2 y VP3.

El ORF izquierdo a menudo codifica para las proteínas Rep no estructurales, Rep 40, Rep 52, Rep 68 y Rep 78, que están involucradas en la regulación de la replicación y la transcripción además de la producción de genomas de progenie de hebra individual. Dos de
30 las proteínas Rep se han asociado con la integración preferencial de los genomas del AAV en una región del brazo q del cromosoma 19 humano. Se ha demostrado que Rep68/78 posee actividad de unión a NTP, así como actividades de ADN y ARN helicasa. Algunas proteínas Rep poseen una señal de localización nuclear, así como varios sitios potenciales de fosforilación. En determinadas modalidades, el genoma de un AAV (por ejemplo, un rAAV)

codifica para algunas o todas las proteínas Rep. En determinadas modalidades, el genoma de un AAV (por ejemplo, un rAAV) no codifica para las proteínas Rep. En determinadas modalidades, una o más de las proteínas Rep se pueden administrar en trans y, por lo tanto, no se incluyen en una partícula del AAV que comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido.

Los extremos del genoma de AAV comprenden repeticiones terminales invertidas (ITR) cortas que tienen el potencial de plegarse en estructuras de horquilla en forma de T que sirven como origen de la replicación del ADN viral. Por consiguiente, el genoma de un AAV comprende una o más (por ejemplo, un par de) secuencias de ITR que flanquean un genoma de ADN viral de cadena individual. Las secuencias de ITR a menudo tienen una longitud de aproximadamente 145 bases cada una. Dentro de la región ITR, se han descrito dos elementos que se cree que son fundamentales para la función de la 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 la ITR está en una conformación lineal o en horquilla. Se cree que esta unión posiciona a Rep68/78 para la escisión en el trs que se presenta de una manera específica del sitio y la cadena. Además de su papel en la replicación, estos dos elementos parecen ser fundamentales para la integración viral. Dentro del locus de integración del cromosoma 19 se encuentra un sitio de unión a Rep con un trs adyacente. Se ha demostrado que estos elementos son funcionales y necesarios para la integración específica del locus.

El término "recombinante", como un modificador de vector, tal como vectores virales recombinantes, por ejemplo, lentivirus o parvovirus (por ejemplo, AAV), así como un modificador de secuencias tal como secuencias de ácido nucleico y polipéptidos recombinantes, significa que las composiciones se han manipulado (es decir, modificado genéticamente) de una manera que generalmente no se presenta en la naturaleza. Un ejemplo particular de un vector recombinante, tal como un vector AAV, retroviral o lentiviral, sería cuando una secuencia de ácido nucleico que normalmente no está presente en el genoma viral de tipo silvestre se inserta dentro del genoma viral. Un ejemplo de una secuencia de ácido nucleico recombinante sería cuando un ácido nucleico (por ejemplo, un gen) codifica para un ARN inhibidor clonado en un vector, con o sin regiones 5', 3' y/o intrón en las que el gen está normalmente asociado dentro del genoma viral. Aunque el término "recombinante" no siempre se usa en la presente con referencia a vectores, tal como vectores virales, así como secuencias tal como polinucleótidos, las formas "recombinantes" que incluyen secuencias de ácido nucleico, polinucleótidos, transgenes, etc. se incluyen expresamente a pesar de cualquier omisión de este tipo.

Un "vector" viral recombinante se deriva del genoma de tipo silvestre de un virus mediante el uso de métodos moleculares para remover parte del genoma de tipo silvestre del virus y reemplazarlo con un ácido nucleico no nativo, tal como una secuencia de ácido nucleico. Habitualmente, por ejemplo, para AAV, una o ambas secuencias de repetición terminal invertida (ITR) del genoma del AAV se retienen en el vector del AAV recombinante. Un vector viral "recombinante" (por ejemplo, rAAV) se distingue de un genoma viral (por ejemplo, AAV), ya que parte del genoma viral se ha reemplazado con una secuencia no nativa con respecto al ácido nucleico genómico viral, tal como un ácido nucleico que codifica para un transactivador o ácido nucleico que codifica para un ARN inhibidor o ácido nucleico que codifica para una proteína terapéutica. Por lo tanto, la incorporación de estas secuencias de ácido nucleico no nativas define el vector viral como un vector "recombinante", que en el caso del AAV se puede denominar "vector rAAV".

En determinadas modalidades, un AAV (por ejemplo, un rAAV) comprende dos ITR. En determinadas modalidades, un AAV (por ejemplo, un rAAV) comprende un par de ITR. En determinadas modalidades, un AAV (por ejemplo, un rAAV) comprende un par de ITR que flanquean (es decir, están en cada extremo 5' y 3') de una secuencia de ácido nucleico que al menos codifica para un polipéptido que tiene función o actividad.

Un vector del AAV (por ejemplo, vector de rAAV) se puede empaquetar y se denomina en la presente "partícula del AAV" para la posterior infección (transducción) de una célula, ex vivo, *in vitro* o *in vivo*. Cuando un vector del AAV recombinante está encapsulado o empaquetado en una partícula del AAV, la partícula también puede denominarse "partícula de rAAV". En determinadas modalidades, una partícula del AAV es una partícula de rAAV. Una partícula de rAAV a menudo comprende un vector de rAAV, o una porción del mismo. Una partícula de rAAV puede ser una o más partículas de rAAV (por ejemplo, una pluralidad de partículas del AAV). Las partículas de rAAV habitualmente comprenden proteínas que encapsulan o empaquetan el genoma del vector de rAAV (por ejemplo, proteínas de la cápside). Se observa que la referencia a un vector de rAAV también se puede usar para hacer referencia a una partícula de rAAV.

Se puede usar cualquier partícula del AAV adecuada (por ejemplo, partícula de rAAV) para un método o uso en la presente. Una partícula de rAAV y/o genoma comprendido en esta, se puede derivar de cualquier serotipo o cepa adecuada del AAV. Una partícula de rAAV, y/o genoma comprendido en esta, puede derivar de dos o más serotipos o cepas del AAV. Por consiguiente, un rAAV puede comprender proteínas y/o ácidos nucleicos, o porciones de

los mismos, de cualquier serotipo o cepa del AAV, en donde la partícula del AAV es adecuada para la infección y/o transducción de una célula de mamífero. Los ejemplos no limitantes de serotipos del AAV incluyen AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-rh74, AAV-rh10 y AAV-2i8.

5 En determinadas modalidades, una pluralidad de partículas de rAAV comprende partículas de, o derivadas de, la misma cepa o serotipo (o subgrupo o variante). En determinadas modalidades, una pluralidad de partículas de rAAV comprende una mezcla de dos o más partículas de rAAV diferentes (por ejemplo, de diferentes serotipos y/o cepas).

10 Como se usa en la presente, el término "serotipo" es una distinción usada para hacer referencia a un AAV que tiene una cápside que es serológicamente distinta de otros serotipos del AAV. El carácter distintivo serológico se determina sobre la base de la falta de reactividad cruzada entre los anticuerpos contra un AAV en comparación con otro AAV. Estas diferencias de reactividad cruzada generalmente se deben a diferencias en las secuencias de proteínas de la cápside/determinantes antigénicos (por ejemplo, debido a las diferencias de secuencia
15 de VP1, VP2 y/o VP3 de los serotipos del AAV). A pesar de la posibilidad de que las variantes del AAV que incluyen variantes de la cápside pueden no ser serológicamente distintas de un AAV de referencia u otro serotipo del AAV, difieren en al menos un residuo de nucleótido o aminoácido en comparación con el serotipo del AAV de referencia u otro.

20 En determinadas modalidades, un vector de rAAV basado en un primer genoma de serotipo corresponde al serotipo de una o más de las proteínas de la cápside que empaquetan el vector. Por ejemplo, el serotipo de uno o más ácidos nucleicos del AAV (por ejemplo, ITR) que comprende el genoma del vector del AAV corresponde al serotipo de una cápside que comprende la partícula de rAAV.

25 En determinadas modalidades, un genoma de vector de rAAV puede basarse en un genoma de serotipo del AAV (por ejemplo, AAV2) distinto del serotipo de una o más de las proteínas de la cápside del AAV que empaquetan el vector. Por ejemplo, un genoma de vector de rAAV puede comprender ácidos nucleicos derivados del AAV1 (por ejemplo, ITR), mientras que al menos una o más de las tres proteínas de la cápside se derivan de un serotipo diferente, por ejemplo, un serotipo del AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10,
30 AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 o una variante de los mismos.

 En determinadas modalidades, una partícula de rAAV o un genoma de vector de la misma relacionada con un serotipo de referencia tiene un polinucleótido, polipéptido o

subsecuencia del mismo que comprende o consiste en una secuencia al menos 60% o más (por ejemplo, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, etc.) idéntica a un polinucleótido, polipéptido o subsecuencia de una partícula del AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 o AAV-2i8. En modalidades particulares, una partícula de rAAV o un genoma de vector de la misma relacionado con un serotipo de referencia tiene una secuencia de cápside o ITR que comprende o consiste en una secuencia al menos 60% o más (por ejemplo, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, etc.) idéntica a una secuencia de cápside o ITR de un serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 o AAV-2i8.

En determinadas modalidades, un método en la presente comprende el uso, administración o suministro de una partícula de rAAV1, rAAV2, rAAV3, rAAV4, rAAV5, rAAV6, rAAV7, rAAV8, rAAV9, rAAV10, rAAV11, rAAV12, rRh10, rRh74 o rAAV-2i8.

En determinadas modalidades, un método en la presente comprende el uso, la administración o el suministro de una partícula de rAAV1. En determinadas modalidades, una partícula de rAAV1 comprende una cápside del AAV1. En determinadas modalidades, una partícula de rAAV1 comprende una o más proteínas de la cápside (por ejemplo, VP1, VP2 y/o VP3) que son al menos 60%, 65%, 70%, 75% o más idénticas, por ejemplo, 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, etc., hasta 100% idénticas a una proteína de la cápside correspondiente de una partícula del AAV1 natural o de tipo silvestre. En determinadas modalidades, una partícula de rAAV1 comprende proteínas de la cápside de VP1, VP2 y VP3 que son al menos 75% o más idénticas, por ejemplo, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, etc., hasta 100% idénticas a una proteína de la cápside correspondiente de una partícula del AAV1 nativa o de tipo silvestre. En determinadas modalidades, una partícula de rAAV2 es una variante de una partícula del AAV1 natural o de tipo silvestre. En algunos aspectos, una o más proteínas de la cápside de una variante del AAV2 tienen 1, 2, 3, 4, 5, 5-10, 10-15, 15-20 o más sustituciones de aminoácidos en comparación con las proteínas de la cápside de una partícula del AAV1 nativa o de tipo silvestre.

En determinadas modalidades, una partícula de rAAV comprende una o dos ITR (por ejemplo, un par de ITR) que son al menos 75% o más idénticos, p. ej., 80%, 85%, 85%, 87%,

88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, etc., hasta 100% idéntico a las ITR correspondientes de un AAV1 nativo o de tipo silvestre, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-rh74, AAV-rh10 o AAV-2i8, siempre que conserven una o más funciones ITR deseadas (por ejemplo, capacidad de formar una horquilla, que permite la replicación del ADN; integración del ADN del AAV en el genoma de una célula huésped; y/o empaquetamiento, si se desea).

En determinadas modalidades, una partícula de rAAV1 comprende una o dos ITR (por ejemplo, un par de ITR) que son al menos 75% o más idénticas, por ejemplo, 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, etc., hasta 100% idénticas a las ITR correspondientes de una partícula del AAV1 nativa o de tipo silvestre, siempre que conserven una o más funciones ITR deseadas (por ejemplo, capacidad para formar una horquilla, que permite la replicación del ADN; integración del ADN del AAV en un genoma de célula hospedadora; y/o empaquetamiento, si se desea).

Una partícula de rAAV puede comprender una ITR que tenga cualquier cantidad adecuada de repeticiones de "GAGC". En determinadas modalidades, una ITR de una partícula del AAV2 comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más repeticiones de "GAGC". En determinadas modalidades, una partícula de rAAV2 comprende una ITR que comprende tres repeticiones de "GAGC". En determinadas modalidades, una partícula de rAAV2 comprende una ITR que tiene menos de cuatro repeticiones de "GAGC". En determinadas modalidades, una partícula de rAAV2 comprende una ITR que tiene más de cuatro repeticiones de "GAGC". En determinadas modalidades, una ITR de una partícula de rAAV2 comprende un sitio de unión a Rep en donde el cuarto nucleótido en las primeras dos repeticiones de "GAGC" es una C en lugar de una T.

Se puede incorporar una longitud de ADN adecuada de ejemplo en vectores de rAAV para empaquetamiento/encapsidación en una partícula de rAAV de aproximadamente 5 kilobases (kb) o menos. En particular, las modalidades, la longitud del ADN es menor que aproximadamente 5 kb, menor que aproximadamente 4,5 kb, menor que aproximadamente 4 kb, menor que aproximadamente 3,5 kb, menor que aproximadamente 3 kb o menor que aproximadamente 2,5 kb.

Los vectores de rAAV que incluyen una secuencia de ácido nucleico que dirige la expresión de un ARNi o polipéptido se pueden generar usando técnicas recombinantes

adecuadas conocidas en la técnica (por ejemplo, ver Sambrook et al., 1989). Los vectores del AAV recombinantes se empaquetan habitualmente en partículas del AAV competentes para la transducción y se propagan usando un sistema de empaquetamiento viral del AAV. Una partícula del AAV competente para la transducción es capaz de unirse y entrar en una célula de mamífero y posteriormente administrar una carga de ácido nucleico (por ejemplo, un gen heterólogo) al núcleo de la célula. Por lo tanto, una partícula de rAAV intacta que es competente para la transducción se configura para transducir una célula de mamífero. Una partícula de rAAV configurada para transducir una célula de mamífero a menudo no es competente para la replicación y requiere maquinaria proteica adicional para autorreplicarse. Por lo tanto, una partícula de rAAV que está configurada para transducir una célula de mamífero se modifica genéticamente para unirse e ingresar a una célula de mamífero y administrar un ácido nucleico a la célula, en donde el ácido nucleico para la administración a menudo se coloca entre un par de ITR del AAV en el genoma de rAAV.

Las células hospedadoras adecuadas para producir partículas del AAV competentes para la transducción incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, células de levadura, células de insecto y células de mamífero que se pueden usar, o se han usado, como receptores de vectores de rAAV heterólogos. Se pueden usar células de la línea celular humana estable, HEK293 (fácilmente disponible a través de, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo con el Número de Acceso ATCC CRL1573). En determinadas modalidades, se usa una línea celular de riñón embrionario humano modificado (por ejemplo, HEK293), que se transforma con fragmentos de ADN de adenovirus tipo 5 y expresa los genes adenovirales E1a y E1b para generar partículas del AAV recombinantes. La línea celular HEK293 modificada se transfecta fácilmente y proporciona una plataforma particularmente conveniente en la que producir partículas de rAAV. Los métodos para generar partículas del AAV de título alto capaces de transducir células de mamífero se conocen en la técnica.

En determinadas modalidades, las funciones auxiliares del AAV se introducen en la célula hospedadora transfectando la célula hospedadora con una construcción auxiliar del AAV antes de, o simultáneamente con, la transfección de un vector de expresión del AAV. Por lo tanto, a veces se usan construcciones auxiliares del AAV para proporcionar al menos una expresión transitoria de los genes rep y/o cap del AAV para complementar las funciones del AAV faltantes necesarias para la transducción productiva del AAV. Las construcciones auxiliares del AAV a menudo carecen de ITR del AAV y no pueden replicarse ni empaquetarse. Estas construcciones pueden estar en forma de un plásmido, fago, transposón, cósmido, virus o virión. Se han descrito varias construcciones auxiliares del AAV, tal como los plásmidos

comúnmente usados pAAV/Ad y pIM29+45 que codifican para los productos de expresión Rep y Cap. Se conocen varios otros vectores que codifican para productos de expresión Rep y/o Cap.

III. AAV-TPP1 como agente terapéutico

5 En algunas modalidades, los métodos de transferencia génica viral se pueden usar para introducir ácidos nucleicos en células de mamífero. Estos métodos se pueden usar para administrar ácidos nucleicos que codifican para proteínas terapéuticas a células en cultivo o en un organismo hospedador. En algunas modalidades, las proteínas terapéuticas pueden ser útiles para el tratamiento de la enfermedad de Batten/lipofuscinoses neuronal ceroida tipo 2
10 (CLN2) infantil tardía. Algunas modalidades pueden referirse a la expresión de un polipéptido que comprende actividad de tripeptidil peptidasa 1 (TPP1).

Un polipéptido que comprende actividad de TPP1 se refiere a una proteína TPP1 de un mamífero, o una porción de la misma, que muestra al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o
15 aproximadamente 100% de la actividad de peptidasa de la TPP1 humana de la SEQ ID NO: 4 como se ensayó usando un sustrato peptídico adecuado, por ejemplo, como se ensayó mediante el método de Junaid et al., 1999 u otro método comparable. En determinadas modalidades, un polipéptido que comprende actividad de TPP1 se refiere a una proteína TPP1 de un mamífero, o una subsecuencia o variante de la misma, que muestra al menos 50%, al
20 menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o aproximadamente 100% de la actividad de peptidasa de la TPP1 humana de la SEQ ID NO: 4.

Un polipéptido que comprende actividad de TPP1 puede comprender una forma truncada, mutada, quimérica o modificada de un polipéptido de TPP1 que retiene al menos
25 actividad parcial de TPP1. Un polipéptido que comprende actividad de TPP1 puede comprender una proteína TPP1, o una porción de la misma, obtenida de cualquier organismo adecuado (por ejemplo, de un mamífero, de un humano, de un mamífero no humano, por ejemplo, de un perro, cerdo, vaca o similar). En determinadas modalidades, un polipéptido que comprende actividad de TPP1 tiene al menos 60% de identidad, al menos 70% de
30 identidad, al menos 75% de identidad, al menos 80% de identidad, al menos 85% de identidad, al menos 90% de identidad, al menos 95% de identidad, al menos 98% de identidad o 100% de identidad con la TPP1 codificada por la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4.

En determinadas modalidades, una partícula del AAV comprende una proteína de la cápside del AAV y un ácido nucleico que codifica para un polipéptido que comprende actividad de TPP1. En determinadas modalidades, una partícula del AAV comprende una proteína de la cápside del AAV y un ácido nucleico que dirige la expresión y/o secreción de un polipéptido que comprende actividad de TPP1. En determinadas modalidades, una partícula del AAV comprende una proteína de la cápside del AAV y un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de TPP1, o una porción enzimáticamente activa del mismo. En determinadas modalidades, una partícula del AAV comprende una proteína de la cápside del AAV y un ácido nucleico que dirige la expresión y/o secreción de un polipéptido TPP1, o una porción enzimáticamente activa del mismo. En determinadas modalidades, una partícula del AAV comprende un polipéptido que tiene al menos 50% de identidad, al menos 60% de identidad, al menos 70% de identidad, al menos 75% de identidad, al menos 80% de identidad, al menos 85% de identidad, al menos 90% de identidad, al menos 95% de identidad, al menos 98% de identidad o 100% de identidad con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5. En determinadas modalidades, un ácido nucleico que se administra codifica para TPP1, una TPP1 que tiene una identidad sustancial con la TPP1 de tipo silvestre y/o una variante, mutante o fragmento de una TPP1. En determinadas modalidades, un ácido nucleico que codifica para una actividad de TPP1 o que codifica para o dirige la expresión de un polipéptido de TPP1 es un ácido nucleico que tiene al menos 50% de identidad, al menos 60% de identidad, al menos 70% de identidad, al menos 75% de identidad, al menos 80% de identidad, al menos 85% de identidad, al menos 90% de identidad, al menos 95% de identidad, al menos 98% de identidad o 100% de identidad con el ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 4.

Los polipéptidos de TTP1 recombinantes pueden poseer deleciones y/o sustituciones de aminoácidos; por lo tanto, una proteína con una delección, una proteína con una sustitución y una proteína con una delección y una sustitución son proteínas modificadas. En algunas modalidades, estas proteínas pueden incluir además inserciones o aminoácidos adicionados, tal como con proteínas de fusión o proteínas con enlazadores, por ejemplo. Una "proteína eliminada modificada" carece de uno o más residuos de la proteína nativa, pero puede poseer la especificidad y/o actividad de la proteína nativa.

Las variantes de sustitución o reemplazo habitualmente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína y pueden diseñarse para modular una o más propiedades del polipéptido, particularmente sus funciones efectoras y/o biodisponibilidad. Las sustituciones pueden o no ser conservadoras, es decir, un aminoácido se reemplaza con uno de forma y carga similares. Las sustituciones conservadoras son bien

conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina, leucina, o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina.

Además de una delección o sustitución, una proteína modificada puede poseer una inserción de residuos, que habitualmente implica la adición de al menos un residuo en el polipéptido. Esto puede incluir la inserción de un péptido o polipéptido de direccionamiento o simplemente un residuo individual.

El término "equivalente biológicamente funcional" se entiende bien en la técnica y se define adicionalmente en detalle en la presente. Por consiguiente, se incluyen secuencias que tienen entre aproximadamente 70% y aproximadamente 80%, o entre aproximadamente 81% y aproximadamente 90%, o incluso entre aproximadamente 91% y aproximadamente 99% de aminoácidos que son idénticos o funcionalmente equivalentes a los aminoácidos de un polipéptido de control, siempre que se mantenga la actividad biológica de la proteína. Una proteína recombinante puede ser biológicamente funcional equivalente a su contraparte nativa en determinados aspectos.

También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico pueden incluir residuos adicionales, tal como aminoácidos N- o C-terminales adicionales o secuencias 5' o 3', y aún así ser esencialmente como se expone en una de las secuencias divulgadas en la presente, siempre que la secuencia cumpla con los criterios expuestos anteriormente, incluido el mantenimiento de la actividad biológica de la proteína en lo que respecta a la expresión de la proteína. La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a secuencias de ácido nucleico que pueden, por ejemplo, incluir diversas secuencias no codificantes que flanquean cualquiera de las porciones 5' o 3' de la región codificante o pueden incluir diversas secuencias internas, es decir, intrones, que se sabe que se producen dentro de los genes.

IV. Métodos de Administración

Los vectores virales, en algunos aspectos, se pueden administrar directamente a los pacientes (*in vivo*) o se pueden usar para tratar células *in vitro* o *ex vivo*, y luego se pueden administrar a los pacientes. El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico

portadora pequeña, un plásmido, virus (por ejemplo, vector del AAV) u otro vehículo que puede manipularse mediante inserción o incorporación de un ácido nucleico. Los vectores, tal como vectores virales, se pueden usar para introducir/transferir secuencias de ácido nucleico en las células, de modo que la secuencia de ácido nucleico en estas se transcriba y, si codifica para una proteína, posteriormente se traduzca por las células.

Se puede administrar o tratar cualquier célula o mamífero adecuado mediante un método o uso descrito en la presente. Habitualmente, se sospecha que un mamífero que necesita un método descrito en la presente tiene o expresa una proteína anormal o aberrante que está asociada con un estado de enfermedad. De manera alternativa, el receptor mamífero puede tener una condición que es susceptible a la terapia de reemplazo génico. Como se usa en la presente, "terapia de reemplazo génico" se refiere a la administración al receptor de material genético exógeno que codifica para un agente terapéutico y la posterior expresión del material genético administrado in situ. Por lo tanto, la frase "condición susceptible de terapia de reemplazo génico" abarca condiciones tal como enfermedades genéticas (es decir, una condición de enfermedad que es atribuible a uno o más defectos genéticos), patologías adquiridas (es decir, una condición patológica que no es atribuible a un defecto congénito), cánceres y procesos profilácticos (es decir, prevención de una enfermedad o de una condición médica no deseada). Por consiguiente, tal como se usa en la presente, el término "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente o material, que tiene un efecto benéfico en el receptor mamífero. Por lo tanto, "agente terapéutico" abarca moléculas tanto terapéuticas como profilácticas que tienen componentes de ácido nucleico o proteína.

Los ejemplos no limitantes de mamíferos incluyen humanos, primates no humanos (por ejemplo, simios, gibones, chimpancés, orangutanes, monos, macacos y similares), animales domésticos (por ejemplo, perros y gatos), animales de granja (por ejemplo, caballos, vacas, cabras, ovejas, cerdos) y animales experimentales (por ejemplo, ratón, rata, conejo, conejillo de indias). En determinadas modalidades, un mamífero es un ser humano. En determinadas modalidades, un mamífero es un mamífero no roedor (por ejemplo, humano, cerdo, cabra, oveja, caballo, perro o similares). En determinadas modalidades, un mamífero no roedor es un ser humano. Un mamífero puede tener cualquier edad o estar en cualquier etapa de desarrollo (por ejemplo, un adulto, adolescente, niño, bebé o un mamífero en el útero). Un mamífero puede ser macho o hembra. En determinadas modalidades, un mamífero puede ser un modelo de enfermedad animal, por ejemplo, modelos animales que tienen o expresan una proteína anormal o aberrante que está asociada con un estado de enfermedad o modelos animales con expresión insuficiente de una proteína, que provoca un estado de

enfermedad.

Los mamíferos (sujetos) tratados por un método o composición descritos en la presente incluyen adultos (18 años o más) y niños (menos de 18 años). Los adultos incluyen a los ancianos. Los adultos representativos tienen 50 años o más. Los niños varían en edad
5 de 1-2 años, o de 2-4, 4-6, 6-18, 8-10, 10-12, 12-15 y 15-18 años. Los niños también incluyen bebés. Los bebés suelen tener entre 1 y 12 meses de edad.

En determinadas modalidades, un método incluye administrar una pluralidad de partículas virales a un mamífero como se expone en la presente, donde la gravedad, frecuencia, progresión o tiempo de inicio de uno o más síntomas de un estado de enfermedad,
10 tal como una enfermedad neurodegenerativa, disminuyó, se redujo, se previno, se inhibió o se retrasó. En determinadas modalidades, un método incluye administrar una pluralidad de partículas virales a un mamífero para tratar un síntoma adverso de un estado de enfermedad, tal como una enfermedad neurodegenerativa. En determinadas modalidades, un método incluye administrar una pluralidad de partículas virales a un mamífero para estabilizar, retrasar
15 o prevenir el empeoramiento, o la progresión, o revertir y síntomas adversos de un estado de enfermedad, tal como una enfermedad neurodegenerativa.

En determinadas modalidades, un método incluye administrar una pluralidad de partículas virales al sistema nervioso central, o una porción del mismo como se expone en la presente, de un mamífero y la gravedad, frecuencia, progresión o tiempo de inicio de uno o
20 más síntomas de un estado de enfermedad, tal como una enfermedad neurodegenerativa, se reducen, reducen, previenen, inhiben o retrasan en al menos aproximadamente 5 a aproximadamente 10, aproximadamente 10 a aproximadamente 25, aproximadamente 25 a aproximadamente 50, o aproximadamente 50 a aproximadamente 100 días.

En determinadas modalidades, un síntoma o efecto adverso comprende un síntoma
25 en etapa temprana, media o tardía; un síntoma de comportamiento, personalidad o lenguaje; síntoma de deglución, movimiento, convulsión, temblor o inquietud; ataxia; y/o un síntoma cognitivo tal como memoria, capacidad de organización.

En determinadas modalidades, un método incluye administrar o suministrar partículas del AAV-TPP1 a un mamífero y administrar uno o más agentes inmunosupresores al
30 mamífero. En determinadas modalidades, un método incluye administrar o suministrar partículas del AAV-TPP1 a un mamífero y administrar 2, 3, 4 o más agentes inmunosupresores al mamífero. En determinadas modalidades, un método incluye administrar o suministrar

partículas del AAV-TPP1 a un mamífero y administrar dos agentes inmunosupresores al mamífero. En una modalidad representativa, un método para tratar a un mamífero incluye administrar o suministrar partículas del AAV-TPP1 a un mamífero y administrar el primer y segundo agentes inmunosupresores al mamífero.

5 Cuando se administran dos o más agentes inmunosupresores, cada agente inmunosupresor es distinto y/o diferente (por ejemplo, cada agente difiere en estructura y/o mecanismo de acción). Un "agente" se refiere a un ingrediente farmacéutico activo. En determinadas modalidades, un agente inmunosupresor es un agente antiinflamatorio. En determinadas modalidades, un agente inmunosupresor es micofenolato, o un derivado del mismo. Un ejemplo de tal derivado de micofenolato es el micofenolato mofetil (MMF). En determinadas modalidades, un agente inmunosupresor es ciclosporina o un derivado de la misma. En determinadas modalidades, un primer agente inmunosupresor comprende ciclosporina y un segundo agente inmunosupresor comprende micofenolato, o un derivado del mismo (por ejemplo, MMF). En determinadas modalidades, un primer agente
10 inmunosupresor comprende ciclosporina y un segundo agente inmunosupresor comprende MMF.
15

En determinadas modalidades, se administra un agente inmunosupresor antes, durante y/o después de la administración de partículas del AAV-TPP1 a un mamífero. En determinadas modalidades, un agente inmunosupresor se administra simultáneamente con la administración de partículas del AAV-TPP1 a un mamífero. En determinadas modalidades, se administra un agente inmunosupresor después de la administración de partículas del AAV-TPP1 a un mamífero. En determinadas modalidades, un agente inmunosupresor se administra aproximadamente 1 a aproximadamente 60 minutos después, aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas después, aproximadamente 1 a aproximadamente 100 días después, aproximadamente 1 a aproximadamente 12 meses después, o aproximadamente 1 a aproximadamente 5 años después de la administración de partículas del AAV-TPP1 a un mamífero. En determinadas modalidades, se administra un agente inmunosupresor antes de la administración de partículas del AAV-TPP1 a un mamífero. En determinadas modalidades, un agente inmunosupresor se administra aproximadamente 1 a aproximadamente 60 minutos antes, aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas antes, aproximadamente 1 a aproximadamente 100 días antes, o aproximadamente 1 a aproximadamente 3 meses antes de la administración de partículas del AAV-TPP1 a un mamífero. En determinadas modalidades, un agente inmunosupresor se administra aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5,
20
25
30

aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 días antes de la administración de partículas del AAV-TPP1 a un mamífero. En determinadas modalidades, un agente inmunosupresor se administra a intervalos predeterminados antes, durante y/o después de la administración de partículas del AAV-TPP1 a un mamífero (por ejemplo, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cada dos días, semanalmente, quincenalmente, bimensualmente, combinación de los mismos o similares).

En determinadas modalidades, un primer agente inmunosupresor se administra a un mamífero al menos aproximadamente 1 a aproximadamente 7 días antes, o aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 semanas antes de la administración de partículas del AAV-TPP1 a un mamífero y un segundo agente inmunosupresor se administra aproximadamente 1 a aproximadamente 7 días antes, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 semanas antes, durante y/o dentro de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, 19 aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400 o aproximadamente 500 días después de la administración de partículas del AAV-TPP1 al mamífero. En determinadas modalidades, la ciclosporina se administra a un mamífero al menos aproximadamente 1 a aproximadamente 7 días antes, o aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 semanas antes de la administración de partículas del AAV-TPP1 a un mamífero, y el micofenolato o un derivado del mismo (por ejemplo, MMF) se administra aproximadamente 1 a aproximadamente 7 días antes, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 semanas antes, durante y/o dentro de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400 o aproximadamente 500 días después de la administración de partículas del AAV-TPP1 al mamífero. En determinadas modalidades, la ciclosporina se administra de aproximadamente 1 a aproximadamente 7 días antes, o aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 semanas antes de la administración de partículas del AAV-TPP1 y a intervalos regulares después del tratamiento, y el micofenolato o un derivado del mismo (por ejemplo, MMF) se administra una vez de aproximadamente 1 a aproximadamente 7 días antes, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 semanas antes, durante

y/o dentro de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 días después de la administración de partículas del AAV-TPP1 al mamífero.

Se puede administrar un agente inmunosupresor a cualquier dosis adecuada. En determinadas modalidades, la ciclosporina se administra a una dosificación de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/kg, o aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg/kg a una frecuencia de una, dos o tres veces al día, a una vez cada dos días. En determinadas modalidades, la ciclosporina se administra a aproximadamente 10 mg/kg dos veces al día. En determinadas modalidades, la ciclosporina se administra a aproximadamente 10 mg/kg dos veces al día durante un período de al menos aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 meses. En determinadas modalidades, una dosificación de ciclosporina se reduce gradualmente a una dosis de menos de aproximadamente 5 mg/kg, o menos de aproximadamente 2 mg/kg de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 meses después de la administración de partículas del AAV-TPP1 a un mamífero.

En determinadas modalidades, el micofenolato o un derivado del mismo (por ejemplo, MMF), se administra a una dosificación de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 25 mg/kg, o aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/kg a una frecuencia de una, dos o tres veces al día, a una vez cada dos días. En determinadas modalidades, el micofenolato o un derivado del mismo (por ejemplo, MMF) se administra a aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mg/kg una vez al día. En determinadas modalidades, una dosificación de micofenolato o un derivado del mismo (por ejemplo, MMF) se reduce a una dosis de menos de aproximadamente 5 mg/kg, o menos de aproximadamente 2 mg/kg de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 meses después de la administración de partículas del AAV-TPP1 a un mamífero. Un agente inmunosupresor se puede formular en cualquier formulación adecuada, adecuada para una vía de administración particular. Diversas formulaciones farmacéuticamente aceptables de agentes inmunosupresores están disponibles comercialmente y son fácilmente obtenibles por un médico.

Un agente inmunosupresor se puede administrar por cualquier vía adecuada. En determinadas modalidades, un agente inmunosupresor se administra por vía oral. En determinadas modalidades, el micofenolato o un derivado del mismo, tal como Micofenolato Mofetilo (MMF), se administra por vía oral. En determinadas modalidades, la ciclosporina se

administra por vía oral. Un agente inmunosupresor también puede administrarse por vía parenteral (por ejemplo, por vía intramuscular, intravenosa, subcutánea) o administrarse mediante inyección en el cerebro, la médula espinal o una porción de los mismos (por ejemplo, inyectada en el CSF).

5 En determinadas modalidades, un método incluye administrar una o más (por ejemplo, una pluralidad de) partículas del AAV-TPP1 al sistema nervioso central de un mamífero (por ejemplo, un mamífero que tiene un LSD). En determinadas modalidades, el sistema nervioso central incluye cerebro, médula espinal y fluido cefalorraquídeo (CSF). En determinadas modalidades, un método incluye administrar una o más partículas del AAV-TPP1 al cerebro o
10 la médula espinal o el CSF de un mamífero. En determinadas modalidades, las partículas del AAV-TPP1 se administran a una porción del cerebro o la médula espinal. En determinadas modalidades, una composición que incluye partículas del AAV-TPP1 y un agente inmunosupresor se administra a la cisterna magna de un mamífero y/o al ventrículo cerebral, espacio subaracnoideo y/o espacio intratecal y/o epéndimo del mamífero. Por ejemplo, las
15 partículas del AAV-TPP1 se pueden administrar directamente a la cisterna magna, el espacio intraventricular, un ventrículo cerebral, el espacio subaracnoideo, el espacio intratecal o el epéndimo. En determinadas modalidades, un método incluye administrar una o más partículas del AAV-TPP1 al epéndimo de un mamífero.

 En determinadas modalidades, las partículas del AAV-TPP1 se administran a una o
20 más células que entran en contacto con el CSF en un mamífero, por ejemplo, al poner en contacto las células con partículas del AAV-TPP1. Los ejemplos no limitantes de células que entran en contacto con el CSF incluyen células endoteliales y/o células meníngeas. En determinadas modalidades, las partículas del AAV-TPP1 se administran a células endoteliales. En determinadas modalidades, las partículas
25 del AAV-TPP1 se administran a células endoteliales, por ejemplo, poniendo en contacto células endoteliales con partículas del AAV-TPP1.

 En determinadas modalidades, las partículas del AAV-TPP1 se administran localmente. "Suministro local" se refiere al suministro de un agente activo directamente a un sitio diana dentro de un mamífero (por ejemplo, directamente a un tejido o fluido). Por ejemplo,
30 un agente puede administrarse localmente mediante inyección directa en un órgano, tejido o ubicación anatómica específica. En determinadas modalidades, una o más partículas del AAV-TPP1 se administran o administran mediante inyección directa al cerebro, la médula espinal o un tejido o fluido del mismo (por ejemplo, CSF, tal como células endoteliales,

células piales, células endoteliales y/o células meníngeas). Por ejemplo, las partículas del AAV-TPP1 se pueden administrar directamente, por medio de inyección directa, al CSF, la cisterna magna, el espacio intraventricular, un ventrículo cerebral, el espacio subaracnoideo y/o el espacio intratecal y/o el epéndimo. En determinadas modalidades, las partículas del AAV-TPP1 se ponen en contacto con un tejido, fluido o célula del cerebro o la médula espinal mediante inyección directa en un tejido o fluido del cerebro o la médula espinal. En determinadas modalidades, las partículas del AAV-TPP1 no se administran sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular, o mediante infusión intravenosa. En determinadas modalidades, las partículas del AAV-TPP1 se administran a un tejido o fluido del cerebro o la médula espinal mediante inyección estereotáctica.

En determinadas modalidades, una o más partículas del AAV-TPP1 se administran o administran mediante inyección directa de partículas del AAV-TPP1 en el cerebro, la médula espinal o un tejido o fluido de los mismos (por ejemplo, CSF tal como el epéndimo). En un aspecto particular, las partículas del AAV-TPP transducen células ependimarias, células piales, células endoteliales y/o células meníngeas.

Como es evidente para los expertos en la técnica en vista de las enseñanzas de la presente, tal como los intervalos de dosis proporcionados en la presente, se puede determinar empíricamente una cantidad efectiva de partículas del AAV-TPP1. La administración se puede efectuar en una dosis, de forma continua o intermitente a lo largo del curso del tratamiento. Las dosis efectivas de administración pueden ser determinadas por los expertos en la técnica y pueden variar de acuerdo con el serotipo del AAV, el título viral y el peso, la condición y la especie de mamífero que se está tratando. Se pueden llevar a cabo administraciones individuales y múltiples con el nivel de dosis, la diana y el momento seleccionado por el médico tratante.

En determinadas modalidades, se administra una pluralidad de partículas del AAV-TPP1. Como se usa en la presente, una pluralidad de partículas del AAV se refiere a aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^8 partículas.

En determinadas modalidades, las partículas del AAV-TPP1 se administran a una dosis de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^{16} vg/ml en aproximadamente 1 a aproximadamente 5 ml; a una dosis de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 ml de 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{14} vg/ml; o a una dosis de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 ml de 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{13} vg/ml. En determinadas modalidades, las partículas del AAV-TPP1 se administran a una dosis de aproximadamente

1x10⁸ a aproximadamente 1x10¹⁵ vg/kg de peso corporal del mamífero que se trata. Por ejemplo, las partículas del AAV-TPP1 se pueden administrar a una dosis de aproximadamente 1x10⁸ vg/kg, aproximadamente 5x10⁸ vg/kg, aproximadamente 1x10⁹ vg/kg, aproximadamente 5x10⁹ vg/kg, aproximadamente 1x10¹⁰ vg/kg, aproximadamente 5x10¹⁰ vg/kg, aproximadamente 1x10¹¹ vg/kg, aproximadamente 5x10¹¹ vg/kg, aproximadamente 1x10¹² vg/kg, aproximadamente 5x10¹² vg/kg, aproximadamente 1x10¹³ vg/kg, aproximadamente 5x10¹³ vg/kg, aproximadamente 1x10¹⁴ vg/kg, aproximadamente 5x10¹⁴ vg/kg, o aproximadamente 1x10¹⁵ vg/kg de peso corporal del mamífero que se está tratando.

- 10 La administración de partículas del AAV-TPP1 puede ser en una o más dosis. Se pueden administrar múltiples dosis según sea necesario para mantener una actividad enzimática adecuada, por ejemplo.

V. Composiciones Farmacéuticas

- 15 Tal como se usa en la presente, el término "farmacéuticamente aceptable" y "fisiológicamente aceptable" significa una composición, formulación, líquido o sólido biológicamente aceptable, o mezcla de los mismos, que es adecuado para una o más vías de administración, administración *in vivo* o contacto. Una composición "farmacéuticamente aceptable" o "fisiológicamente aceptable" es un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable, por ejemplo, el material se puede administrar a un sujeto sin provocar efectos biológicos indeseables sustanciales. Esta composición, formulaciones y composiciones "farmacéuticamente aceptables" y "fisiológicamente aceptables" pueden ser estériles. Estas formulaciones y composiciones farmacéuticas se pueden usar, por ejemplo, en la administración de una partícula viral a un sujeto.

- 25 Estas formulaciones y composiciones incluyen disolventes (acuosos o no acuosos), soluciones (acuosas o no acuosas), emulsiones (por ejemplo, aceite en agua o agua en aceite), suspensiones, jarabes, elixires, medios de dispersión y suspensión, recubrimientos, agentes isotónicos y que promueven o retrasan la absorción, compatibles con la administración farmacéutica o el contacto o suministro *in vivo*. Los solventes, soluciones y suspensiones acuosas y no acuosas pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Los compuestos activos suplementarios (por ejemplo, conservadores, agentes antibacterianos, antivirales y antifúngicos) también se pueden incorporar en las formulaciones y composiciones.

Las composiciones farmacéuticas contienen habitualmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. Estos 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 pueda administrarse sin toxicidad indebida. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sorbitol, Tween80 y líquidos tal como agua, solución salina, glicerol y etanol. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden incluir en la misma, por ejemplo, sales de ácidos minerales tal como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tal como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Además, sustancias auxiliares, tal como tensioactivos, agentes humectantes o emulsionantes, sustancias amortiguadoras del pH y similares, pueden estar presentes en estos vehículos.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para que sean compatibles con una vía de administración o administración particular, como se expone en la presente o es conocida por un experto en la técnica. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas incluyen portadores, diluyentes o excipientes adecuados para la administración o administración por diversas vías.

Las formas farmacéuticas adecuadas para inyección o infusión de partículas del AAV-TPP1 pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles que se adaptan para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables o infundibles estériles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma final debe ser un fluido estéril y estable en las condiciones de fabricación, uso y almacenamiento. El portador o vehículo líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. Se pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, amortiguadores o sales (por ejemplo, cloruro de sodio). La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones o suspensiones de partículas del AAV-TPP1 pueden incluir opcionalmente los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección,

solución salina, tal como solución salina amortiguada con fosfato (PBS), CSF artificial, aceites fijos, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), glicerina u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos y antifúngicos tal como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y similares; antioxidantes tal como ácido
5 ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tal como ácido etilendiaminotetraacético; amortiguadores tal como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa.

Las formulaciones farmacéuticas, composiciones y sistemas de administración apropiados para las composiciones, métodos y usos de la divulgación se conocen en la
10 técnica (ver, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003) 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12th ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993), Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.; Ansel and Stoklosa, Pharmaceutical Calculations (2001)
15 11th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD; and Poznansky et al., 2004).

Las partículas y composiciones del AAV-TPP1 se pueden formular en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación, tal como se usa en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para un individuo a tratar; cada unidad
20 contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Las formas farmacéuticas unitarias dependen de la cantidad de partículas del AAV-TPP1 necesarias para producir los efectos deseados. La cantidad necesaria se puede formular en una dosis individual o se puede formular en múltiples unidades de dosificación. La dosis puede ajustarse
25 a una concentración de partículas del AAV-TPP1 adecuada, opcionalmente combinada con un agente antiinflamatorio, y empaquetarse para usarse.

En una modalidad, las composiciones farmacéuticas incluirán suficiente material genético para proporcionar una cantidad terapéuticamente efectiva, es decir, una cantidad suficiente para reducir o mejorar los síntomas de un estado de enfermedad en cuestión o una
30 cantidad suficiente para conferir el beneficio deseado. Las composiciones farmacéuticas contienen habitualmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. Estos 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 pueda administrarse

sin toxicidad indebida. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sorbitol, Tween80 y líquidos tal como agua, solución salina, glicerol y etanol. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden incluir en la misma, por ejemplo, sales de ácidos minerales tal como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tal como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Además, sustancias auxiliares, tal como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias amortiguadoras del pH y similares, pueden estar presentes en estos vehículos.

Una "forma de dosificación unitaria", tal como se usa en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada opcionalmente en asociación con un portador farmacéutico (excipiente, diluyente, vehículo o agente de relleno) que, cuando se administra en una o más dosis, se calcula para producir un efecto deseado (por ejemplo, efecto profiláctico o terapéutico). Las formas de dosificación unitaria pueden estar dentro de, por ejemplo, ampollas y viales, que pueden incluir una composición líquida, o una composición en un estado liofilizado o liofilizado; un portador líquido estéril, por ejemplo, se puede adicionar antes de la administración o suministro *in vivo*. Las formas de dosificación unitaria individuales se pueden incluir en kits o recipientes de dosis múltiples. Por lo tanto, por ejemplo, las partículas virales y las composiciones farmacéuticas de las mismas se pueden empaquetar en una forma de dosificación unitaria individual o múltiple para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación.

Las formulaciones que contienen partículas del AAV-TPP1 contendrán una cantidad efectiva de las partículas de rAAV en un vehículo, la cantidad efectiva será determinada fácilmente por un experto en la técnica. Las partículas del AAV-TPP1 pueden variar habitualmente de aproximadamente 1% a aproximadamente 95% (p/p) de la composición, o incluso más si es adecuado. La cantidad que se administrará depende de factores tal como la edad, el peso y la condición física del mamífero o del sujeto humano considerado para el tratamiento. Las dosis efectivas pueden ser establecidas por un experto en la técnica a través de ensayos de rutina que establecen curvas de respuesta a la dosis.

VI. Definiciones

Un "promotor" se refiere a una secuencia de nucleótidos, generalmente en dirección 5' de una secuencia codificante, que dirige y/o controla la expresión de la secuencia codificante al proporcionar el reconocimiento del ARN polimerasa y otros factores necesarios para la transcripción adecuada. En algunas modalidades, el promotor comprende una

secuencia que tiene al menos 50% de identidad, al menos 60% de identidad, al menos 70% de identidad, al menos 75% de identidad, al menos 80% de identidad, al menos 85% de identidad, al menos 90% de identidad, al menos 95% de identidad, al menos 98% de identidad o 100% de identidad con el ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 1.

5 Un "potenciador" es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad de transcripción y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo que mejora el nivel o la especificidad tisular de la expresión. Es capaz de funcionar en cualquier orientación (5'→3' o 3'→5') y puede ser capaz de funcionar incluso cuando se coloca aguas arriba o aguas abajo del promotor.

10 Los promotores y/o potenciadores pueden derivar en su totalidad de un gen nativo o estar compuestos por diferentes elementos derivados de diferentes elementos que se encuentran en la naturaleza, o incluso estar compuestos por segmentos de ADN sintético. Un promotor o potenciador puede comprender secuencias de ADN que están involucradas en la unión de factores proteicos que modulan/controlan la efectividad del inicio de la transcripción
15 en respuesta a estímulos, condiciones fisiológicas o de desarrollo.

 Un "transgén" se usa en la presente para referirse convenientemente a una secuencia/polinucleótido de ácido nucleico que se pretende o se ha introducido en una célula u organismo. Los transgenes incluyen cualquier ácido nucleico, tal como un gen que codifica para un polipéptido o proteína de ARN inhibidor (por ejemplo, TTP1) y son generalmente
20 heterólogos con respecto a secuencias genómicas de origen natural.

 El término "transducir" se refiere a la introducción de una secuencia de ácido nucleico en una célula u organismo huésped por medio de un vector (por ejemplo, una partícula viral). Por lo tanto, la introducción de un transgén en una célula por una partícula viral puede denominarse "transducción" de la célula. El transgén puede o no integrarse en el ácido
25 nucleico genómico de una célula transducida. Si un transgén introducido se integra en el ácido nucleico (ADN genómico) de la célula u organismo receptor, puede mantenerse de forma estable en esa célula u organismo y transmitirse adicionalmente a o heredarse por células u organismos de la progenie de la célula u organismo receptor. Finalmente, el transgén introducido puede existir en la célula receptora o en el organismo huésped de forma
30 extracromosómica o solo transitoria. Por lo tanto, una "célula transducida" es una célula en la que se ha introducido el transgén por medio de la transducción. Por lo tanto, una célula "transducida" es una célula en la que, o una progenie de la misma en la que se ha introducido un transgén. Una célula transducida se puede propagar, transcribir el transgén y expresar la

proteína codificada. Para los usos y métodos de terapia génica, una célula transducida puede estar en un mamífero.

Como se usa en la presente, los términos "modificar" o "variante" y las variaciones gramaticales de los mismos, significan que un ácido nucleico, polipéptido o subsecuencia de los mismos se desvía de una secuencia de referencia. Por lo tanto, las secuencias modificadas y variantes pueden tener sustancialmente la misma, mayor o menor expresión, actividad o función que una secuencia de referencia, pero al menos conservar una actividad o función parcial de la secuencia de referencia. Un tipo particular de variante es una proteína mutante, que se refiere a una proteína codificada por un gen que tiene una mutación, por ejemplo, una mutación de sentido erróneo o sin sentido.

Una variante de "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a una secuencia modificada que se ha alterado genéticamente en comparación con el tipo silvestre. La secuencia puede modificarse genéticamente sin alterar la secuencia de proteína codificada. Alternativamente, la secuencia puede modificarse genéticamente para codificar una proteína variante, por ejemplo, una proteína TPP1 variante. Una variante de ácido nucleico o polinucleótido también puede referirse a una secuencia de combinación que se ha modificado por codones para codificar una proteína que aún conserva al menos una identidad de secuencia parcial con una secuencia de referencia, tal como una secuencia de proteína de tipo silvestre, y también se ha modificado por codones para codificar una proteína variante. Por ejemplo, algunos codones de esta variante de ácido nucleico se cambiarán sin alterar los aminoácidos de una proteína TPP1 codificada por esta, y algunos codones de la variante de ácido nucleico se cambiarán, lo que a su vez cambia los aminoácidos de una proteína codificada por esta.

Los términos "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente en la presente. Los "polipéptidos" codificados por un "ácido nucleico" o "polinucleótido" o "transgén" divulgados en la presente incluyen secuencias nativas parciales o de longitud completa, como con proteínas polimórficas naturales y funcionales, subsecuencias funcionales (fragmentos) de las mismas y variantes de secuencia de las mismas, siempre que el polipéptido (por ejemplo, TPP1) conserve algún grado de función o actividad. Por consiguiente, en los métodos y usos de la divulgación, no se requiere que estos polipéptidos codificados por secuencias de ácido nucleico sean idénticos a la proteína endógena que es defectuosa, o cuya actividad, función o expresión es insuficiente, deficiente o ausente en un mamífero tratado.

Los ejemplos no limitantes de modificaciones incluyen una o más sustituciones de

nucleótidos o aminoácidos (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15, de aproximadamente 15 a aproximadamente 20, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25, de aproximadamente 25 a aproximadamente 30, de aproximadamente 30 a aproximadamente 40, de aproximadamente 40 a aproximadamente 50, de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, de aproximadamente 150 a aproximadamente 200, de aproximadamente 200 a aproximadamente 250, de aproximadamente 250 a aproximadamente 500, de aproximadamente 500 a aproximadamente 750, de aproximadamente 750 a aproximadamente 1000 o más nucleótidos o residuos).

Un ejemplo de una modificación de aminoácidos es una sustitución o una delección de aminoácidos conservadora. En modalidades particulares, una secuencia modificada o variante retiene al menos parte de una función o actividad de la secuencia no modificada (por ejemplo, secuencia de tipo silvestre). Otro ejemplo de una modificación de aminoácidos es un péptido de direccionamiento introducido en una proteína de la cápside de una partícula viral. Se han identificado péptidos que se dirigen a vectores virales recombinantes, al sistema nervioso central, tal como a distintas regiones cerebrales.

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

90%, 95%, 99% o 100% de la actividad o función del tipo silvestre).

El término "identidad sustancial" de secuencias de polinucleótidos significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% o 79%, o al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% u 89%, o al menos 90%, 91%, 92%, 93% o 94%, o incluso al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, en comparación con una secuencia de referencia que usa uno de los programas de alineación descritos usando parámetros estándar. Un experto en la técnica reconocerá que estos valores se pueden ajustar adecuadamente para determinar la identidad correspondiente de las proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de codones, la similitud de aminoácidos, el posicionamiento del marco de lectura y similares. La identidad sustancial de secuencias de aminoácidos para estos fines normalmente significa una identidad de secuencia de al menos 70%, al menos 80%, 90% o incluso al menos 95%.

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

Los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir, inhibir, reducir o disminuir un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como el desarrollo, progresión o empeoramiento del trastorno. Para los fines de esta divulgación, los resultados clínicos benéficos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estabilización de un síntoma o efecto adverso (es decir, que no empeora o progresa) de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no recibe tratamiento. Los que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen la condición o trastorno, así como

aquellos predispuestos (por ejemplo, según lo determinado por un ensayo genético).

VII. Kits

La divulgación proporciona kits con material de empaque y uno o más componentes en estos. Un kit habitualmente incluye una etiqueta o prospecto que incluye una descripción de los componentes o instrucciones para usarse *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*, de los componentes en este. Un kit puede contener una colección de estos componentes, por ejemplo, un ácido nucleico, vector recombinante y/o partículas virales.

Un kit se refiere a una estructura física que alberga uno o más componentes del kit. El material de empaquetamiento puede mantener los componentes de forma estéril y puede estar hecho de material comúnmente usado para estos fines (por ejemplo, papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, lámina, ampollas, viales, tubos, etc.).

Las etiquetas o insertos pueden incluir información de identificación de uno o más componentes en ellos, cantidades de dosis, farmacología clínica del o de los ingredientes activos, incluido el mecanismo de acción, la farmacocinética y la farmacodinámica. Las etiquetas o insertos pueden incluir información que identifique al fabricante, números de lote, ubicación y fecha de fabricación, fechas de vencimiento. Las etiquetas o insertos pueden incluir información que identifique la información del fabricante, los números de lote, la ubicación del fabricante y la fecha. Las etiquetas o insertos pueden incluir información sobre una enfermedad para la cual se puede usar un componente del kit. Las etiquetas o insertos pueden incluir instrucciones para el médico o sujeto para usar uno o más de los componentes del kit en un método, uso, protocolo de tratamiento o régimen terapéutico. Las instrucciones pueden incluir cantidades de dosificación, frecuencia o duración, e instrucciones para practicar cualquiera de los métodos, usos, protocolos de tratamiento o regímenes profilácticos o terapéuticos descritos en la presente.

Las etiquetas o insertos pueden incluir información sobre cualquier beneficio que pueda proporcionar un componente, tal como un beneficio profiláctico o terapéutico. Las etiquetas o insertos pueden incluir información sobre posibles efectos secundarios adversos, complicaciones o reacciones, tal como advertencias al sujeto o al médico con respecto a situaciones en las que no sería apropiado usar una composición particular. Los efectos secundarios adversos o complicaciones también podrían ocurrir cuando el sujeto tiene, estará o está tomando actualmente uno o más medicamentos que pueden ser incompatibles con la composición, o el sujeto tiene, estará o está experimentando actualmente otro protocolo de

tratamiento o régimen terapéutico que sería incompatible con la composición y, por lo tanto, las instrucciones podrían incluir información sobre estas incompatibilidades.

Las etiquetas o insertos incluyen "material impreso", por ejemplo, papel o cartón, o separado o fijado a un componente, un kit o material de empaquetamiento (por ejemplo, una caja), o unido a una ampolla, tubo o vial que contiene un componente del kit. Las etiquetas o insertos pueden incluir adicionalmente un medio legible por computadora, tal como una etiqueta impresa con código de barras, un disco, un disco óptico tal como CD o DVD-ROM/RAM, DVD, MP3 o un medio de almacenamiento eléctrico tal como RAM y ROM o híbridos de estos tal como medios de almacenamiento magnético/óptico, memoria FLASH, híbridos y tarjetas de tipo memoria.

VIII. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las modalidades preferidas de la divulgación. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la divulgación y, por lo tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deben, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las modalidades específicas que se divulgan y aún obtener un resultado similar o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la divulgación.

Ejemplo 1 – Cápsides del AAV evolucionadas para la terapia génica de la enfermedad de CLN2

Se desarrolló una nueva cápside del AAV que transduce preferentemente células endodimarias, así como neuronas en NHP (descrito en PCT/US2020/061464). Posteriormente, se diseñó una terapia génica para la enfermedad de CLN2 (descrita anteriormente en una patente anterior, mientras que la terapia génica se empaquetó en AAV2), usando la cápside del AAV y la secuencia promotora neuronal ubicua (CAG) para impulsar la expresión de tripeptidil peptidasa 1 (TPP1) en neuronas en todo el cerebro. Como se muestra en el Apéndice 1, la hTPP1 secretada del epéndimo transducido se expresó de forma amplia y estable en el cerebro, se toleró bien y produjo un beneficio terapéutico dependiente de la dosis en ratones deficientes en TPP1. El AAV modificado con péptido dio como resultado mejoras sólidas en la biodistribución de hTPP1, con fenotipos mejorados a dosis significativamente más bajas (5E10vg) que los serotipos convencionales (1E11vg) en

ratones.

Todos los métodos divulgados y reivindicados en la presente pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Si bien las composiciones y métodos de la presente divulgación se han descrito en términos de modalidades preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a los métodos y en los pasos o en la secuencia de pasos del método descrito en la presente sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la divulgación. Más específicamente, será evidente que determinados agentes que están relacionados tanto química como fisiológicamente pueden sustituirse por los agentes descritos en la presente mientras que se lograrían los mismos o similares resultados. Todos estos sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la técnica se consideran dentro del espíritu, alcance y concepto de la divulgación como se define en las reivindicaciones adjuntas.

IX. Referencias

Las siguientes referencias, en la medida en que proporcionan ejemplos de procedimientos u otros detalles complementarios a los expuestos en la presente, se incorporan específicamente a la presente mediante esta referencia.

Patente de los Estados Unidos Núm.8.299.215

Patente de los Estados Unidos Núm.8.691.948

Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2018/0142259

Chen et al., Molecular signatures of disease brain endothelia provide new sites for CNS- directed enzyme therapy. Nat Med, 2009.15(10): p.1215-8.

Chen et al., Overcoming Limitations Inherent in Sulfamidase to Improve Mucopolysaccharidosis IIIA Gene Therapy. Mol Ther, 2018.26(4): p.1118-1126.

Deverman et al., Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. Nat Biotechnol, 2016.34(2): p.204-9.

Hartz et al., Isolation of Cerebral Capillaries from Fresh Human Brain Tissue. J Vis Exp, 2018(139).

Hordeaux et al., The Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Limited to C57BL/6J

Mice. Mol Ther, 2018.26(3): p.664-668.

Junaid et al., A Novel Assay for Lysosomal Pepstatin-Insensitive Proteinase and its Application for the Diagnosis of Late-Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. Clin Chim Act, 1999.281: p.169-176.

- 5 Katz et al., AAV gene transfer delays disease onset in a TPP1-deficient canine model of the late infantile form of Batten disease. Sci Transl Med, 2015.7(313): p.313r180.

Keiser et al., Broad distribution of ataxin 1 silencing in rhesus cerebella for spinocerebellar ataxia type 1 therapy. Brain, 2015.138(Pt 12): p.3555-66.

- 10 Koerber et al., DNA shuffling of adeno-associated virus yields functionally diverse viral progeny. Mol Ther, 2008.16(10): p.1703-9.

Matsuzaki et al., Intravenous administration of the adeno-associated virus-PHP.B capsid fails to upregulate transduction efficiency in the marmoset brain. Neurosci Lett, 2018. 665: p.182-188.

- 15 McBride et al., Preclinical safety of RNAi-mediated HTT suppression in the rhesus macaque as a potential therapy for Huntington's disease. Mol Ther, 2011.19(12): p.2152-62.

Monteys et al., CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele *in vitro* and *in vivo*. Mol Ther, 2017.25(1): p.12-23.

Muller et al., Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. Nat Biotechnol, 2003.21(9): p.1040-6.

- 20 Poznansky et al., Drug Delivery Systems. R. L. Juliano, ed., Oxford, N.Y., pp.253-315, 1980.

Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.1989.

- 25 Schaffer & Maheshri, Directed evolution of AAV mutants for enhanced gene delivery. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2004.5: p.3520-3.

Zhong et al., Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. Proc Natl Acad Sci USA, 2008. 105(22): p.7827-32.