

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 975 742**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2017** **PCT/EP2017/064089**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2017** **WO17212019**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2017** **E 17730443 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024** **EP 3469073**

54 Título: **rAAV con cápside modificada químicamente**

30 Prioridad:

09.06.2016 EP 16305681

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.07.2024

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (25.0%)**

3, rue Michel Ange

75016 Paris, FR;

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (25.0%);**

NANTES UNIVERSITÉ (25.0%) y

**CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE
NANTES (25.0%)**

72 Inventor/es:

MEVEL, MATHIEU;

DENIAUD, DAVID y

AYUSO, EDUARD

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la
Oficina Europea de Patentes

ES 2 975 742 T3

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

DESCRIPCIÓN

rAAV con cápside modificada químicamente

- 5 La presente invención se refiere, en general, al campo de la genoterapia, es decir, a la administración génica en células diana, tejido, órgano y organismo, y más particularmente a la administración génica mediante vectores víricos.

La presente invención se refiere más particularmente a partículas de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV), acopladas químicamente sobre su cápside con al menos un ligando, y a un método para producir dicha
10 partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV). Además, la presente invención se refiere al uso de estas partículas de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) como medios terapéuticos y/o diagnósticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La genoterapia se considera más particularmente en la presente invención. Aunque la genoterapia fue desarrollada originalmente para corregir los genes defectuosos que subyacen a las enfermedades genéticas, la terapia génica actual se puede usar para tratar una amplia variedad de trastornos que incluyen enfermedades adquiridas, tales como cáncer, infarto de corazón o trastornos metabólicos. Un enfoque común para tratar este problema implica la administración de ácidos nucleicos al núcleo. Estos ácidos nucleicos se pueden entonces insertar en el genoma de la
20 célula dirigida o pueden seguir siendo episómicos. La administración de un ácido nucleico terapéutico a las células diana de un sujeto se puede llevar a cabo por numerosos métodos, incluyendo el uso de vectores víricos. De los muchos vectores víricos disponibles (por ejemplo, retrovirus, lentivirus, adenovirus y similares), el virus adenoasociado (AAV) está ganando popularidad como un vector versátil en genoterapia, particularmente para aplicaciones *in vivo*.

25 El virus adenoasociado (AAV) es un miembro de la familia parvoviridae. El genoma del AAV está compuesto por una molécula de ADN monocatenario lineal que contiene aproximadamente 4,7 kilobases (kb) y consiste en dos marcos de lectura abiertos principales que codifican las proteínas no estructurales Rep (replicación) y estructurales Cap (cápside) proteínas.

30 Los vectores recombinantes derivados de AAV se están convirtiendo ahora en productos terapéuticos, y recientemente uno de ellos ha recibido autorización de comercialización para el tratamiento de una enfermedad genética rara (deficiencia de lipoproteína lipasa).

Los vectores víricos derivados de virus adenoasociados (AAV) se han convertido de hecho en la herramienta de
35 elección para la transferencia génica *in vivo*, principalmente debido a su eficiencia superior *in vivo*, en comparación con otros vectores, su tropismo para una amplia variedad de tejidos y su excelente perfil de seguridad. La eficacia terapéutica tras la transferencia génica de vectores de AAV se documentó en varios estudios preclínicos y, durante la última década, algunos de estos resultados se tradujeron satisfactoriamente en la clínica, que condujo a algunos de los resultados más excitantes en el campo de la genoterapia. La reciente autorización de comercialización del primer
40 producto de genoterapia basado en AAV en Europa constituye una evidencia adicional de que el campo está progresando de estudios de viabilidad hacia desarrollo clínico.

Sin embargo, la mayoría de los ensayos clínicos que usan AAV como vehículo para transgenes mostraron sus limitaciones críticas: (i) su reducido índice terapéutico (es decir, normalmente se requieren altas dosis de vectores para
45 lograr eficacia terapéutica); (ii) su amplia biodistribución; (iii) y su escasa eficacia en presencia de anticuerpos neutralizantes preexistentes.

Una limitación del AAV radica de hecho en su amplio tropismo, que da como resultado la expresión transgénica en otros tejidos distintos de aquellos donde se desea la expresión transgénica. También es bien reconocido que los retos
50 inmunitarios relacionados con los hospedadores y vectores necesitan ser vencidos para la transferencia génica a largo plazo.

La mayoría de las aplicaciones de terapia génica hasta la fecha han usado el serotipo 2 (AAV2). La transducción de un amplio intervalo de células posmitóticas *in vivo*, tal como células musculares, hepatocitos o neuronas en mamíferos,
55 explica parcialmente su popularidad. Este serotipo también se ha usado para la transferencia génica al músculo e hígado en ensayos clínicos para hemofilia B y la retina para tratar amaurosis congénita de Leber.

Sin embargo, todavía existen complicaciones y limitaciones con el uso de este vector. En primer lugar, normalmente se requiere una alta dosis del vector puesto que la eficacia de transducción *in vivo* es, en general, baja, lo que da
60 como resultado una elevada toxicidad. Una de las complicaciones más importantes es debida al hecho de que el 50-90 % de la población humana es seropositiva para AAV2 y ha desarrollado anticuerpos neutralizantes (NAb) contra AAV2 que alteran la administración génica. El descubrimiento de que existen de forma natural cepas aisladas de AAV (de 1 a 12) en seres humanos y especies animales y la modificación genética de la cápside de estos serotipos de AAV usando herramientas moleculares produjo resultados prometedores como resultado de modelos animales preclínicos
65 y ensayos clínicos de fase I/II, que promueven la excitante traducción clínica en el futuro cercano. Sin embargo, su índice terapéutico sigue siendo bajo, que implica que la alta concentración de ellos todavía necesita ser administrada

con efectos adversos concomitantes. Al mismo tiempo, la fabricación de lotes clínicos de vectores de AAV ha progresado considerablemente en la última década y ahora están disponibles métodos de fabricación a gran escala para la etapa farmacéutica preindustrial en la que está entrando la genoterapia. Sin embargo, si se requieren altas dosis de vectores para la fase III y la comercialización, los métodos actuales no serán capaces de soportar dicha demanda.

Como dichas estrategias, que han demostrado, de hecho, el potencial de los novedosos serotipos de AAV (y variantes genéticas relacionadas), no se consideraron satisfactorias ya que no logran un tropismo preciso, que permita la transducción selectiva de un tipo de célula diana, actualmente están en camino esfuerzos adicionales para aumentar los tropismos de vectores derivados de AAV. De hecho, para compensar la falta de especificidad de los vectores derivados de AAV, se necesita administrar cantidades extremadamente grandes de vectores derivados de AAV para alcanzar un umbral terapéutico, que no se desea por cuestiones de seguridad, así como limitaciones de fabricación.

Se han llevado a cabo varios intentos con este fin, tales como la introducción genética de epítomos de péptido con especificidades de direccionamiento en la superficie vírica. Estrategias adicionales fueron el uso de moléculas conectoras con dos especificidades, tales como anticuerpos biespecíficos, siendo una especificidad dirigida a la cápside vírica, la otra al receptor, la introducción de dominios adaptadores (dominio Z de proteína A, biotina) para la unión no covalente de ligandos de proteína.

Por ejemplo, en el documento de patente WO00/002654, el tropismo alterado se hace principalmente para prevenir la unión de AAV a receptores de virus de la célula diana original. En una realización particular, también se hace referencia en el presente documento al aumento de afinidad en relación con la célula diana. Aún en este documento, fragmentos de anticuerpos se unen a la cápside. Según una realización alternativa, el otro extremo del anticuerpo se puede acoplar a ligandos para mejorar la afinidad con relación a la diana (preparación de "diacuerpos").

El acoplamiento biológico y químico combinado en la cápside de AAV también se ha propuesto anteriormente para mejorar la selectividad de los vectores derivados de AAV por el tejido diana.

Por ejemplo, el documento de patente WO2005/106046 propone un método de combinación de modificación genética y modificación química de la cápside. La modificación química que es la segunda etapa del proceso se basa en la presencia de residuos de cisteína cuya cápside se enriqueció por la vía genética en una primera etapa. Así, las partículas de AAV se pueden injertar con ligandos, polímeros, nanopartículas de oro, moléculas fluorescentes, sustancias magnéticas o sustancias bioquímicamente activas. Sin embargo, el acoplamiento se realiza mediante enlaces disulfuro, tioéster y/o tioéter y mediante enlaces NCS como en la presente invención como se detalló en el presente documento posteriormente.

El artículo de E. D. Horowitz et al "Glycated AAV Vectors: Chemical Redirection of Viral Tissue Tropism" Bioconjugate Chemistry, 2011, 22, 529-532, describe el problema del tropismo celular entre otros problemas técnicos. En particular, la generación de cadenas laterales de aminoácidos no naturales mediante la glucación de la cápside sirve de estrategia ortogonal para manipular vectores de AAV que presentan novedosos tropismos de tejido para las aplicaciones de genoterapia.

En el documento de patente WO2015/062516, un aminoácido no natural, tal como un aminoácido que comprende un azido, se inserta en la cápside por modificación genética antes de una etapa de acoplamiento por química de click para cambiar la cápside de AAV y su tropismo por la célula diana.

También se puede citar otra dimensión de la investigación en el campo de AAV como un vehículo para genoterapia, es decir, recubrimiento de partículas víricas con polímeros tales como polietilenglicol (PEG) o poli-(N-hidroxipropil)metacrilamida (pHPMA) con el objetivo de reducir interacciones específicas y no específicas con tejidos no diana.

Sin embargo, dichos enfoques no son todavía completamente satisfactorios, ya que se implican diversas etapas principalmente antes de lograr los vectores derivados de AAV. Por tanto, para incorporar ligandos específicos, estos enfoques requirieron la modificación genética de la cápside. En otras palabras, los procesos existentes para incorporar ligandos en las superficies de la cápside de AAV no ofrecen la flexibilidad y simplicidad deseadas, puesto que no se puede aplicar a una cápside natural. Se debe observar que la introducción de una modificación genética en la cápside puede cambiar el tropismo del vector y puede modificar el rendimiento de producción y otros parámetros biológicos. Además, esta modificación genética se debe realizar para cada nuevo serotipo que necesite ser modificado. En resumen, no existe método universal para acoplar un ligando diana deseado a la cápside de AAV.

También se conoce de Kye-Il Joo et al., "Enhanced Real-Time Monitoring of Adeno-Associated Virus Trafficking by Virus-Quantum Dot Conjugates", ACS NANO, vol. 5, n.º 5, 24 de mayo de 2011, una reacción química para acoplar puntos cuánticos (QD) en las cápsides o partículas de AAV. Sin embargo, se implementa un acoplamiento de carbodiimida y no un enlace de tiourea como en la presente invención como será evidente a partir de la siguiente descripción.

Finalmente, C.E.Wobus et al "Monoclonal Antibodies against the Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV-2) Capsid: Epitope Mapping and Identification of Capsid Domains Involved in AAV-2 Cell Interaction and Neutralization of AAV-2 Infection", Journal of Virology, vol. 74, n.º 19, 1 de octubre de 200, páginas 9281-9293, describe el marcado de cápsides vacías con FITC. Sin embargo, como se describirá con detalle en el presente documento posteriormente, solo se hace referencia en la presente a las cápsides que contienen genoma y acopladas a ligando L mediante un enlace que comprende un -CSNH- y un resto aromático.

El documento de patente WO2015/048534 desvela productos y métodos para producir genes de cápsides de AAV y bibliotecas combinatorias de vectores y viriones quiméricos de AAV.

Por lo tanto, existe una necesidad de encontrar un método para modificar vectores derivados de AAV por acoplamiento químico, para aumentar su capacidad para dirigirse a un órgano o tejido específico, en particular por una administración génica *in vivo*.

También existe una necesidad de modificar los vectores derivados de AAV sin requerir una etapa de modificación de la secuencia de cápsides de aminoácidos de AAV.

Además, existe una necesidad de nuevos vectores de AAV modificados en la superficie con transferencia génica mediada por virus mejorada en tipos específicos de células.

En términos más generales, existe la necesidad de nuevos métodos para acoplar químicamente ligandos de cualquier naturaleza en la superficie de cápsides de vectores derivados de AAV, es decir, una variedad de restos químicos, por ejemplo, para mejorar la "actividad específica" y/o "el índice terapéutico".

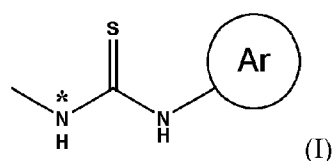
Más particularmente, existe una necesidad de proporcionar nuevos medios para modificar las cápsides de partículas con restos tales como polímeros sintéticos, péptidos, hidratos de carbono o lípidos.

Existe además una necesidad de descubrir partículas de vectores de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) modificados químicamente que permitan la disminución de la dosis terapéutica.

La presente invención tiene precisamente como objetivo proporcionar una novedosa partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que cumpla los requisitos previos, su método de producción y sus usos terapéuticos y/o diagnósticos.

SUMARIO DE LA INVENCION

Por lo tanto, según uno de sus aspectos, la invención se refiere a una partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que tiene al menos un grupo amino primario contenido en las proteínas de la cápside, acoplado químicamente con al menos un ligando L, en donde dicho ligando L se implementa en forma de un compuesto de la fórmula (I)



• siendo N* el átomo de nitrógeno de un grupo amino primario contenido en las proteínas de la cápside y,

•



representa un radical arileno o heteroarileno opcionalmente sustituido, unido covalentemente, directamente o no, a al menos un ligando L.

Según otro de sus aspectos, la invención se refiere a un método para acoplar químicamente una partícula de vector de virus adenoasociado (AAV) con al menos un ligando L, comprendiendo dicho método al menos las etapas de

- tener una partícula de virus adenoasociado (AAV) que tiene al menos un grupo amino primario contenido en las proteínas de la cápside, y
 - poner en contacto dicha partícula de AAV con un reactivo de la fórmula (II)
- B-N=C=S (II) en donde B es un radical (L)_m(X)Ar
- siendo L como se define en el presente documento posteriormente,
- representando m un número entero desde 1 hasta 1000,
- representando Ar un radical arileno o heteroarileno, y es más particularmente como se define en el presente documento posteriormente, y
- representando X un enlace o un espaciador entre dicho(s) ligando(s) L y Ar, en condiciones adecuadas para hacer reaccionar el grupo amino primario con el resto -N=C=S del reactivo de la fórmula (II).

Una divulgación no cubierta por las reivindicaciones se refiere a una partícula de vector de virus recombinante adenoasociado (rAAV) obtenida por dicho método conforme a la presente invención.

Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere a la partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según la presente invención, para su uso como un medicamento, en particular para administrar ácidos nucleicos terapéuticos (genes, ARN, miARN, ARNinc, ...) o para inducir una edición correctiva de genoma; como un medio profiláctico; como un medio diagnóstico, tal como un agente de obtención de imágenes o para su uso para estudios de eficiencia para genoterapia.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende la partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La modificación química considerada en el marco de la presente invención se puede llevar a cabo, por lo tanto, por formación de un enlace covalente directamente con los grupos amino presentes en la cápside de AAV sin requisitos de modificaciones genéticas previas a la secuencia de la cápside.

La ventaja principal del acoplamiento químico, a diferencia de la generación de cepas manipuladas de AAV usando herramientas genéticas moleculares, es la posibilidad de modificar las cápsides de las partículas con restos tales como polímeros sintéticos, péptidos, hidratos de carbono o incluso lípidos que no se pueden incorporar genéticamente. Por tanto, nuevas variantes genéticas de la cápside de AAV podrían ser problemáticas de producir y caracterizar para su uso en ensayos clínicos puesto que estas cápsides sintéticas tienen que ser estudiadas en diversos niveles, que incluyen tropismo, biodistribución, ensamblaje de vectores, rendimientos de producción y estrategias de purificación.

Otros aspectos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención, y en particular en relación con la variedad de entidades orgánicas que pueden funcionalizar las cápsides, tales como moléculas pequeñas, polímeros o péptidos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Fig. 1** ilustra el acoplamiento covalente de FITC sobre la cápside de AAV2 mediante grupos amino primarios.

La **Fig. 2** ilustra la identificación de la función reactiva para el acoplamiento covalente de ligandos de GalNAc sobre la cápside de AAV2 mediante grupos amino primarios.

La **Fig. 3** ilustra el acoplamiento covalente de ligandos de GalNAc sobre la cápside de AAV2 mediante grupos amino primarios.

La **Fig. 4** ilustra la transducción de hepatocitos primarios humanos con vectores de AAV2 y AAV2 modificados químicamente con ligandos de GalNAc.

La **Fig. 5** ilustra el efecto del número de equivalentes de ligandos sobre la eficacia de acoplamiento mediante grupos amino primarios (Ejemplo con FITC).

La **Fig. 6** ilustra el efecto del número de equivalentes de ligandos de GalNAc sobre la eficacia del acoplamiento mediante grupos amino primarios (Ejemplo con **6** y **13**) y la transducción de hepatocitos primarios murinos.

La **Fig. 7** ilustra el efecto del número de equivalentes de ligandos de manosa sobre la eficacia del acoplamiento mediante grupos amino primarios (Ejemplo con **6** y **13**) y la transducción de la retina en ratas.

La **Fig. 8** ilustra la identificación de ligandos **18** y **19** con diferente función reactiva para el acoplamiento covalente de ligandos de GalNAc sobre la cápside de AAV2 mediante grupos amino primarios.

La **Fig. 9** ilustra el acoplamiento covalente de **6** sobre la cápside de AAV3b mediante grupos amino primarios.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se describirá ahora con referencia a los dibujos adjuntos, en los que se muestran realizaciones representativas de la invención.

Definiciones

A menos que se indique lo contrario, todos los términos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entendería un experto en la técnica, y la práctica de la presente invención empleará técnicas convencionales de biología molecular, virología y tecnología de ADN recombinante, que están dentro del conocimiento de los expertos en la técnica.

Los términos "administrar", "introducir" o "suministrar", como se usan en el presente documento, se refieren al suministro de un plásmido o vector de la invención para la expresión de proteínas o nucleótidos recombinantes a una célula o a células y/o tejidos y/u órganos de un sujeto. Dicha administración, introducción o suministro puede tener lugar *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. Un plásmido para la expresión de proteínas o polipéptidos recombinantes se puede introducir en una célula por transfección, que normalmente significa la inserción de ADN heterólogo en una célula por medios químicos (por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, polietilenimina (PEI) o lipofección); medios físicos (electroporación o microinyección); infección, que normalmente se refiere a la introducción a modo de un agente infeccioso con capacidad para replicar y/o completar su ciclo vital, es decir, un virus (por ejemplo, baculovirus que expresa genes Rep de AAV); o transducción, que en virología se refiere a la infección de una célula sin completar el ciclo vital normalmente debido a que las funciones requeridas para la replicación de dicho agente se han modificado o la transferencia de material genético de un microorganismo a otro por medio de un agente vírico (por ejemplo, un bacteriófago o vectores víricos deficientes en la replicación).

Un vector según la invención para la expresión de polipéptidos, proteínas u oligonucleótidos recombinantes se puede administrar por medios físicos (por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, electroporación, microinyección o lipofección), o preparando el vector con un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* a una célula, tejido, órgano o un sujeto. Además, una partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) de la invención puede entrar en células sin la ayuda de medios físicos o un vehículo (distinto del ligando acoplado).

El término "célula hospedadora", como se usa en el presente documento, se refiere, por ejemplo, a microorganismos, células de levadura, células de insecto y células de mamífero, que pueden ser, o han sido, usadas como receptores de vectores de rAAV. El término incluye la progenie de la célula original que se ha transducido. Por lo tanto, una "célula hospedadora" como se usa en el presente documento se refiere, en general, a una célula que se ha transducido con un ácido nucleico exógeno. Se entiende que la progenie de una única célula parental puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en ADN genómico o total a la parental original, debido a mutación natural, accidental o deliberada.

El término "recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a ácidos nucleicos, vectores, polipéptidos o proteínas que han sido generados usando métodos de recombinación (clonación) de ADN y son distinguibles de ácidos nucleicos, vectores, polipéptidos o proteínas nativos o naturales.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, incluye, pero no se limita a, seres humanos, primates no humanos, tales como chimpancés y otros monos superiores y especies de monos; animales de granja, tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos, tales como perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores, tales como ratones, ratas y cobayas, y similares. El término no indica una edad o sexo particular. Por lo tanto, pretenden quedar cubiertos sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, tanto masculinos como femeninos.

Como se usa en el presente documento, el término "tropismo" se refiere a la infección y/o transducción preferencial de la partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) de ciertas células o tejidos. En una realización preferida, para modificar el tropismo de partículas de AAV, a las partículas se les dan ciertas características, tales como ciertas afinidades por los receptores sobre la superficie de la célula diana que no poseen por naturaleza.

El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente toxicidad o una reacción alérgica o

desfavorable similar, tal como malestar gástrico, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano. Preferentemente, como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de los EE. UU. u otra farmacopea reconocida, en general, para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

Como se usa en el presente documento, el "índice terapéutico" es un parámetro que expresa la eficiencia terapéutica del fármaco activo. Por ejemplo, es bajo cuando implica que se necesita una concentración elevada del principio activo para lograr la eficacia terapéutica o cuando la dosis necesaria para obtener la eficacia induce toxicidad. Por el contrario, un índice terapéutico alto implica que la dosis requerida de la sustancia activa para proporcionar eficacia terapéutica es baja y/o cuando la toxicidad del fármaco activo es baja.

El término "modificación química", como se usa en el presente documento, se refiere a la modificación de proteínas de la cápside por reacciones químicas y con la formación de enlaces químicos covalentes.

AAV

Todos los virus adenoasociados recombinantes se pueden implementar en el marco de la presente invención.

La cápside de virus adenoasociado recombinante se puede elegir de todos los serotipos naturales identificados y en particular AAV2, AAV3b, AAV5, AAV8, AAV9 y AAV10 y puede ser incluso más particularmente AAV2.

Por tanto, el virus adenoasociado recombinante se puede elegir de serotipos sintéticos generados por métodos no naturales, tales como, pero no se limitan a: mutagénesis de cápsides, inserciones de péptidos en la secuencia de la cápside, barajado de cápsides de diversos serotipos o reconstrucción ancestral.

Los AAV recombinantes son capaces de transducir un amplio intervalo de células posmitóticas *in vivo* en el mamífero como células musculares, hepatocitos o neuronas.

Los vectores de AAV recombinantes se pueden producir por varios métodos que incluyen: transfección transitoria de células HEK293, estirpes celulares estables infectadas con Ad o VHS, células de mamífero infectadas con Ad o VHS (que expresan rep-cap y transgén) o células de insecto infectadas con vectores de baculovirus (que expresan rep-cap y transgén). Los vectores de AAV recombinantes producidos por cualquiera de estos métodos se pueden usar para las modificaciones químicas descritas en el presente documento. Los vectores se pueden producir en particular por transfección transitoria de células HEK293 con el método de fosfato de calcio-HeBS con dos plásmidos: pHelper, PDP2-KANA que codifica AAV Rep2-Cap2 y genes auxiliares de adenovirus (E2A, ARN de VA y E4) y pVector ss-CAG-eGFP como se ilustra en el Ejemplo 2.1.

El virus adenoasociado recombinante de la invención puede contener cualquier secuencia de origen extravírico según se desee.

Cápside

La cápside puede comprender natural o no naturalmente grupos amino. El grupo amino presente en la superficie de la cápside participa en dicho acoplamiento químico.

Según una realización particular, el vector de virus adenoasociado recombinante está compuesto por proteínas de la cápside *naturales* de serotipos que existen de forma natural.

Dichos grupos amino que existen de forma natural pueden ser, por ejemplo, lisina, arginina y cisteína, y más particularmente lisina.

Según otra realización particular, la partícula de vector del virus adenoasociado recombinante (rAAV) es un virus adenoasociado con una modificación genética (mutación, inserciones o deleciones) de las proteínas de la cápside de serotipos que existen de forma natural o compuestas por una cápside sintética.

En el marco de la presente invención, una cápside sintética significa combinación de proteínas de la cápside a partir de serotipos naturales o artificialmente creados (mutaciones aleatorias, barajado de secuencia, diseño por ordenador, etc.) que son capaces de ensamblarse y crear una nueva cápside de virus AAV que no existe en la naturaleza.

Fórmula (I) / Ligando L

La invención proporciona un novedoso método para modificar químicamente una cápside de AAV injertando covalentemente un ligando L en grupos amino primarios presentes en la superficie del mismo.

La partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según la presente divulgación describe la realización, no cubierta por las reivindicaciones, donde



representa un resto aromático que forma parte de un ligando L, o la realización donde



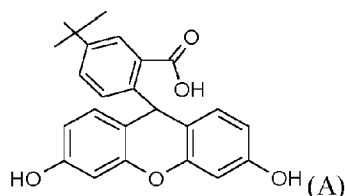
es un radical arileno o un heteroarileno opcionalmente sustituido, unido covalentemente, directamente o no, a al menos un ligando L.

En otras palabras, en este caso



está englobado dentro del ligando L.

Según este caso, el ligando L puede ser un agente de marcado como se ilustra en el Ejemplo 2, ilustrado por la siguiente fórmula (A)



Deriva de fluoresceína y deriva más particularmente de isotiocianato de fluoresceína (FITC) como reactivo de la fórmula (II) como se define en el presente documento posteriormente.

A este respecto, cualquier colorante fluorescente que comprenda un resto aromático también puede implementarse adecuadamente, tal como rodamina, Alexa Fluor y Bodipy.

Según la invención,



no forma parte del ligando L, estando dicho ligando L unido a



que como consecuencia es un grupo divalente.

Según una realización particular,



la fórmula (I) representa un radical arileno o heteroarileno opcionalmente sustituido, unido covalentemente, directamente o no, a al menos un ligando L.

Normalmente, el grupo arileno se puede elegir de ciclos aromáticos como fenileno, naftileno y antracenileno, y más particularmente de fenileno y naftileno.

El grupo arileno o heteroarileno se puede sustituir opcionalmente por cualquier radical adecuado. Se pueden citar los siguientes radicales: un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo alquilo (C₁-C₃) o un grupo alcoxi (C₁-C₃).

El grupo arileno significa ciclos aromáticos que comprenden desde 1 hasta 3 anillos aromáticos, por ejemplo, biciclos o triciclos, en particular anillos aromáticos condensados, desde 5 hasta 20 átomos de carbono, en particular desde 5 hasta 12 átomos de carbono.

El grupo heteroarileno significa un ciclo aromático que comprende desde 1 hasta 3 anillos aromáticos, en particular anillos aromáticos condensados, desde 5 hasta 20 átomos de carbono, en particular desde 6 hasta 10 átomos de carbono, que comprende opcionalmente al menos un heteroátomo, por ejemplo, entre 1 y 4 heteroátomos, seleccionado de O, N y S. Los ejemplos de grupos heteroarileno monocíclicos que se pueden mencionar incluyen grupos imidazolileno, pirimidileno, isoxazolileno, tiazolileno, isotiazolilo, piridileno, pirazolileno, oxazolileno, 1,2,4-oxadiazolileno, tienileno y furileno.

Se puede citar más particularmente piridileno.

Ejemplos de grupos heteroarileno bicíclicos que se pueden mencionar incluyen grupos 1H-indazolileno, benzo[1.2.3]tiadiazolileno, benzo[1,2,5]tiadiazolileno, benzotiofenileno, imidazo[1,2-a]piridileno, quinolinileno, indolileno y isoquinolinileno.

En el contexto de la presente invención, y a menos que se mencione lo contrario en el texto:

- un átomo de halógeno: un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo o un átomo de yodo; en particular, el átomo de halógeno es un átomo de flúor;

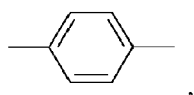
- un grupo alquilo: a menos que se mencione lo contrario en el texto, un grupo alifático saturado lineal o ramificado que contiene desde 1 hasta 5 carbonos. Los ejemplos que se pueden mencionar incluyen grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo y pentilo; y

- un grupo alcoxi: un radical -O-alquilo en el que el grupo alquilo es como se define previamente, en particular el grupo alquilo es un metilo o etilo.

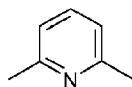
Según una realización particular,



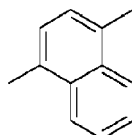
representa un grupo fenileno, un grupo naftileno o piridileno, y más particularmente un grupo



un grupo



o un grupo



unido covalentemente, directamente o no, a al menos un ligando L.

El ligando L puede cumplir diferentes funciones.

El ligando L se puede elegir normalmente de un agente de direccionamiento, un agente de apantallamiento estérico para evitar interacciones de anticuerpos neutralizantes, un agente de marcado o un agente magnético.

Según una realización particular, el ligando L es un ligando de direccionamiento, en particular un ligando específico del tipo de célula, y más particularmente derivado de proteínas, de mono- o polisacáridos, de hormonas esteroideas, de péptido de motivo RGD, de vitaminas, de moléculas pequeñas o de péptido de direccionamiento.

Según una realización, un ligando específico del tipo de célula puede derivar de proteínas, tales como transferrina, factor de crecimiento epidérmico EGF, factor de crecimiento de fibroblastos básico bFGF.

Según una realización, un ligando específico del tipo de célula puede derivar de **mono- o polisacáridos**, tales como galactosa, N-acetilgalactosamina y manosa.

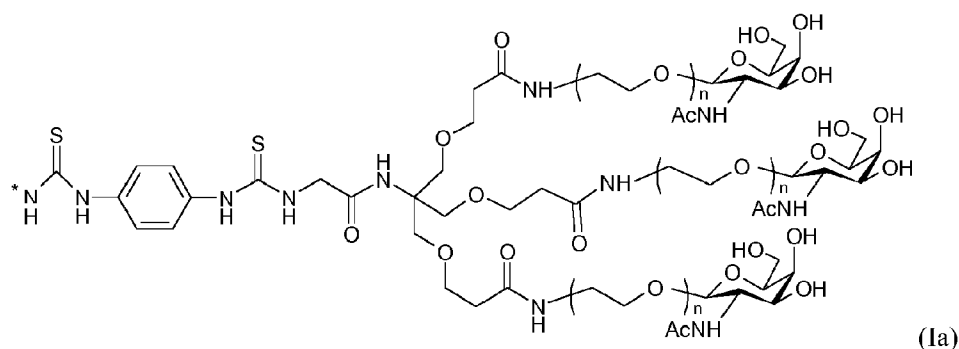
Según una realización, un ligando específico del tipo de célula puede derivar de **vitaminas**, tales como folatos.

Según una realización, un ligando específico del tipo de célula puede derivar de **moléculas pequeñas** que incluyen naproxeno, ibuprofeno u otras moléculas de unión a proteína conocidas.

Según una realización, un ligando específico del tipo de célula puede derivar de un **péptido que se dirige a músculo (MTP)** que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ASSLNIA (SEQ ID NO: 1); WDANGKT (SEQ ID NO: 2); GETRAPL (SEQ ID NO: 3); CGHHPVYAC (SEQ ID NO: 4); y HAIYPRH (SEQ ID NO: 5). En ciertas realizaciones, el resto que se dirige a músculo comprende creatina, de **un péptido que se dirige a cáncer (CTP)** comprende una secuencia de aminoácidos derivada de péptidos RGD lineales o cíclicos.

Según un aspecto más específico de la presente realización, los ligandos derivados de galactosa, que son reconocidos por el receptor de la asialoglucoproteína (ASGPr), se pueden usar para dirigirse específicamente a hepatocitos.

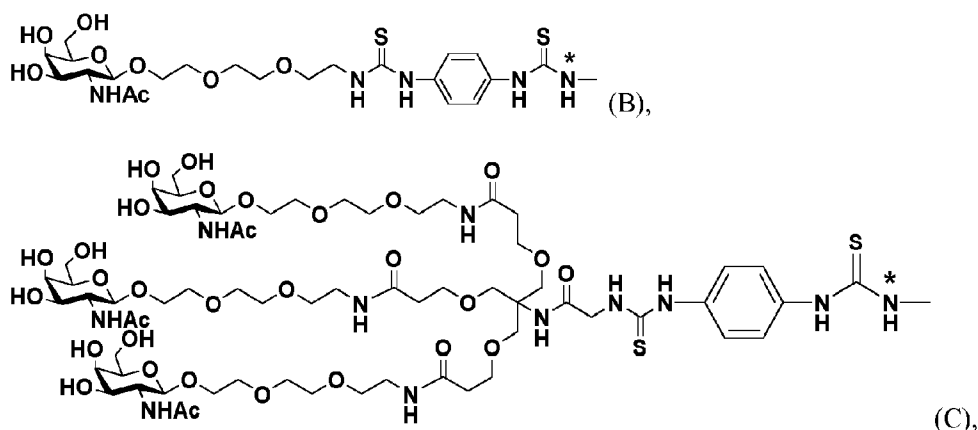
En el marco de dicho aspecto específico de la invención y entre el resto de la fórmula (I), se puede hacer mención de un subgrupo de resto de la fórmula (Ia), que se puede representar del siguiente modo:

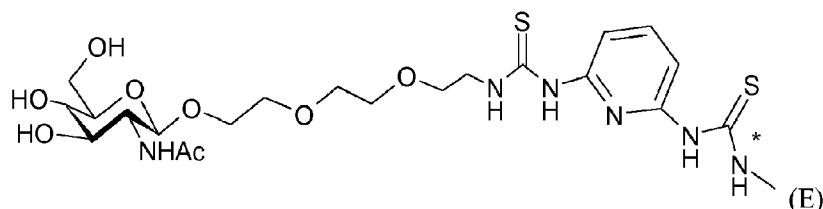
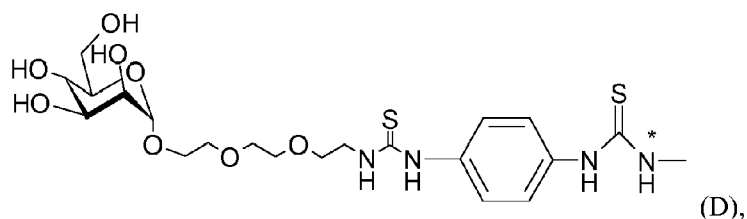


en donde

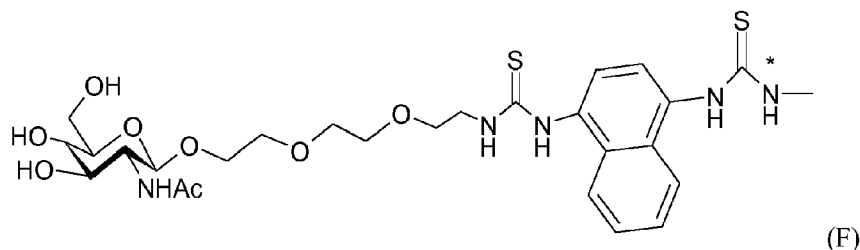
n varía desde 0 hasta 5000, en particular desde 1 hasta 2000, e incluso más particularmente desde 3 hasta 100.

El resto de la fórmula (I) se puede seleccionar de





5 y



Dicho resto de la fórmula (C) corresponde a un resto de la fórmula (Ia) en donde n es igual a 3.

Según otra realización particular, el ligando L es un agente de apantallamiento estérico para evitar interacciones de anticuerpos neutralizantes, en particular derivadas de polímeros sintéticos, tales como polietilenglicol (PEG) o pHPMA.

Según una realización adicional, el ligando L es un agente de marcado, en particular para transferencia génica analítica con, por ejemplo, colorante fluorescente o nanopartículas de oro, tales como fluoresceína, rodamina, Alexa Fluor, Bodipy o colorante radiactivo, tal como ^{18}F , $^{124,125,131}\text{I}$, ^{64}Cu o ^{67}Cu .

Según una realización adicional, el ligando L es un agente magnético, tal como partículas de hierro.

Se puede acoplar un ligando de diversa naturaleza a la partícula de vector del virus adenoasociado recombinante (rAAV) por acoplamiento químico simultáneo o cronológico sobre la cápside.

Método de acoplamiento

El "acoplamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a la modificación química del amino primario de dichos grupos amino primarios que están presentes sobre la superficie de la partícula de AAV con formación de enlaces químicos covalentes. El acoplamiento se refiere a un procedimiento que mantiene la integridad estructural de la partícula de AAV y sus funciones de proteína central. Solo se modifican algunos grupos amino primarios sobre la superficie de la cápside.

El acoplamiento se puede realizar en una disolución acuosa tamponada.

El tiempo de incubación puede variar entre 1 y 24, y más particularmente durante 4 h.

La temperatura de incubación puede variar entre 20 y 50 °C, e incluso más particularmente a temperatura ambiente.

La reacción se puede llevar a cabo en sistemas tampón con un pH comprendido entre 7 y 9,6, en particular entre 9,2 y 9,4, por ejemplo, con agitación vorticial.

Los sistemas tampón se pueden seleccionar de solución salina tamponada con TRIS, tampón carbonato sódico - bicarbonato sódico, PBS, dPBS. El sistema de tampón preferido es solución salina tamponada con TRIS (TBS).

La cantidad de reactivo de la fórmula (II) puede variar entre 1E5 y 1,5E7 equivalentes molares, en particular entre 3E5 y 3E6 equivalentes molares.

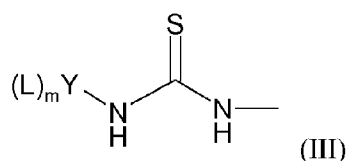
Después de la etapa de acoplamiento, se añade Pluronic (0,001 %) a la disolución antes de la diálisis.

Como etapa adicional, las moléculas libres se pueden retirar por filtración de flujo tangencial o diálisis (4 baños contra dPBS + 0.001 % de Pluronic durante un periodo de 24 h).

El proceso puede ir seguido de valoración de las partículas por qPRC y caracterizaciones (DLS, transferencia por puntos y Western).

Las condiciones experimentales, y más particularmente la relación molar, usada para el acoplamiento puede modular el acoplamiento de un ligando sobre la superficie de la cápside de AAV2. Se usará para determinar la mejor relación que pueda aumentar el índice terapéutico de estas partículas.

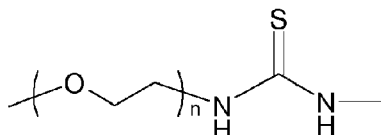
Según una realización particular, la presente invención se refiere al método para acoplar químicamente una partícula de vector de virus adenoasociado (AAV) con al menos un ligando L, en donde el resto (L)mX- de B es de la fórmula (III)



en donde L es como se ha definido anteriormente e Y es un grupo orgánico bi- o multivalente, comprendiendo dicho grupo orgánico desde 1 hasta 39 átomos de carbono, desde 0 hasta 20 átomos de oxígeno, desde 0 hasta 6 átomos de nitrógeno y desde 0 hasta 1 átomo de azufre.

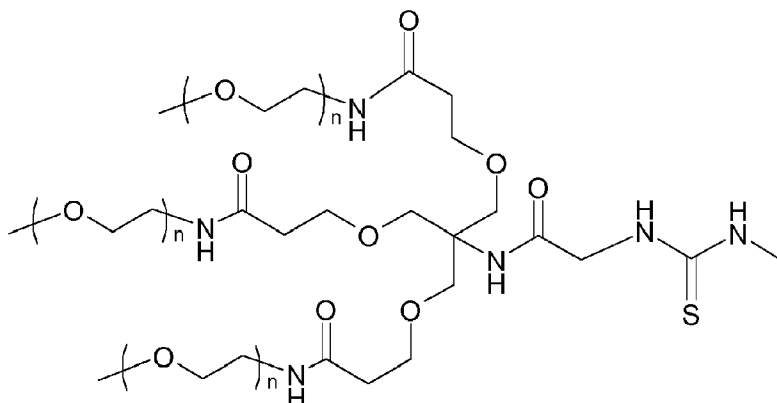
Según una realización adicional, la presente invención se refiere a un método, en donde X representa:

- un grupo



en donde n representa un número entero desde 0 hasta 5000, en particular desde 1 hasta 500, desde 2 hasta 100, e incluso más particularmente desde 3 hasta 20, y por ejemplo es igual a 3, o

- un grupo



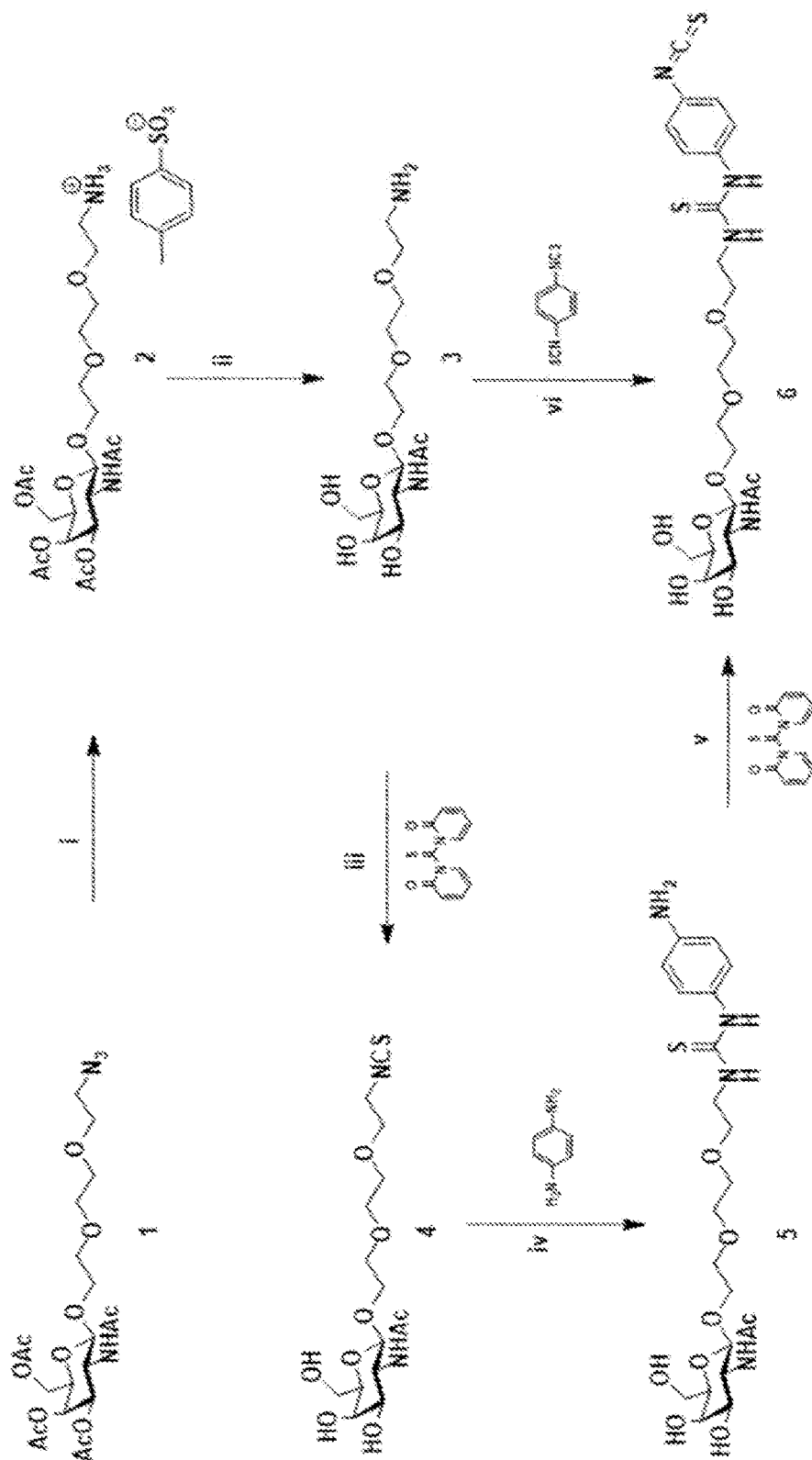
en donde n representa un número entero desde 0 hasta 5000, en particular desde 1 hasta 2000, e incluso más particularmente desde 3 hasta 100, y es particularmente 3.

Los reactivos de la fórmula (II) se pueden obtener según métodos conocidos por el experto en la técnica.

Una forma de ilustración de la preparación del reactivo de la fórmula (II), útil para obtener el resto de la fórmula (B) como se ha descrito anteriormente, se detalla en lo sucesivo en el Esquema 1.

Se obtiene el compuesto 6 referente a la fórmula (II), cuya preparación se describe más en el Ejemplo 1 en el presente documento posteriormente.

Esquema 1



El compuesto **1** se puede hacer reaccionar en la etapa (i) con ácido paratoluenosulfónico (APTS), en disolvente polar, por ejemplo en etanol, y más particularmente en etanol bajo una atmósfera de hidrógeno y en presencia de un catalizador, por ejemplo Pd-C o Pd(OH)₂. El compuesto **2** obtenido se puede hacer reaccionar a continuación en una etapa (ii) con una resina de intercambio aniónico fuertemente básica, por ejemplo Amberlite IRN78, para obtener el compuesto **3**.

Método A para la síntesis del compuesto 6

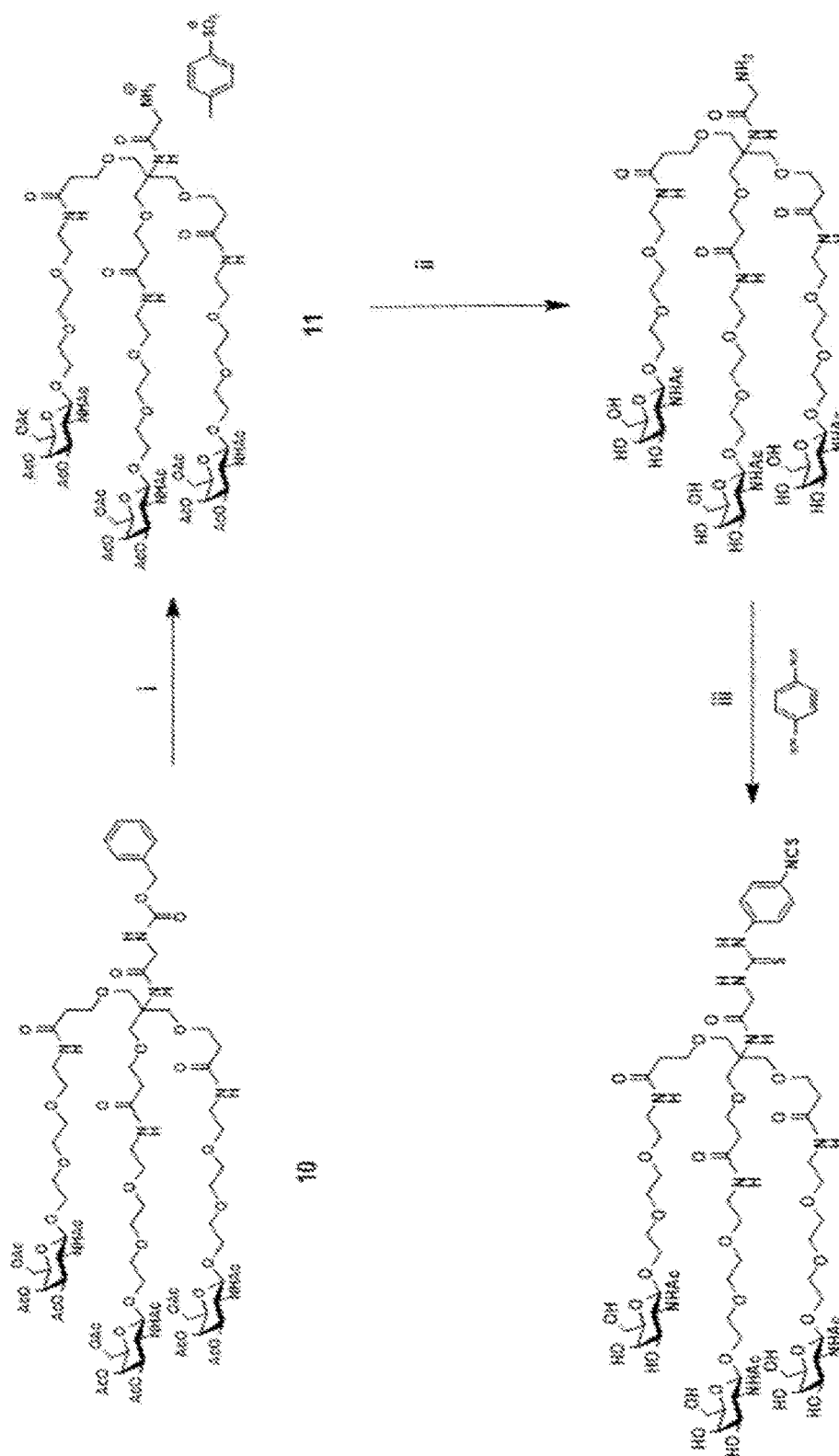
Según una primera realización, el compuesto **3** se puede hacer reaccionar para proporcionar el compuesto **4** en una etapa (iii), haciendo reaccionar 1,1'-tiocarbonildi-2(1H)-piridona en un disolvente, por ejemplo, DMF. El compuesto obtenido **4** se puede hacer reaccionar a continuación en una etapa (iv) con p-fenilendiamina, en un disolvente, por ejemplo DMF, por ejemplo, a una temperatura que varía desde 40 hasta 100 °C, y por ejemplo a 60 °C, y preferentemente bajo una atmósfera inerte, en particular bajo una atmósfera de nitrógeno para proporcionar el compuesto **5**.

Dicho compuesto **5** se puede hacer reaccionar a continuación con 1,1'-tiocarbonildi-2(1H)-piridona en una etapa (v), en un disolvente, por ejemplo DMF, por ejemplo, a una temperatura que varía desde 40 hasta 100 °C y, por ejemplo, a 60 °C, y preferentemente bajo una atmósfera inerte, en particular bajo una atmósfera de nitrógeno para proporcionar el compuesto **6**.

Método B para la síntesis del compuesto 6

Según una segunda realización, el compuesto **3** se puede hacer reaccionar con p-fenilendiisotiocianato en una etapa (vi), en un disolvente, por ejemplo, DMF, por ejemplo, a temperatura ambiente y preferentemente bajo una atmósfera inerte, en particular bajo una atmósfera de nitrógeno para proporcionar el compuesto **6**.

Una forma de ilustración de la preparación del reactivo de la fórmula (II), útil para obtener el resto de la fórmula (C) como se ha descrito anteriormente, se detalla en lo sucesivo en el Esquema 2. Se obtiene el compuesto **13** que se refiere a la fórmula (II), cuya preparación se describe más en el Ejemplo 1 en el presente documento posteriormente.

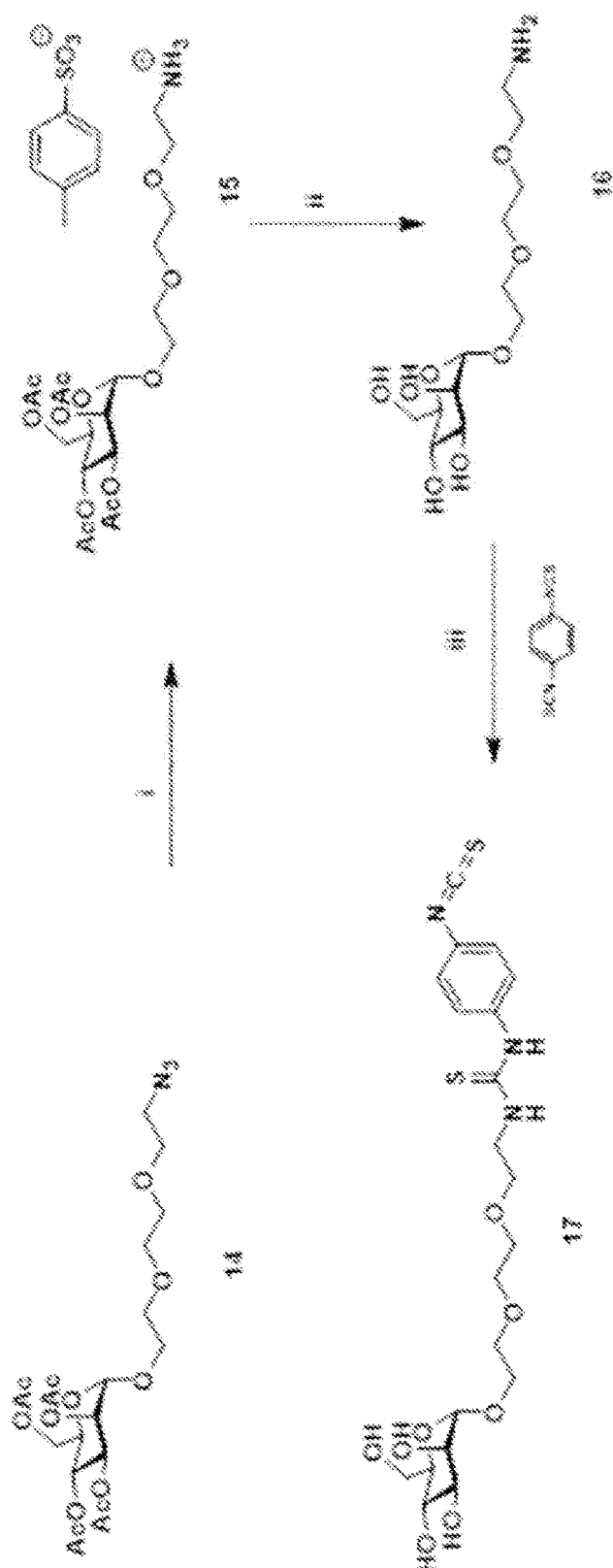
Esquema 2

Como es evidente del Esquema 2 anterior, el compuesto **11** se puede disolver en un disolvente, en particular etanol seco, que se puede hacer reaccionar con ácido paratoluenosulfónico (APTS), en disolvente polar y más particularmente en etanol bajo una atmósfera de hidrógeno y en presencia de un catalizador, por ejemplo Pd-C o Pd(OH)₂. La reacción se puede agitar a continuación bajo una atmósfera de hidrógeno. Después de una posible etapa de filtración y evaporación, la reducción del azoturo se puede confirmar por CCF y espectrometría ¹H RMN. El producto

en bruto se puede hacer reaccionar a continuación con una resina de intercambio aniónico fuertemente básica, por ejemplo Amberlite IRN78, para obtener el compuesto **12**.

5 El compuesto **12** se puede hacer reaccionar con p-fenilendiisotiocianato en una etapa (iii), en un disolvente, por ejemplo DMF, por ejemplo a temperatura ambiente y preferentemente bajo una atmósfera inerte, en particular bajo una atmósfera de nitrógeno para proporcionar el compuesto **13**.

10 Una forma de ilustración de la preparación del reactivo de la fórmula (II), útil para obtener el resto de la fórmula (D) como se ha descrito anteriormente, se detalla en lo sucesivo en el Esquema 3. Se obtiene el compuesto **17** que se refiere a la fórmula (II), cuya preparación se describe más en el Ejemplo 1 en el presente documento posteriormente.

Esquema 3

El compuesto **14** se puede hacer reaccionar en la etapa (i) con ácido paratoluenosulfónico (APTS), en disolvente polar, por ejemplo en etanol, y más particularmente en etanol bajo una atmósfera de hidrógeno y en presencia de un catalizador, por ejemplo, Pd-C o Pd(OH)₂. El compuesto **15** obtenido se puede hacer reaccionar a continuación en una

etapa (ii) con una resina de intercambio aniónico fuertemente básica, por ejemplo Amberlite IRN78, para obtener el compuesto **16**.

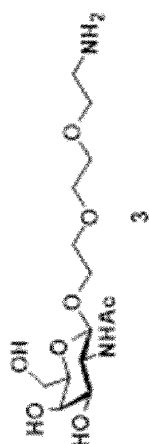
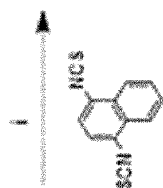
5 El compuesto **16** se puede hacer reaccionar con p-fenilendiisotiocianato en una etapa (iii), en un disolvente, por ejemplo DMF, por ejemplo, a temperatura ambiente y preferentemente bajo una atmósfera inerte, en particular bajo una atmósfera de nitrógeno para generar el compuesto **17**.

10 Una forma de ilustración de la preparación del reactivo de la fórmula (II), útil para obtener el resto de la fórmula (E) y (F) como se ha descrito anteriormente, se detalla en lo sucesivo en el Esquema 4. Se obtienen los compuestos **18** y **19** que se refieren a la fórmula (II), cuya preparación se describe más en el Ejemplo 1 en el presente documento posteriormente.

Esquema 4



El compuesto **3** se puede hacer reaccionar con 2,6-piridindiisotiocianato en una etapa (i), en un disolvente, por ejemplo DMF, por ejemplo, a temperatura ambiente y preferentemente bajo una atmósfera inerte, en particular bajo una atmósfera de nitrógeno para generar el compuesto **18**.



El compuesto **3** se puede hacer reaccionar con 1,4-naftalenodiisotiocianato en una etapa (i), en un disolvente, por ejemplo DMF, por ejemplo, a temperatura ambiente y preferentemente bajo una atmósfera inerte, en particular bajo una atmósfera de nitrógeno para generar el compuesto **19**.

Como se ilustra en el Ejemplo 2 en el presente documento posteriormente, la presencia de un resto aromático entre la función de tiourea y el ligando L, o dentro del ligando L cuando



forma parte de un ligando L, parece desempeñar una función importante para el logro del injerto del reactivo de la fórmula (II) en la cápside de AAV.

Como también se deduce del Ejemplo 2, y más particularmente el Ejemplo 2.8, el rendimiento de la reacción de acoplamiento a un pH superior a 9 también parece ser una característica esencial. Puede observarse que la resistencia al pH podría ser dependiente del serotipo de AAV que se ha usado. En el Ejemplo 2, se usó pH >9 para AAV2, pero otros serotipos podrían tener una susceptibilidad diferente al pH.

Ventajosamente, los inventores han descubierto que los rAAV obtenidos retienen infectividad, como se ilustra en los ejemplos, y más particularmente en el Ejemplo 2.8.

Según una realización particular, la partícula de vector del virus adenoasociado recombinante (rAAV) obtenida puede hacerse reaccionar posteriormente para modificar las proteínas de la cápside en una segunda etapa de acoplamiento, en particular por acoplamiento químico con grupos amino sin reaccionar de la primera etapa de acoplamiento.

Partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) y sus aplicaciones

Una partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) obtenida por un método para producirla según la presente invención también forma parte de la divulgación no cubierta por las reivindicaciones.

Las células a las que se dirigen los vectores de rAAV de la invención pueden derivar de un humano, y otros mamíferos, tales como primates, caballo, ovejas, cabra, cerdo, perro, rata y ratón.

Los vectores de rAAV pueden dirigirse a cualquier tipo de célula, tejido u órgano sin limitación. Los ejemplos de células a las que se pueden administrar los rAAV incluyen, pero no se limitan a, hepatocitos; células de la retina; es decir, fotorreceptores, epitelio pigmentario de la retina (RPE), bipolar; células de músculo, es decir, mioblastos, células satélite; células del sistema nervioso central (SNC), es decir, neuronas, glía; células del corazón; células del sistema nervioso periférico (SNP); osteoblastos; células tumorales, linfocitos y similares. Los ejemplos de tejidos y órganos a los que se pueden administrar los vectores de rAAV incluyen hígado, músculo, músculo cardíaco, músculo liso, cerebro, hueso, tejido conjuntivo, corazón, riñón, pulmón, ganglio linfático, glándula mamaria, mielina, próstata, testículos, timo, tiroides, tráquea y similares. Los tipos de células preferidos son hepatocitos, células de músculo, células del SNC y células del SNP. Los tejidos y órganos preferidos son hígado, músculo, corazón, ojo y cerebro.

La partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según la presente invención se puede usar para alterar el tropismo de la partícula de vector de virus adenoasociado (AAV) y en particular para su direccionamiento a un órgano específico deseado, tejido o tipos de células; para acentuar la transducción de una célula o tejido específico o para disminuir la interacción con anticuerpos neutralizantes. Esta hipótesis está de acuerdo con los datos publicados por Moskalenko et al. (Moskalenko, M., et al., Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. J Virol, 2000. 74(4): p. 1761-6) donde han identificado un subconjunto de seis péptidos, que reconstituyen posiblemente un único epítipo neutralizante. Lo que es importante observar es que tres de estos péptidos son llevados por al menos una amina primaria. La modificación química de estas aminas primarias podría afectar en teoría favorablemente los patrones de seroneutralización preexistentes, como ya se ha demostrado para AAV2 PEGilado (Lee, G.K., et al., PEG conjugation moderately protects adeno-associated viral vectors against antibody neutralization. Biotechnol Bioeng, 2005. 92(1): p. 24-34; Le, H.T., et al., Utility of PEGylated recombinant adeno-associated viruses for gene transfer. J Control Release, 2005. 108(1): p. 161-77).

Según una realización, la partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) proporciona una elevada selectividad hacia el tipo de célula o elevada especificidad de direccionamiento.

El órgano o tejido específico puede ser, por ejemplo, hígado, corazón, cerebro, retina o músculo esquelético.

El tipo de célula específico puede ser, por ejemplo, hepatocitos, cardiomiocitos, miocitos, neuronas, células epiteliales pigmentarias de la retina o fotorreceptores.

La partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) modificada químicamente presenta la ventaja de permitir la disminución de la dosis terapéutica de dicha partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) o mejorar la eficacia y/o toxicidad a la misma dosis de un AAV no modificado. Dicha partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según la presente invención también puede ser ventajosa para alterar la respuesta humoral a dicha partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV).

La presente invención se refiere además a la partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según la invención, para su uso como un medicamento, en particular para administrar ácidos nucleicos terapéuticos o para inducir la edición del genoma; como un medio profiláctico; como un medio de diagnóstico, tal como un agente de obtención de imágenes o para su uso para estudios de eficiencia para genoterapia.

La partícula de vector recombinante rAAV se puede usar para administrar ácidos nucleicos a células diana.

La partícula de vector recombinante rAAV se puede administrar *in vivo* o *ex vivo*.

5 La partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según la invención puede dedicarse a alterar el tropismo del virus adenoasociado (AAV) y en particular para dirigirse a un órgano específico deseado, tejido o tipos de células, o para acentuar la transducción de una célula o tejido específico.

10 La partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según la invención también puede dedicarse a alterar la respuesta humoral a dicha partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV).

La partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según la invención también puede dedicarse a disminuir la interacción con anticuerpos neutralizantes.

15 Según una realización, la partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) reduce o previene la unión de anticuerpos a su superficie, reduciéndose o previniéndose así su depuración mediada por anticuerpo.

20 La partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según la invención puede tener un tropismo selectivo por hepatocitos, retina, pulmón, corazón, riñón, hígado, cerebro, bazo, células tumorales o musculares, y más particularmente por hepatocitos, epitelio pigmentario de la retina (RPE), fotorreceptores, miocitos o cardiomiocitos.

25 Como una ilustración de las ventajas de la presente invención, y como se deduce de los siguientes ejemplos, la modificación química de partículas de AAV2 permite vencer algunas, si no todas, de las limitaciones anteriores conocidas clásicamente cuando se usan partículas de AAV.

Dichas limitaciones pueden exponerse a continuación:

30 • La transducción de hepatocitos por AAV2 es baja en todos los mamíferos, incluyendo a seres humanos.

• Para lograr beneficio terapéutico es necesario inyectar altas dosis de vector ($\sim 10^{12}$ partículas de AAV2 por kg) que pueden provocar una toxicidad inmunitaria perjudicial para el efecto terapéutico.

35 • No solo hepatocitos, sino también otros tipos de células del compartimento reticuloendotelial del hígado —que representan hasta el 30 % del hígado—, son transducidas por AAV2. Esta "dispersión" del perfil de transducción reduce el índice terapéutico de AAV.

40 • La inyección sistémica de AAV2 induce o activa una respuesta de linfocitos T que con el tiempo conduce a la eliminación de las células transducidas.

• Más del 80 % de la población humana tiene anticuerpos neutralizantes contra AAV2 que excluye la eficiente transducción, a menos que se administren grandes cantidades de partículas víricas.

45 La introducción de un ligando, un derivado de N-acetilgalactosamina (GalNAc), tal como el compuesto **6** y **13** como se ha descrito anteriormente, en la superficie de la partícula de AAV2 aumenta la transducción selectiva de hepatocitos a través del receptor de asialoglucoproteína (ASPG_r).

50 Entre otros tejidos diana selectivos, se pueden citar los siguientes: el epitelio pigmentario de la retina (RPE), el músculo esquelético.

55 La estrategia para dirigirse a los hepatocitos permite reducir los eventos de transducción inespecífica en el sistema reticuloendotelial hepático, así como otras dianas periféricas (bazo, corazón, pulmón...). En conjunto, la modificación química según la presente invención da como resultado la mejora del índice terapéutico y también disminuye la sensibilidad de dicha partícula de vector del virus adenoasociado recombinante (rAAV) a anticuerpos neutralizantes preexistentes y/o altera la respuesta humoral a la cápside modificada.

60 Por lo tanto, según otro de sus aspectos, la presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende la partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según la invención, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La administración de dicha composición a las células hospedadoras o células diana se puede realizar para una variedad de fines terapéuticos y otros.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener más particularmente una dosis eficaz de al menos una partícula de vector del virus adenoasociado recombinante (rAAV) según la invención.

5 Una "dosis eficaz" significa una cantidad suficiente para inducir una modificación positiva en la condición a regular o tratar, pero suficientemente baja para evitar efectos secundarios graves. Una cantidad eficaz puede variar con el efecto farmacéutico a obtener o con la afección particular que está tratándose, la edad y el estado físico del usuario final, la intensidad de la afección que se trata/previene, la duración del tratamiento, la naturaleza de otros tratamientos, el compuesto específico o composición empleado, la vía de administración, y factores similares.

10 Un experto habitual en la técnica de las formulaciones terapéuticas será capaz, sin experimentación excesiva y basándose en su conocimiento personal, de determinar una dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención para una indicación dada.

15 Una composición farmacéutica de la invención se puede formular con cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable conocido adecuado según la dosis, la forma galénica, la vía de administración y similares.

20 Como se usa en el presente documento, "excipientes farmacéuticamente aceptables" incluyen todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares. Excepto en la medida de que cualquier excipiente convencional sea incompatible con los compuestos activos, se contempla su uso en un medicamento o composición farmacéutica de la invención.

25 La partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) de la invención también se puede usar en un método para la administración de una secuencia de nucleótidos de interés a una célula diana. El método puede ser en particular un método de administración de un gen terapéutico de interés a una célula de un sujeto que lo necesita.

30 La invención permite la expresión *in vivo* de un polipéptido, proteína u oligonucleótido codificado por una secuencia de ADN exógeno terapéutico en células en un sujeto de forma que se expresen niveles terapéuticos del polipéptido, proteína u oligonucleótido. Estos resultados se observan con tanto modos *in vivo* como *in vitro* de administración de partículas de vector del virus adenoasociado recombinante (rAAV).

35 La invención no se debe considerar limitante con respecto al método de administración. Por ejemplo, la administración puede ser tópica, intratisular (por ejemplo, intramuscular, intracardiaca, intrahepática, intrarrenal, intracerebral), conjuntiva (por ejemplo, extraorbital, intraorbital, retrorobital, intrarretiniana, subretiniana), mucosa (por ejemplo, oral, rectal, nasal, pulmonar), intratecal, intravesical, intracraneal, sistémica, intraperitoneal, subcutánea, cutánea, intravascular (por ejemplo, intravenosa, intrarterial) e intralinfática. En otros aspectos, transducción pasiva de tejido a través de infusión intravascular a alta presión, por ejemplo, infusión intravenosa o intrarterial.

40 Además, la administración no se limita a una especie de vector de rAAV. Como tal, en otro aspecto, múltiples vectores de rAAV que comprenden diferentes secuencias de ADN exógeno se pueden administrar simultáneamente o uno detrás de otro a la célula diana, tejido, órgano, o sujeto. Por lo tanto, esta estrategia puede permitir la expresión de múltiples genes.

45 Según una realización particular de la presente invención, la partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) se administra por vía intravenosa.

El experto en la técnica puede determinar fácilmente dosis adecuadas del rAAV, que dependen de la afección que está tratándose, la salud, la edad y el peso del sujeto que se va a tratar, pero que también dependen de la administración y del tejido.

50 Por ejemplo, para la retina se pueden requerir 10^{11} vg/paciente y para administraciones sistémicas como hemofilia, atrofia muscular espinal (SMA) o distrofia muscular de Duchenne (DMD) la dosis requerida puede ser superior a 10^{14} vg/paciente.

55 La invención también se refiere a dicha partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV), para su uso en un método de diagnóstico o para su uso en genoterapia, en particular para tratar trastornos genéticos o trastornos adquiridos, que incluyen insuficiencia cardíaca, trastornos neurológicos, trastornos musculares, tales como distrofia muscular de Duchenne (DMD), enfermedades hepáticas, trastornos de la sangre, trastornos metabólicos, patologías oculares o cáncer (incluyendo retinopatías). Por lo tanto, dicha partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) se puede usar para inmunoterapias y vacunación.

60 Según una realización particular, dicha partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) es más particularmente útil para las indicaciones seleccionadas de enfermedades genéticas hepáticas, retinianas y neuromusculares.

La presente invención se refiere además a un método de administración de rAAV de la invención a un sujeto que lo necesita, que comprende al menos una etapa de administración de una composición que comprende al menos un rAAV de la invención.

- 5 La presente invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos y figuras que se proporcionan para fin ilustrativo solo y no se deben interpretar como limitantes en modo alguno de la presente invención.

EJEMPLOS

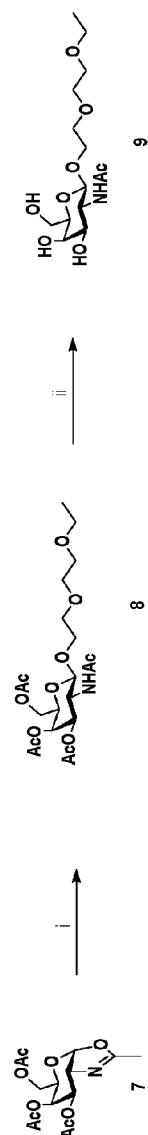
10 MATERIAL

- Todos los reactivos químicos se compraron de Acros Organics o Aldrich y se usaron sin más purificación. Las proteínas de la cápside de AAV (B1), A20 policlona de conejo y monoclona de ratón se obtuvieron de PROGEN Biotechnik. Anti-fluoresceína-AP, fragmentos Fab (Sigma-Aldrich) para la detección de compuestos marcados con fluoresceína se obtuvieron de Roche. Se compró FITC-aglutinina de soja (SBA) de Vector Laboratories. Las reacciones que requirieron condiciones anhidras se realizaron bajo nitrógeno. Todos los compuestos se caracterizaron completamente por espectroscopía ¹H RMN (400,133 o 300,135 MHz), ¹³C (125,773 o 75,480 MHz) (espectrómetro Bruker Avance 300 Ultra Shield o Bruker Avance III 400). Los desplazamientos químicos se informan en partes por millón (ppm); las constantes de acoplamiento se informan en unidades de hercio [Hz]. Se usaron las siguientes abreviaturas: s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuádruplete, quin = quintuplete, a = singlete ancho. Cuando se necesitó, se usaron HMQC y HMBC ¹³C heteronuclear para establecer inequívocamente estructuras. Se registraron espectros de masas de alta resolución (HRMS) con un espectrómetro LTQ-orbitrap híbrido (ESI⁺) de Thermofisher y un espectrómetro Autoflex III SmartBeam espectrómetro (MALDI) de Bruker.
- 25 Todos los productos se purificaron por cromatografía ultrarrápida (sistema de cromatografía ultrarrápida GRACE REVELERIS) equipado con detectores de UV y DLS.

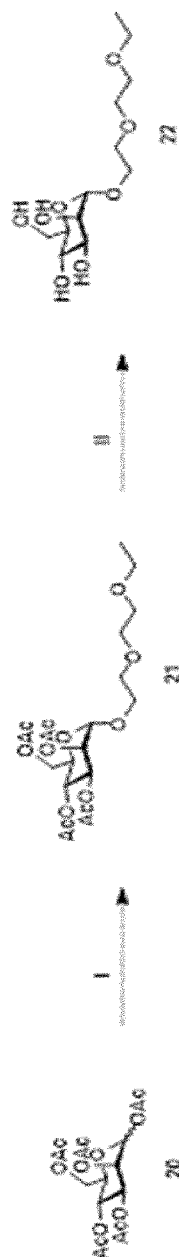
El compuesto **13** se ha purificado por HPLC usando UPLC clase H de Waters.

30 EJEMPLO 1 : Síntesis del reactivo de la fórmula (II) y reactantes comparativos

Esquema para la síntesis del reactante comparativo 9



i: DCM, 2-(2-etoxietoxi)etanol, tamices moleculares; ii: MeOH/H₂O, IRN78.

Esquema para la síntesis del reactante comparativo 22

i: DCM, 2-(2-etoxi)etanol, SnCl₄, TFA-Ag; ii: MeOH/H₂O, IRN78.

5 Los compuestos **1**, **7**, **10**, 2,6-piridindiisotiocianato y 1,4-naftalenodiisotiocianato como ya se definieron anteriormente en la descripción se sintetizaron según la bibliografía y más particularmente según los dos siguientes artículos y patente:

- 10 - [1] Rensen PC et al. "Design and synthesis of novel N-acetylgalactosamine-terminated glycolipids for targeting of lipoproteins to the hepatic asialoglycoprotein receptor". Journal of medicinal chemistry. 2004;47:5798-808, y
- 15 - [2] Rajeev KG, et al. "Inhibitory RNA interference agents modified with saccharide ligands" Patente WO 2012037254. 2012.
- [3] Chevolot Y, et al. "DNA-Based Carbohydrate Biochips: A Platform for Surface Glyco-Engineering". Angewandte Chemie International Edition, 2007;46:2398-2402.
- 20 - [4] Nagarajan, K., et al. "Quest for anthelmintic agents. Part I. Para substituted phenylisothiocyanates, heterocyclisothiocyanates and bisisothiocyanates". Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 48(3), 53-9; 1986.

Se disolvió **1** (284 mg, 0,56 mmoles) en etanol seco, a continuación se añadió APTS (107 mg, 0,56 mmoles) seguido de la adición de 10 % de Pd-C (10 % en peso). Después de tres ciclos de vacío/H₂, la reacción se agitó durante la noche a 20 °C bajo atmósfera de H₂. A continuación se filtró la disolución y se evaporó a presión reducida. La reducción del azoturo se confirmó por CCF y ¹H RMN. Después de la evaporación, se añadieron 10 ml de metanol y 10 ml de agua al producto en bruto, seguido de la adición de la resina Amberlite IRN78. La reacción se agitó 3 h a 20 °C, a continuación se filtró y se evaporó a presión reducida. (rendimiento: **3** = 77 %).

Compuesto **3**: ¹H NMR (MeOD): 2.0 (s, 3H, NAc), 2.79 (t, 2H, CH₂NH₂, J_{H-H} = 5.2 Hz), 3.4-4.0 (m, 16H, CH₂O, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4.44 (d, 1H, H-1, J₁₋₂ = 8.4 Hz) ; ¹³C NMR (MeOD): 23.1, 42.1, 54.3, 62.6, 69.7, 69.8, 71.3, 71.5, 71.6, 73.5, 73.6, 76.8, 103.1, 174.2 ; HRMS (MALDI) for C₁₄H₂₉N₂O₈ [M+H]⁺, calcd 353.1924 found 353.1918.

Se disolvió el compuesto **3** (162 mg, 0,46 mmoles) en DMF seca, a continuación se añadió 1,1'-tiocarbonildi-2(1H)-piridona (117 mg, 0,51 mmoles) y la reacción se agitó durante la noche a 20 °C bajo atmósfera de N₂. A continuación se evaporó la disolución a presión reducida y se purificó por cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH desde 100/0 hasta 80/20). (rendimiento: **4** = 88 %).

Compuesto **4**: ¹H NMR (MeOD): 2.0 (s, 3H, NAc), 3.4-4.0 (m, 19H, CH₂O, CH₂NCS, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4.44 (d, 1H, H-1, J₁₋₂ = 8.4 Hz) ; ¹³C NMR (MeOD): 23.1, 46.3, 54.3, 62.6, 69.7, 69.8, 70.5, 71.5, 71.6, 73.5, 73.6, 76.8, 103.1, 133.2, 174.2 ; HRMS (MALDI) for C₁₅H₂₆N₂O₈NaS [M+Na]⁺, calcd 417.1308 found 417.1318.

Método A para la síntesis de 6

Se disolvió **4** (50 mg, 0,13 mmoles) en DMF seca, luego se añadió p-fenilendiamina (28 mg, 0,26 mmoles) y la reacción se agitó durante la noche a 70 °C bajo atmósfera de N₂. A continuación se evaporó la disolución a presión reducida y se purificó por cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH desde 100/0 hasta 80/20). (rendimiento: **5** = 74 %).

Compuesto **5**: ¹H NMR (MeOD): 1.97 (s, 3H, NAc), 3.4-4.0 (m, 17H, CH₂O, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4.43 (d, 1H, H-1, J₁₋₂ = 8.4 Hz), 6.72 (d, 2H, J_{H-H} = 8.8 Hz), 6.98 (d, 2H, J_{H-H} = 8.8 Hz) ; ¹³C NMR (MeOD): 23.1, 45.4, 54.4, 62.6, 69.7, 69.8, 70.4, 71.4, 71.5, 71.6, 73.4, 76.8, 103.1, 2*116.9, 2*128.1, 128.3, 148.3, 174.1, 182.4 ; HRMS (MALDI) for C₂₁H₃₅N₄O₈S [M+H]⁺, calcd 503.2176 found 503.2171.

Se disolvió **5** (47 mg, 0,093 mmoles) en DMF seca, a continuación se añadió 1,1'-tiocarbonildi-2(1H)-piridona (24 mg, 0,102 mmoles) y la reacción se agitó durante la noche a 60 °C bajo atmósfera de N₂. A continuación se evaporó la disolución a presión reducida y se purificó por cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH desde 100/0 hasta 80/20). (rendimiento: **6** = 60 %).

Compuesto **6**: ¹H NMR (MeOD): 1.99 (s, 3H, NAc), 3.4-4.0 (m, 17H, CH₂O, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4.42 (d, 1H, H-1, J₁₋₂ = 8.4 Hz), 7.24 (d, 2H, J_{H-H} = 8.8 Hz), 7.54 (d, 2H, J_{H-H} = 8.8 Hz) ; ¹³C NMR (MeOD): 23.2, 45.4, 54.3, 62.6, 69.7, 69.9, 70.3, 71.4, 71.5, 71.6, 73.4, 76.8, 103.2, 2*125.8, 2*127.1, 128.5, 136.6, 139.8, 174.2, 182.5 ; HRMS (MALDI) for C₂₂H₃₃N₄O₈S₂ [M+H]⁺, calcd 545.1740 found 545.1742.

Método B para la síntesis de 6

Se disolvió **3** (64 mg, 0,18 mmoles) en DMF seca, luego se añadió p-fenilendiisotiocianato (175 mg, 0,9 mmoles) y la reacción se agitó durante 2 h a 20 °C bajo atmósfera de N₂. A continuación se evaporó la disolución a presión reducida y se purificó por cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH desde 100/0 hasta 80/20). (rendimiento: **6** = 85 %).

Compuesto **6**: ¹H NMR (MeOD): 1.99 (s, 3H, NAc), 3.4-4.0 (m, 17H, CH₂O, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4.42 (d, 1H, H-1, J₁₋₂ = 8.4 Hz), 7.24 (d, 2H, J_{H-H} = 8.8 Hz), 7.54 (d, 2H, J_{H-H} = 8.8 Hz) ; ¹³C NMR (MeOD): 23.2, 45.4, 54.3, 62.6, 69.7, 69.9, 70.3, 71.4, 71.5, 71.6, 73.4, 76.8, 103.2, 2*125.8, 2*127.1, 128.5, 136.6, 139.8, 174.2, 182.5 ; HRMS (MALDI) for C₂₂H₃₃N₄O₈S₂ [M+H]⁺, calcd 545.1740 found 545.1742.

Se disolvió el compuesto **7** (981 mg, 2,98 mmoles) en DCM seco, a continuación se añadió 2-(2-etoxietoxi)etanol (404 µl, 2,98 mmoles) y se añadieron tamices moleculares y la disolución se agitó durante 0,5 h a 20 °C bajo atmósfera de N₂. Entonces se añadió TMSOTf (270 µl, 1,49 mmoles) a la disolución a 0 °C bajo atmósfera de N₂. La disolución se agitó 0,5 h a 0 °C y durante la noche a 20 °C bajo atmósfera de N₂. Después de la evaporación el residuo se disolvió en DCM, se lavó respectivamente con NaHCO₃ acuoso saturado, agua y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. A continuación se evaporó la disolución a presión reducida y se purificó por cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH desde 100/0 hasta 95/5). (rendimiento: **8** = 73 %).

Compuesto **8**: ¹H NMR (MeOD): 1.19 (t, 3H, CH₃, J_{H-H} = 7.2 Hz), 1.93 (s, 3H, OCH₃), 1.94 (s, 3H, OCH₃), 2.03 (s, 3H, OCH₃), 2.14 (s, 3H, NAc), 3.5-4.2 (m, 14H, CH₂O, H-2, H-5, H-6), 4.67 (d, 1H, H-1, J₁₋₂ = 8.4 Hz), 5.04 (dd, 1H³, J₃₋₄ = 3.2 Hz, J₃₋₂ = 11.2 Hz), 5.33 (d, 1H-4, J₃₋₄ = 3.2 Hz) ; ¹³C NMR (MeOD): 15.4, 20.5, 2*20.6, 22.9, 51.6, 54.8, 62.7, 67.6, 68.2, 70.0, 70.9, 71.6, 71.8, 72.3, 102.8, 171.7, 2*172.1, 173.5 ; HRMS (MALDI) for C₂₀H₃₄NO₁₁ [M+H]⁺, calcd 464.2132 found 464.2141.

El compuesto **8** se disolvió en 10 ml de metanol y 10 ml de agua, luego se añadió resina Amberlite IRN78. La mezcla se agitó 3 h a 20 °C, luego se filtró y se evaporó a presión reducida. (rendimiento: **9** = 77 %).

5 Compuesto **9**: ¹H NMR (MeOD): 1.2 (t, 3H, J_{H-H} = 6.8 Hz), 1.99 (s, 3H, NAc), 3.4-4.0 (m, 16H, CH₂O, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4.45 (d, 1H, H-1, J₁₋₂ = 8.4 Hz); ¹³C NMR (MeOD): 15.4, 23.1, 54.3, 62.6, 67.6, 69.7, 69.8, 71.0, 71.6, 71.7, 73.6, 76.8, 103.1, 174.2; HRMS (MALDI) for C₁₄H₂₈NO₈ [M+H]⁺, calcd 338.1815 found 338.1819.

10 Se disolvió el compuesto **10** (100 mg, 0,052 mmoles) en etanol seco, luego se añadió APTS (10 mg, 0,052 mmoles) seguido de la adición de Pd-C (10 % en peso). Después de tres ciclos de vacío/H₂, la reacción se agitó durante la noche a 20 °C bajo atmósfera de H₂. A continuación se filtró la disolución y se evaporó a presión reducida. La reducción del azoturo se confirmó por CCF y ¹H NMR. Después de la evaporación, se añadieron 10 ml de metanol y 10 ml de agua al producto en bruto, seguido de la adición de la resina Amberlite IRN78. La reacción se agitó 3 h a 20 °C, a continuación se filtró y se evaporó a presión reducida. (rendimiento: **12** = 76 %).

15 Compuesto **12**: ¹H NMR (MeOD): 1.99 (s, 9H, NAc), 2.79 (t, 6H, CH₂CO, J_{H-H} = 6 Hz), 3.22 (s, 2H, CH₂NH₂), 3.4-4.0 (m, 66H, CH₂O, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4.44 (d, 3H, H-1, J₁₋₂ = 8.4 Hz), ¹³C NMR (MeOD): 3*23.1, 3*37.6, 3*40.4, 45.7, 3*54.3, 61.2, 3*62.6, 3*68.0, 3*69.7, 3*69.8, 3*70.2, 3*70.7, 3*71.4, 3*71.5, 3*71.6, 3*73.5, 3*76.8, 3*130.1, 3*174.0, 3*174.1, 175.35; HRMS (MALDI) for C₅₇H₁₀₅N₈O₃₁ [M+H]⁺, calcd 1397.6886 found 1397.6803.

20 Se disolvió el compuesto **12** (64 mg, 0,18 mmoles) en DMF seca, luego se añadió p-fenilendiisotiocianato (175 mg, 0,9 mmoles) y la reacción se agitó durante 2 h a 20 °C bajo atmósfera de N₂. A continuación se evaporó la disolución a presión reducida. El producto en bruto se lavó primero con DCM para retirar la mayoría del p-fenilendiisotiocianato y luego se purificó por HPLC preparativa. (rendimiento: **13** = 8 %).

25 Compuesto **13**: ¹H NMR (MeOD): 2.00 (s, 9H, NAc), 2.46 (t, 6H, CH₂CO, J_{H-H} = 6 Hz), 3.30-4.20 (m, 66H, CH₂O, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4.28 (s, 2H, CH₂NH₂), 4.46 (d, 3H, H-1, J₁₋₂ = 8.4 Hz), 7.29 (d, 2H, J_{H-H} = 9 Hz), 7.60 (d, 2H, J_{H-H} = 9 Hz); HRMS (MALDI) for C₆₅H₁₀₈N₁₀O₃₁NaS₂ [M+Na]⁺, calcd 1611.6521 found 1611.6487.

30 Se disolvió **14** (250 mg, 0,49 mmoles) en etanol seco, luego se añadió APTS (94,1 mg, 0,49 mmoles) seguido de la adición de 10 % de Pd-C (10 % en peso). Después de tres ciclos de vacío/H₂, la reacción se agitó durante la noche a 20 °C bajo atmósfera de H₂. A continuación se filtró la disolución y se evaporó a presión reducida. La reducción del azoturo se confirmó por CCF y ¹H RMN. Después de la evaporación, se añadieron 10 ml de metanol y 10 ml de agua al producto en bruto, seguido de la adición de la resina Amberlite IRN78. La reacción se agitó 3 h a 20 °C, a continuación se filtró y se evaporó a presión reducida. (rendimiento: **16** = 86 %).

35 Compuesto **16**: ¹H NMR (MeOD): 2.80 (t, 2H, CH₂NH₂, J_{H-H} = 5.4 Hz), 3.5-4.0 (m, 16H, CH₂O, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4.81 (d, 1H, H-1, J₁₋₂ = 1.8 Hz); HRMS (MALDI) for C₁₂H₂₆NO₈ [M+H]⁺, calcd 311.1603 found 311.1600.

40 Se disolvió **16** (105 mg, 0,34 mmoles) en DMF seca, luego se añadió p-fenilendiisotiocianato (325 mg, 1,7 mmoles) y la reacción se agitó durante 2 h a 20 °C bajo atmósfera de N₂. A continuación se evaporó la disolución a presión reducida y se purificó por cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH desde 100/0 hasta 80/20). (rendimiento: **17** = 85 %).

45 Compuesto **17**: ¹H NMR (MeOD): 3.5-4.0 (m, 18H, CH₂O, CH₂N, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4.82 (d, 1H, H-1, J₁₋₂ = 1.8 Hz); 7.26 (d, 2H, J_{H-H} = 8.8 Hz), 7.52 (d, 2H, J_{H-H} = 8.8 Hz); HRMS (MALDI) for C₂₀H₂₉N₃O₈NaS₂ [M+Na]⁺, calcd 526.1302 found 526.1294.

50 Se disolvió **3** (25 mg, 0,071 mmoles) en DMF seca, luego se añadió 2,6-piridindiisotiocianato (68 mg, 0,9 mmoles) y la reacción se agitó durante 2 h a 20 °C bajo atmósfera de N₂. A continuación se evaporó la disolución a presión reducida, se lavó varias veces con CH₃CN y DCM. (rendimiento: **18** = 42 %).

55 Compuesto **18**: ¹H NMR (DMSO): 1.79 (s, 3H, NAc), 3.2-4.6 (m, 18H, CH₂O, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4.28 (d, 1H, H-1, J₁₋₂ = 8.4 Hz), 7.07 (d, 1H, J_{H-H} = 7.5 Hz), 7.16 (d, 1H, J_{H-H} = 8.1 Hz), 7.60 (m, NH), 7.86 (t, 1H, J_{H-H} = 8.1 Hz); HRMS (MALDI) for C₂₁H₃₂N₅O₈S₂ [M+H]⁺, calcd 546.1697 found 546.1692.

Se disolvió **3** (25 mg, 0,071 mmoles) en DMF seca, luego se añadió 1,4-naftalenodiisotiocianato (86 mg, 0,355 mmoles) y la reacción se agitó durante 2 h a 20 °C bajo atmósfera de N₂. A continuación se evaporó la disolución a presión reducida y se purificó por cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH desde 100/0 hasta 80/20). (rendimiento: **19** = 58 %).

60 Compuesto **19**: ¹H NMR (DMSO): 1.80 (s, 3H, NAc), 3.2-4.6 (m, 18H, CH₂O, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4.29 (d, 1H, H-1, J₁₋₂ = 8.4 Hz), 7.6-8.1 (m, 8H, 6H_{arom}, 2 NH), 9.83 (m, 1H, NH); HRMS (MALDI) for C₂₆H₃₄N₄O₈NaS₂ [MNa]⁺, calcd 617.1717 found 617.1716.

65 Se disolvió el compuesto **20** (500 mg, 1,28 mmoles) en DCM seco, luego se añadieron 2-(2-etoxietoxi)etanol (174 µl, 1,28 mmoles) y TFA-Ag (424 mg, 1,92 mmoles) en la disolución. Se añadió SnCl₄ (1 M en CH₂Cl₂, 3,84 ml, 3,84 mmoles) gota a gota (en 30 min) a temperatura ambiente a la disolución con agitación y se agitó durante 3 h a 20 °C.

bajo atmósfera de N₂. A continuación se lavó la disolución respectivamente con NaHCO₃ acuoso saturado, agua y salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se filtró. A continuación se evaporó la disolución a presión reducida y se purificó por cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH desde 100/0 hasta 95/5). (rendimiento: **21** = 73 %). La glucosilación se confirmó por CCF y espectroscopía de masas y a continuación el compuesto **21** (150 mg, 0,323 mmoles) se disolvió en 10 ml de metanol y 10 ml de agua, luego se añadió la resina Amberlit IRN78. La mezcla se agitó 3 h a 20 °C, luego se filtró y se evaporó a presión reducida. (rendimiento: **22** = 77 %).

Compuesto **22**: ¹H NMR (MeOD): 1.19 (t, 3H, J_{H-H} = 6.9 Hz), 3.4-4.0 (m, 16H, CH₂O, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4.79 (d, 1H, H-1, J₁₋₂ = 1.8 Hz); HRMS (MALDI) for C₂₀H₂₉N₃O₈NaS₂ [M+Na]⁺, calcd 526.1302 found 526.1294.

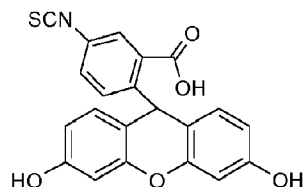
EJEMPLO 2: Transducción de hepatocitos primarios humanos por un AAV2 modificado químicamente

2.1. Producción y purificación de AAV2

Se produjeron vectores de AAV2 a partir de dos plásmidos: pHelper, PDP2-KANA que codifica Rep2-Cap2 de AAV y genes auxiliares de adenovirus (E2A, ARN de VA y E4) y pVector ss-CAG-eGFP. Todos los vectores se produjeron por transfección transitoria de células HEK293 con el método de fosfato de calcio-HeBS. Las células producidas por el vector se recogieron durante 48 horas después de la transfección y se trataron en primer lugar con Triton-1 % y benzonasa (25 U/ml) durante 1 hora a 37 °C. Después de 1 h de incubación a 37 °C, la masa se centrifugó a 2000 rpm durante 20 min y se sometió a ciclos de congelación-descongelación para liberar las partículas de vector. Se retiró el residuo celular por centrifugación a 2500 rpm durante 15 min. Los lisados celulares se precipitaron con PEG durante la noche y se clarificaron por centrifugación a 4000 rpm durante 1 hora. A continuación, se incubaron los precipitados con benzonasa durante 30 min a 37 °C y se recogieron después de la centrifugación a 10000 g durante 10 min a 4 °C. Los vectores se purificaron por ultracentrifugación en gradiente doble de cloruro de cesio (CsCl). A continuación, se sometió la suspensión vírica a cuatro rondas sucesivas de diálisis con ligera agitación en un casete Slide-a-Lyzer (Pierce) contra dPBS (que contiene Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺).

2.2. Acoplamiento y purificación (según la invención y con reactantes comparativos)

Se añadió AAV2-GFP (1E12 vg, 2,49 nmoles) a una disolución de tampón TRIS pH = 9,3 que contenía isotiocianato de fluoresceína (FITC) de la fórmula



(fuera de invención), **6** (invención), **9** (comparativo), **13** (invención), **16** (comparativo), **17** (invención), **18** (invención), **19** (invención) o **22** (comparativo) en diferentes relaciones molares (desde 3E5 hasta 1,5E7 equivalentes) y se incubó durante 4 h a 20 °C. Las disoluciones que contenían los vectores se dializaron entonces contra dPBS + 0,001 % de Pluronic para retirar moléculas libres que no se unieron a la cápside de AAV.

2.3. Extracción de genoma vírico

Se trataron 3 µl de AAV2 o AAV2 modificado químicamente con 20 unidades de DNasa I (Roche n.º 04716728001) a 37 °C durante 45 min para retirar el ADN residual en muestras de vector. Después del tratamiento con DNasa I, entonces se añadieron 20 µl de proteinasa K 20 mg/ml (MACHEREY-NAGEL n.º 740506) y se incubaron a 70 °C durante 20 min. A continuación, se usó columna de extracción (virus de ARN NucleoSpin®) para extraer ADN de vectores purificados de AAV.

2.4. Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real

Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) con una actualización del sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ (Life Technologies). Todas las PCR se realizaron en una PCR de 20 µl de volumen final que incluye cebadores, sonda, mezcla maestra de PCR (TaKaRa) y 5 µl de ADN molde (patrón de plásmido, o ADN de muestra). La qPCR se llevó a cabo con una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 20 segundos, seguido por 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 segundo de hibridación/extensión a 56 °C durante 20 segundos. Se generaron patrones de plásmido con siete diluciones sucesivas (que contenían 10⁸ a 10² copias de plásmido) de un plásmido pTR-UF-11 (ATCC ® MBA-331™) linealizado por la enzima de restricción Sca-I.

2.5. Transferencia Western

Todos los vectores se desnaturalizaron a 100 °C usando tampón de muestra de Laemmli durante 5 min y se separaron por SDS-PAGE 10 % de geles de Tris-glicina poliacrilamida (Life Technologies). Se usó Precision plus Protein All Blue Standards (BioRad) como marcador de tamaño de peso molecular. Después de transferir las proteínas a membrana de nitrocelulosa usando un tampón de transferencia (Tris 25 mM/glicina 192 mM/0,1 (p/v) de SDS/20 % de MeOH) durante 1 hora a 150 mA en un Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad), la membrana se saturó con 5 % de leche semidesnatada en PBS-Tween (0,1 %) o con 1 % de gelatina, 0,1 % de Igepal en PBS-Tween (0,01%) durante 2 h a TA. Después de la saturación, la membrana se sondó con antisero contra AAV2 y AAV2 modificado químicamente (policlonal, B1 monoclonal o anti-fluoresceína-AP) o con FITC-aglutinina de soja o FITC-concanavalina A durante la noche a 4 °C. Se llevaron a cabo tres lavados entre cada etapa para retirar reactivos no unidos con PBS-Tween (0,1 %) durante 15 min a TA. Las bandas se visualizaron por quimioluminiscencia usando anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (AP) o peroxidasa de rábano picante (HRP) y se capturaron en una película de rayos X.

2.6. Inmunotransferencia por puntos

Se depositaron AAV2 no desnaturalizado y AAV2 modificado químicamente sobre un papel de nitrocelulosa brevemente empapado en PBS antes de ensamblar el colector de transferencia por puntos (Bio-Rad). La membrana de nitrocelulosa se trató como para transferencia Western.

2.7. Dispersión dinámica de luz

Se hizo DLS usando un Malvern Zetasizer nano ZS. La calibración se controló de antemano usando disolución de patrón de tamaño de nanoesferas de 30 y 300 nm. Se puso 50 µl de cada vector en una cubeta específica DTS01 18 de Malvern y se analizó en volumen.

2.8. Transducción de hepatocitos primarios humanos y murinos

Se compraron hepatocitos primarios murinos y humanos y medio de cultivo de BIOPREDIC International (Rennes, FRANCIA). Se sembraron hepatocitos murinos y humanos en una superficie de plástico de 24 pocillos a una densidad de aproximadamente 2,5E5 células/pocillo. Después de la recepción, se retiró el medio de cultivo celular y se sustituyó con 1 ml de medio basal (MIL600) con aditivos (ADD222) y se incubó 2 h en 37 °C-5 % de CO₂. Se transdujeron hepatocitos primarios murinos o humanos a MOI de 1E5 por AAV3b, vectores de AAV2 o AAV2 modificado químicamente en 0,5 ml de medio de cultivo como se indica en los ejemplos. Seis horas después de la transducción se añadieron 0,5 ml de medio de cultivo fresco en cada pocillo. Todos los vectores de AAV codificaron GFP. Las placas de cultivo se incubaron durante 48 horas a 37 °C-5 % de CO₂ antes del análisis de citometría de flujo de células GFP positivas. Las células se disociaron con tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich), se fijaron con 4 % de paraformaldehído y se analizaron por el citómetro de flujo BD-LSRII (BD Bioscience). Todos los datos se procesaron por FlowJo (V10; Flowjo LLC, Ashland, OR).

2.9. Transducción de la retina en ratas

Se inyectaron ratas Sprague-Dawley macho adultas por vía subretiniana con 2,5 µl de la disolución que contenía cualquiera de control de AAV2 o los vectores modificados químicamente a una concentración de 1E12 vg/ml. Todos los animales se inyectaron bilateralmente, en un ojo con el control de AAV2 y el ojo contralateral con el vector AAV2+17 modificado químicamente. Se usaron dos grupos de animales (n=8 por grupo); un grupo inyectado con control de AAV2 frente a AAV2+17 a 3e5Eq, y el segundo grupo con control de AAV2 frente a AAV2+17 a 3e6Eq. Para seguir la fluorescencia debido a la expresión de GFP en el fondo del ojo, se usó un sistema no invasivo de obtención de imágenes en diferentes momentos de tiempo; desde 1 semana después de la inyección hasta 1,5 meses después de la inyección.

2.10. Análisis estadístico

Todos los experimentos se muestran como media ± error estándar (EEM). Se usó el software GraphPad Prism 5 para el análisis estadístico. Los datos se sometieron a análisis unifactorial de la varianza (ANOVA). Las muestras se consideraron significativamente diferentes si *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

2.11. Resultados y conclusión

La **Figura 1** representa el acoplamiento covalente de FITC sobre la cápside de AAV2 mediante grupos amino primarios.

- **(A)** Se añadió una dosis de 1E12 vg de vectores de AAV2-GFP a una disolución de FITC (1E5 o 3E5 eq) en tampón TBS (pH 9,3) y se incubó durante 4 h a TA. Las disoluciones que contenían los vectores se dializaron contra dPBS + 0,001 % de Pluronic para retirar moléculas libres de FITC que no se unieron a la cápside de AAV.

- **(B)** Se siguió el mismo procedimiento experimental, pero sustituyendo FITC por fluoresceína (3E5 eq), que no contiene los residuos reactivos (-N=C=S), en TBS pH 9,3 como control.

- **(C-E)** Se analizaron control de AAV2 y muestras de vectores de AAV2 incubados con FITC en tampón TBS (AAV2 FITC (1E5) y AAV2 FITC (3E5)) o incubados con fluoresceína en tampón TBS (AAV2 Fluo (3E5)) por emisión de fluorescencia y transferencia por puntos. Para este fin, una dosis total de 1E9 vg de cada condición se cargó sobre una membrana de nitrocelulosa y se analizó por emisión directa de fluorescencia (C), por transferencia por puntos usando un anticuerpo anti-FITC (D) o usando el anticuerpo A20 que reconoce toda la cápside (E).

- **(F,G)** Se analizó una dosis de 5E8 vg de las mismas muestras por transferencia Western usando un anticuerpo policlonal para detectar proteínas de la cápside de AAV desnaturalizadas (F) o usando un anticuerpo anti-FITC (G).

- **(H)** Se analizó una dosis total de 1E10 vg de cada condición por tinción con nitrato de plata. VP1, VP2 y VP3 son las tres proteínas que constituyen la cápside de AAV. El tamaño de proteína se indica en la izquierda de las imágenes según una escalera de proteínas.

La viabilidad de la modificación química de la cápside de AAV2 se hizo usando el fluoróforo FITC. Para este fin, se usaron dos cantidades diferentes de FITC con referencia a relaciones molares de 1E5 o 3E5 contra AAV2 (**figura 4-A**). También se usaron las mismas relaciones molares de fluoresceína como control (**figura 4-B**).

El punto positivo de A20, para todas las condiciones experimentales usadas, indicó que las cápsides de AAV2 siguen intactas después de someterse la reacción a diferentes relaciones molares y posterior diálisis contra dPBS + Pluronic (**figura 4-C**). En particular, los puntos positivos de FITC y negativos de fluoresceína también demostraron el acoplamiento covalente de FITC en las cápsides de virus y no su adsorción (**figura 4-D**). La diferencia de intensidad del punto mostrado por análisis de fluorescencia en la **figura 4-E** demostró que el acoplamiento covalente de FITC es más eficiente con 3E5 que 1E5 equivalentes de FITC en estas condiciones.

Se realizó el análisis de transferencia Western para confirmar adicionalmente el impacto de la relación molar sobre la conjugación de FITC con las subunidades de cápside de AAV. Como antes, el uso de un anticuerpo policlonal indicó que las subunidades de cápside de AAV2 siguen intactas con las relaciones molares usadas (**figura 4-F**). Como se muestra en la **figura 4-G**, las subunidades de cápside de AAV2 y AAV2 incubado con fluoresceína a la mayor relación no dieron bandas positivas después de la incubación con el anticuerpo anti-FITC. Sin embargo, el uso de este anticuerpo mostró claramente que el acoplamiento covalente de FITC es más eficiente con 3E5 que 1E5 equivalentes de FITC en estas condiciones (**figura 4-G**).

Para visualizar todas las proteínas y confirmar que no existe degradación durante el proceso químico, también se realizó una tinción con plata de las diferentes condiciones.

Como se muestra en la **figura 4-H**, se puede observar en todas las condiciones probadas una banda de VP3 más intensa en comparación con VP1 y VP2. También se indicó que las subunidades de cápside de AAV2 siguen intactas después de someterse a la reacción y posterior diálisis contra dPBS + Pluronic.

La **Figura 2** representa una identificación de la función reactiva para el acoplamiento covalente de ligandos de GalNAc en la cápside de AAV2 mediante grupos amino primarios.

- **(A)** Se añadió una dosis de 1E12 vg de vectores de AAV2-GFP a una disolución de compuesto **4** (que contenía un ligando de GalNAc con una función reactiva -N=C=S) o compuesto **6** (que contenía un ligando de GalNAc con una función reactiva de aril-N=C=S) (3E5 eq) en tampón TBS (pH 9,3) y se incubó durante 4 h a TA. Después de la incubación, los vectores se dializaron contra dPBS + 0,001 % de Pluronic para retirar moléculas libres de ligandos de GalNAc que no se unieron a la cápside de AAV. Se siguió el mismo procedimiento experimental con el compuesto **9** (3E5 eq), que no contiene los residuos reactivos (-N=C=S), en TBS pH 9,3 como control.

- **(B,C)** Se analizaron por transferencia por puntos control de AAV2 y muestras de vectores de AAV2 incubados con ligandos de GalNAc en tampón TBS (AAV2 + **4**, AAV2 + **6** y AAV2 + **9**). Para este fin, una dosis total de 1E10 vg de cada condición se cargó en una membrana de nitrocelulosa y se marcó usando el anticuerpo A20 que reconocía toda la cápside (**B**) o usando la FITC-lectina de soja que reconoce el azúcar N-acetilgalactosamina (**C**).

Para determinar la función de acoplamiento óptimo en el ligando para el anclaje sobre la superficie de la cápside de AAV2, se sintetizaron 3 compuestos que tenían un -NCS (**4**) o un aril-NCS (**6**) (como para FITC) y otro (**9**) sin función reactiva para garantizar el acoplamiento covalente de estos ligandos hepáticos y no su adsorción sobre la superficie de la cápside (**figura 2-A**).

Para la validación del acoplamiento covalente de estos ligandos hepáticos en AAV2 se usaron técnicas de transferencia por puntos. El punto positivo de A20, para todas las condiciones experimentales usadas, indicó que las cápsides de AAV2 siguen intactas después de someterse a la reacción y posterior diálisis contra dPBS + Pluronic (figura 2-B). El punto positivo de lectina de soja (que se sabe que interactúa con el residuo de GalNAc) detectado con el compuesto 6 demostró que en estas condiciones el aril-NCS es la única función de acoplamiento que reaccionó con el grupo amino en la cápside de AAV2. Como se observó con fluoresceína, no se observó detección con el compuesto 9, validándose, por lo tanto, el acoplamiento covalente y no la adsorción del compuesto 6 sobre la superficie de la cápside de AAV2 (figura 2-C).

El uso combinado del tampón TBS y ligando que tiene una función aril-NCS permite el acoplamiento covalente de diferentes moléculas sobre la superficie de AAV2 en condiciones que no tienen efecto adverso sobre el vector.

La Figura 3 representa el acoplamiento covalente de ligandos de GalNAc sobre la cápside de AAV2 mediante grupos amino primarios.

- (A) Se añadió una dosis de 1×10^{12} vg de vectores de AAV2-GFP a una disolución de compuesto 6 (un ligando monomérico de GalNAc con una función reactiva aril-N=C=S) o compuesto 13 (un ligando trimérico de GalNAc con una función reactiva aril-N=C=S) (3E5 eq) en tampón TBS (ambas a pH 9,3) y se incubó durante 4 h a TA. Después de la incubación, los vectores se dializaron contra dPBS + 0,001 % de Pluronic para retirar moléculas libres de ligandos de GalNAc que no se unieron a la cápside de AAV. Se siguió el mismo procedimiento experimental con el compuesto 9 (3E5 eq), que no contiene los residuos reactivos (aril-N=C=S), en TBS pH 9,3 como control.

- (B,C) Se analizaron por transferencia por puntos control de AAV2 y muestras de vectores de AAV2 incubados con ligandos de GalNAc en tampón TBS (AAV2 + 6, AAV2 + 9 y AAV2 + 13). Para este fin, una dosis total de 1×10^{10} vg de cada condición se cargó en una membrana de nitrocelulosa y se marcó usando el anticuerpo A20 que reconocía toda la cápside ensamblada (B) o usando FITC-lectina de soja que reconoce el azúcar *N*-acetilgalactosamina (C).

- (D,E) Se analizaron por transferencia Western control de AAV2 y muestras de vectores de AAV2 incubados con ligandos de GalNAc en tampón TBS (AAV2 + 6, AAV2 + 9 y AAV2 + 13). Se cargó una dosis total de 1×10^{10} vg de cada condición en una membrana de nitrocelulosa y se marcó con un anticuerpo policlonal para detectar proteínas desnaturalizadas de la cápside de AAV (D) o usando FITC-lectina de soja (E). VP1, VP2 y VP3 son las tres proteínas que constituyen la cápside de AAV. El tamaño de proteína se indica en la izquierda de las imágenes según una escala de proteínas.

Después de la validación del acoplamiento químico de 6 y su función aril-NCS, también se probó un GalNAc trímero, es decir, el compuesto 13, compuesto que tiene la misma función de anclaje. Se había descrito que este trímero específico mejoraba la interacción con el ASPGr sobre la superficie de hepatocitos (figura 3-A).

Para la validación del acoplamiento covalente de estos ligandos hepáticos en AAV2 se usaron técnicas de transferencia por puntos y Western. El punto positivo de A20, para todas las condiciones experimentales usadas, indicó que las cápsides de AAV2 siguen intactas después de someterse a la reacción y posterior diálisis contra dPBS + Pluronic (figura 3-B). El punto positivo de lectina de soja (que se sabe que interactúa con el residuo de GalNAc) se detectó con los compuestos 6 y 13. Como se observa con fluoresceína, no se observó detección con el compuesto 9, validándose, por lo tanto, el acoplamiento covalente y no la adsorción de 6 y 13 sobre la superficie de la cápside de AAV2 (figura 3-C).

Se realizó análisis de transferencia Western para confirmar la conjugación de 6 y 13 en el grupo amino primario en las subunidades de cápside de AAV2. El uso de un anticuerpo policlonal indicó que las subunidades de cápside de AAV2 siguen estando intactas con los diferentes ligandos usados en esta etapa de acoplamiento (figura 3-D). Como se muestra en la figura 3-E, las subunidades de cápside de AAV2 y AAV2 incubado con 9 no dieron bandas positivas después de la incubación con la lectina de soja específica. Sin embargo, el uso de esta lectina con los compuestos 6 y 13 mostró claramente bandas positivas en los pesos moleculares correctos de VP1, VP2 y VP3, lo que demuestra el acoplamiento covalente de estos ligandos de GalNAc en las tres subunidades de la cápside de AAV.

La Figura 4 representa la transducción de hepatocitos primarios humanos con AAV2 y vectores de AAV2 modificados químicamente con ligandos de GalNAc. Se incubaron hepatocitos primarios humanos (2×10^5 célula/pocillo) en placas P24 y se transdujeron con control de AAV2 (inmediatamente tras la descongelación), GalNAc-AAV2 (AAV2 + 6, AAV2 + 13) a una MOI de 1×10^5 . Todos los vectores de AAV codificaron GFP. El porcentaje de células GFP positivas se ha medido por análisis de FACS 48 h después de la transducción. Se usaron células no transducidas (células) como control para el fondo de fluorescencia. Se han analizado cuatro duplicados de cada condición por la prueba de ANOVA (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$). Los datos se representan como media $\pm$ DE.

Para evaluar la eficiencia de la modificación química con ligando hepático en AAV2, se evaluó la transducción de estas partículas modificadas o no modificadas en hepatocitos primarios humanos. Como se muestra en la **figura 4**, la modificación química de la cápside de AAV2 con el compuesto **6** aumentó el porcentaje de células GFP positivas por un factor 4 que es estadísticamente significativo en comparación con AAV2 que siguió el mismo procedimiento experimental. El acoplamiento químico de **13** no produjo el mismo aumento de porcentaje de células GFP positivas, pero este aumento es estadísticamente significativo.

La **Figura 5** representa el efecto del número de equivalentes de ligandos sobre la eficacia del acoplamiento mediante el grupo amino primario (Ejemplo con FITC).

- **(A)** Se añadió una dosis de 1×10^{12} vg de vectores de AAV2-GFP a una disolución de FITC (3×10^5 eq, 3×10^5 eq- $10 \times$ (3×10^5 eq pero con el volumen de la reacción reducido $1/10$), 3×10^6 eq, $1,5 \times 10^7$ eq) en tampón TBS a pH 9,3 y se incubó durante 4 h a TA. Las disoluciones que contenían los vectores se dializaron contra dPBS + 0,001 % de Pluronic para retirar moléculas libres de FITC que no se unieron a la cápside de AAV.

- **(B)** Se siguió el mismo procedimiento experimental pero sustituyendo FITC por fluoresceína ($1,5 \times 10^7$ eq), que no contiene los residuos reactivos (N=C=S), en TBS pH 9,3 como control. **(C,D)** Se analizaron control de AAV2 y muestras de vectores de AAV2 incubados con FITC en tampón TBS (AAV2 FITC (3×10^5), AAV2 FITC ($3 \times 10^5 - 10 \times$), AAV2 FITC (3×10^6) y AAV2 FITC ($1,5 \times 10^7$)) o incubado con fluoresceína en tampón TBS (AAV2 Fluo ($1,5 \times 10^7$)) por transferencia por puntos. Se cargó una dosis total de 1×10^9 vg de cada condición en una membrana de nitrocelulosa y se marcó por el anticuerpo A20 que reconocía toda la cápside **(C)** o usando un anticuerpo anti-FITC **(D)**.

- **(E,F)** Se analizó por transferencia Western una dosis de 5×10^8 vg de las mismas muestras usando un anticuerpo policlonal para detectar proteínas desnaturalizadas de la cápside de AAV **(E)** o usando un anticuerpo anti-FITC **(F)**. VP1, VP2 y VP3 son las tres proteínas que constituyen la cápside de AAV. El tamaño de proteína se indica en la izquierda de las imágenes según una escala de proteínas.

- **(G)** Se incubaron células HeLa (2×10^5 célula/pocillo) en pilas de células y se transdujeron con AAV2 FITC (3×10^5), AAV2 FITC (3×10^6) y AAV2 FITC ($1,5 \times 10^7$) a una MOI de 1×10^5 . Todos los vectores de AAV codificaron GFP. Se hicieron análisis de microscopía confocal después de 4 h de transducción, para evitar la expresión de GFP, por visualización del inmunomarcado de fluorescencia verde de FITC y el inmunomarcado de A20 de fluorescencia roja (anticuerpo primario A20 y anticuerpo secundario Al647).

Para modular el número de ligando en AAV2, se aumentó la relación molar de FITC usada en el tampón TBS y se evaluó si tenía una influencia sobre el número de moléculas acopladas sobre la superficie de la cápside de AAV2. Para saturar la cápside de AAV2 con FITC, esta relación aumentó de 3×10^5 a $1,5 \times 10^7$.

Se realizó análisis de transferencia por puntos y Western para confirmar adicionalmente el impacto de la relación molar sobre la conjugación de FITC con las subunidades de cápside de AAV. Como antes, el uso de A20 y un anticuerpo policlonal indicaron que las subunidades de cápside de AAV2 siguen estando intactas con las diferentes relaciones molares usadas (**figura 5-C,E**). Como se muestra en la **figura 5-D,F**, las subunidades de cápside de AAV2 y AAV2 incubadas con fluoresceína a la mayor relación no dieron ningún punto o banda positiva después de la incubación con el anticuerpo anti-FITC. Sin embargo, el uso de este anticuerpo mostró claramente que el acoplamiento covalente de FITC es más eficiente cuando su relación molar aumentó (**figura 5-F**). También es importante observar que el hacer el acoplamiento con 3×10^5 de relación molar de FITC en $10 \times$ tampón TBS permitió el acoplamiento de un número más importante de este fluoróforo en la cápside de este vector.

Para AAV2-FITC (3×10^5), se detectaron la fluorescencia verde de FITC (J) y el inmunomarcado de A20 de fluorescencia roja (K), se observó colocalización de FITC y A20-Al647 en amarillo por la fusión de las imágenes obtenidas en los canales verde y rojo (L), lo que demuestra el acoplamiento covalente de FITC en la cápside de AAV2. Por el contrario, no se reconocieron muestras de AAV2-FITC (3×10^6) y AAV2-FITC ($1,5 \times 10^7$) (S,V) por inmunomarcado de A20 (K) y, por lo tanto, no se observó la colocalización de FITC y A20-Al647 (T,U,W,X). Estos resultados sugieren que el elevado número de ligandos de FITC en la superficie de la cápside de AAV2 podría reducir la interacción con anticuerpos A20 y sugieren la posibilidad de que cápsides modificadas tengan menos interacciones en general con anticuerpos de reconocimiento superficial.

La **Figura 6** representa el efecto del número de equivalentes de ligandos de GalNAc en la eficacia de acoplamiento mediante el grupo amino primario (Ejemplo con **6** y **13**) y la transducción de hepatocitos primarios murinos.

- **(A, B)** Se añadió una dosis de 1×10^{12} vg de vectores de AAV2-GFP a una disolución de **6** y **13** (3×10^5 y 3×10^6 eq) en tampón TBS a pH 9,3 y se incubó durante 4 h a TA. Las disoluciones que contenían los vectores se dializaron contra dPBS + 0,001 % de Pluronic para retirar moléculas libres de ligandos de GalNAc que no se unieron a la cápside de AAV.

Se analizaron por transferencia Western control de AAV2 y muestras de vectores de AAV2 incubado con ligandos de GalNAc en tampón TBS. Se cargó una dosis total de 1×10^{10} vg de cada condición en una membrana de nitrocelulosa y se marcó por un anticuerpo policlonal para detectar proteínas desnaturalizadas de AAV de la cápside (**A**) o usando FITC-lectina de soja (**B**). VP1, VP2 y VP3 son las tres proteínas de la cápside de AAV. El tamaño de proteína se indica en la izquierda de las imágenes según una escala de proteínas.

- **(C)** Transducción de hepatocitos primarios murinos con AAV2 y vectores de AAV2 modificados químicamente con ligandos de GalNAc. Se incubaron hepatocitos primarios murinos (2×10^5 célula/pocillo) en placas P24 y se transdujeron con control de AAV2 (inmediatamente tras la descongelación), GalNAc-AAV2 (AAV2 + **6** (3×10^5 y 3×10^6 eq)) a una MOI de 1×10^5 . Todos los vectores de AAV codificaron GFP bajo el control del promotor de CAG. El porcentaje de células GFP positivas se midió por análisis de FACS 72 h después de la transducción. Se usaron células no transducidas (células) como control (es decir, fondo de fluorescencia). Se han analizado tres duplicados de cada condición por la prueba de ANOVA (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$). Los datos se representan como media $\pm$ DE.

Para modular el número de ligando en AAV2, se aumentó la relación molar de **6** y **13** usada en el tampón TBS y se evaluó si tenía una influencia en el número de moléculas acopladas sobre la superficie de la cápside de AAV2. Para saturar la cápside de AAV2 con **6** y **13**, esta relación aumentó de 3×10^5 a 3×10^6 equivalentes (Eq).

Se realizó el análisis de transferencia Western para confirmar adicionalmente el impacto de la relación molar sobre la conjugación de **6** y **13** con las subunidades de cápside de AAV. Como se muestra antes, el uso de un anticuerpo policlonal (contra la cápside) indicó que las subunidades de cápside de AAV2 siguen estando intactas con las diferentes relaciones molares usadas (**figura 6-A**). Como se muestra en la **figura 6-B**, el uso de la lectina de soja mostró claramente que el acoplamiento covalente de **6** y **13** fue más eficiente cuando la relación molar aumentó de 3×10^5 a 3×10^6 . Para evaluar la eficiencia de la modificación química con el ligando hepático en AAV2, se evaluó la transducción de estas partículas de AAV2 modificadas o no modificadas en hepatocitos primarios murinos. Como se muestra en la **figura 6-C**, la modificación química de la cápside de AAV2 con el compuesto **6** a dos dosis (3×10^5 y 3×10^6 eq) aumentó el porcentaje de células GFP positivas en un factor de 2 (3×10^5) y 6 (3×10^6) que es estadísticamente significativo en comparación con el vector de control de AAV2.

Figura 7. Efecto del número de equivalentes de ligandos de manosa sobre la eficacia de acoplamiento mediante grupo amino primario (Ejemplo con **17**) y la transducción de la retina en ratas.

- **(A)** Se añadió una dosis de 1×10^{12} vg de vectores de AAV2-GFP a una disolución de compuesto **17** (un ligando monomérico de manosa con una función reactiva aril-N=C=S) (3×10^5 y 3×10^6 eq) en tampón TBS (ambos a pH 9,3) y se incubó durante 4 h a TA. Después de la incubación, los vectores se dializaron contra dPBS + 0,001 % de Pluronic para retirar moléculas libres de ligandos de manosa que no se unieron a la cápside de AAV. Se siguió el mismo procedimiento experimental con el compuesto **22** (3×10^6 eq), que no contenía los residuos reactivos (aril-N=C=S), en TBS pH 9,3 como control.

- **(B, C)** Se analizaron por transferencia Western control de AAV2 y muestras de vectores de AAV2 incubados con ligandos de manosa en tampón TBS. Se cargó una dosis total de 1×10^{10} vg de cada condición en una membrana de nitrocelulosa y se marcó por un anticuerpo policlonal para detectar proteínas desnaturalizadas de AAV de la cápside (**B**) o usando la lectina de concanavalina A que reconoce específicamente el grupo manosa (**C**). VP1, VP2 y VP3 son las tres proteínas que constituyen la cápside de AAV. El tamaño de proteína se indica en la izquierda de las imágenes según una escala de proteínas.

- **(D)** Visualización directa de fluorescencia de GFP en el fondo de ojo de ratas inyectadas por vía subretiniana con control de AAV2 (AAV2) o con AAV2 incubado con ligando de manosa (compuesto **17**) a dos dosis diferentes (3×10^5 Eq y 3×10^6 Eq). Se tomaron imágenes en diferentes momentos de tiempo; a partir de 1 semana después de la inyección hasta 1,5 meses después de la inyección usando técnicas no invasivas.

Para modular el número de ligandos de manosa en la superficie de AAV2, se aumentó la relación molar de **17** usada en el tampón TBS y se evaluó si tenía una influencia, como los ligandos de GalNAc, en el número de moléculas acopladas sobre la superficie de la cápside de AAV2. Para saturar la cápside de AAV2 con **17**, esta relación aumentó desde 3×10^5 hasta 3×10^6 .

Se realizó análisis de transferencia Western para confirmar adicionalmente el impacto de la relación con respecto a la conjugación de **17** con las subunidades de cápside de AAV. Como antes, el uso de un anticuerpo policlonal indicó que las subunidades de cápside de AAV2 siguen estando intactas con las diferentes relaciones molares usadas (**figura 7-B**). Como se muestra en la **figura 7-C**, el uso de la lectina de concanavalina A mostró claramente que el acoplamiento covalente de **17** es más eficiente cuando la relación molar aumentó desde 3×10^5 hasta 3×10^6 .

La oftalmoscopia no invasiva mostró la expresión de GFP en la retina de tanto ojos de control de AAV2 como tratados con AAV2+**17** durante todo el estudio (Fig 7D). Las imágenes a la izquierda son representativas de los ojos tratados con AAV2+**17** en dosis de 3×10^5 Eq y la intensidad de la fluorescencia fue similar en comparación con el control de AAV2

(ojos contralaterales). Sin embargo, en las imágenes derechas se podría observar que los ojos tratados con AAV2+17 en dosis de 3e6Eq tuvieron una intensidad de GFP más ancha y más brillante en todos los momentos de tiempos en comparación con los ojos contralaterales tratados con AAV2 de control. Puede observarse que las imágenes tomadas a las 3 semanas, 1 mes y 1,5 meses de los ojos tratados con AAV2+17 a la dosis 3e6Eq se ajustaron para evitar la saturación de la señal debido a que la señal de fluorescencia fue muy superior a la de los ojos contralaterales.

Figura 8. Identificación de la diferente función reactiva para el acoplamiento covalente de ligandos de GalNAc en la cápside de AAV2 mediante grupos amino primarios.

- **(A)** Se añadió una dosis de $1E12$ vg de vectores de AAV2-GFP a una disolución de compuesto **18** o **19** (3E6 eq) en tampón TBS (pH 9,3) y se incubó durante 4 h a TA. Después de la incubación, los vectores se dializaron contra dPBS + 0,001 % de Pluronic para retirar ligandos de GalNAc libres que no se unieron a la cápside de AAV.

- **(B,C)** Se analizó una dosis de $1E10$ vg de cada muestra por transferencia Western usando un anticuerpo policlonal para detectar proteínas desnaturalizadas de la cápside de AAV **(B)** o usando la lectina de soja **(C)**.

Para determinar la diferente función de acoplamiento en el ligando para permitir el apropiado anclaje sobre la superficie de la cápside de AAV, se sintetizaron dos compuestos, **18** (derivado de piridin isotiocianato) y **19** (derivado de naftaleno isotiocianato) (**figura 8-A**).

Se realizó análisis de transferencia Western para confirmar la conjugación de **18** y **19** en el grupo amino primario en las subunidades de cápside de AAV2. El uso de un anticuerpo policlonal indicó que las subunidades de cápside de AAV2 siguen estando intactas con los diferentes ligandos usados en esta etapa de acoplamiento (**figura 8-B**). El uso de la lectina de soja (que reconoce el grupo de GalNAc) con compuestos **18** y **19** mostró bandas positivas en los pesos moleculares correctos de VP1, VP2 y VP3, lo que demuestra el acoplamiento covalente de estos ligandos de GalNAc en las tres subunidades de la cápside de AAV.

El uso combinado de tampón TBS y ligando que tiene una función aril-NCS, poliaril-NCS y heteroaril-NCS permite el acoplamiento covalente de diferentes moléculas sobre la superficie de AAV2 en condiciones que no tienen un efecto adverso sobre el vector.

La **Figura 9** representa el acoplamiento covalente de **6** sobre la cápside de AAV3b mediante grupos amino primarios.

Se añadió una dosis de $1E12$ vg de vectores de AAV3b-GFP a una disolución de **6** (3E6 eq) en tampón TBS (pH 9,3) y se incubó durante 4 h a TA. Las disoluciones que contenían los vectores se dializaron contra dPBS + 0,001 % de Pluronic para retirar moléculas libres de **6** que no se unieron a la cápside de AAV.

- **(A,B)** Se cargó una dosis total de $1E9$ vg de cada condición a una membrana de nitrocelulosa y se analizó por transferencia puntual usando el anticuerpo A20 que reconoce la cápside ensamblada **(A)** en la lectina de soja **(B)**.

- **(C,D)** Se analizó una dosis de $1E10$ vg de las mismas muestras por transferencia Western usando un anticuerpo policlonal para detectar proteínas desnaturalizadas de la cápside de AAV **(C)** o usando la lectina de soja **(D)**.

La viabilidad de la modificación química de la cápside de AAV3b se hizo usando el compuesto **6** como para AAV2. Para este fin, se usaron 3E6 relaciones molares de **6** contra AAV3b.

El punto positivo de A20, para todas las condiciones experimentales, indicó que las cápsides de AAV3b siguen estando intactas después de la reacción química (**figura 9-A**). En particular, los puntos positivos con lectina de soja también demostraron el acoplamiento covalente de **6** en las cápsides de AAV (**figura 9-B**).

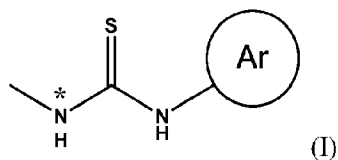
Se realizó análisis de transferencia Western para confirmar adicionalmente el acoplamiento de **6** a las subunidades de cápside de AAV3b. Como se muestra antes, el uso de un anticuerpo policlonal indicó que las subunidades de cápside de AAV3b siguieron intactas (**figura 9-C**). Como se muestra en la **figura 9-D**, el uso de la lectina de soja mostró el acoplamiento covalente de **6** en las subunidades de cápside de AAV.

Conclusión

Las condiciones experimentales usadas para el acoplamiento mostraron claramente que es posible modular el acoplamiento de un ligando en la superficie de la cápside de AAV2 y AAV3b. Así están disponibles nuevos vectores derivados de AAV disponibles mediante el acoplamiento químico de ligandos de cualquier naturaleza en la superficie de la cápside. También se puede mejorar por este método la actividad específica y el índice terapéutico de los vectores.

REIVINDICACIONES

1. Una partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que tiene al menos un grupo amino primario contenido en las proteínas de la cápside, acoplado químicamente con al menos un ligando L, en donde dicho ligando L se implementa con la forma de un compuesto de la fórmula (I):



- siendo N* el átomo de nitrógeno de un grupo amino primario contenido en las proteínas de la cápside y,



representa un radical arileno o heteroarileno opcionalmente sustituido, unido covalentemente, directamente o no, a al menos un ligando L.

2. El rAAV recombinante de la reivindicación 1, en donde

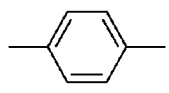


representa un radical arileno o heteroarileno opcionalmente sustituido y se une covalentemente, directamente o no, a al menos un ligando L.

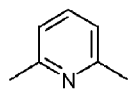
3. La partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según la reivindicación 1 o 2, en donde



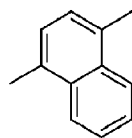
representa un grupo fenileno, un grupo naftileno o piridileno, y más particularmente un grupo



un grupo



o un grupo

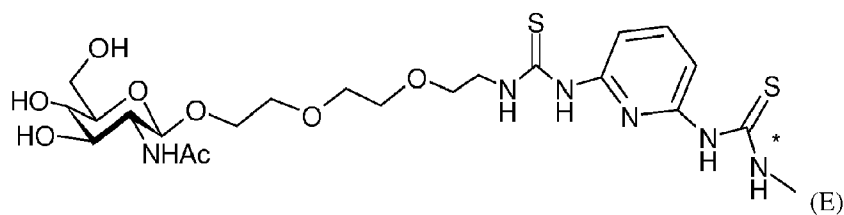
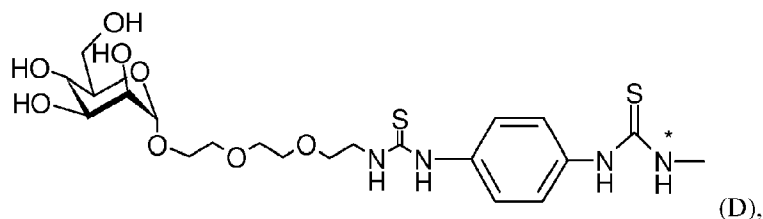
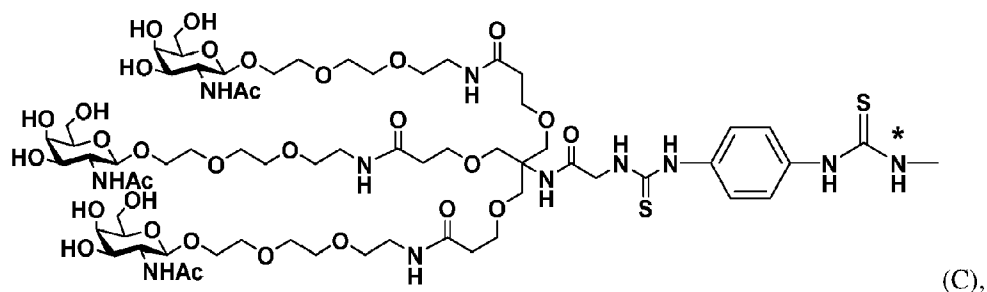
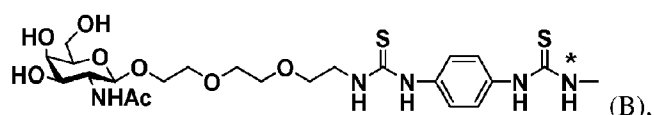


4. La partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho vector de virus adenoasociado está compuesto por proteínas de la cápside *naturales* de serotipos que existen de forma natural o es un virus adenoasociado con una modificación genética de las proteínas de la cápside de serotipos que existen de forma natural o compuestos por una cápside sintética.

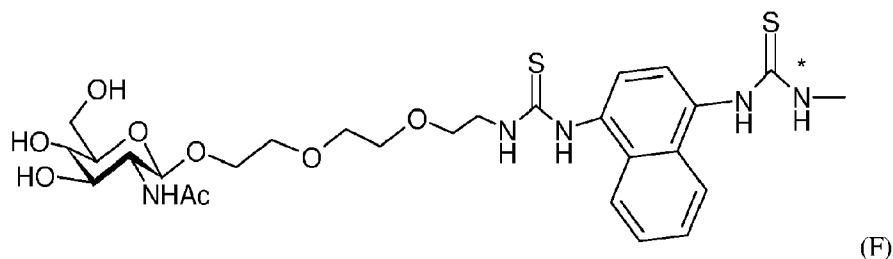
5. La partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el ligando L es:

- un agente de direccionamiento, en particular un ligando específico del tipo de célula, y más particularmente derivado de proteínas, de mono- o polisacáridos, de hormonas esteroideas, de péptido de motivo RGD, de vitaminas, de moléculas pequeñas o de péptido de direccionamiento;
- un agente de apantallamiento estérico para evitar interacciones de anticuerpos neutralizantes, en particular derivado de polímeros sintéticos, tales como polietilenglicol (PEG) o pHPMA;
- un agente de marcado, en particular para transferencia génica analítica con, por ejemplo, colorante fluorescente o nanopartículas de oro, tales como fluoresceína, rodamina, Alexa Fluor, Bodipy o colorante radiactivo, tal como ^{18}F , $^{124,125,131}\text{I}$, ^{64}Cu o ^{67}Cu ; o
- un agente magnético, tal como partículas de hierro.

6. La partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el resto de la fórmula (I) se selecciona de:



y



7. Un método para acoplar químicamente una partícula de vector de virus adenoasociado (AAV) con al menos un ligando L, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

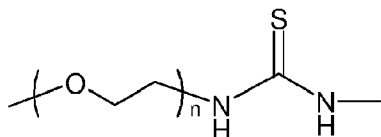
- tener una partícula de virus adenoasociado (AAV) que tiene al menos un grupo amino primario contenido en las proteínas de la cápside, y
- poner en contacto dicha partícula de AAV con un reactivo de la fórmula (II) B-N=C=S (II) en donde B es un radical $(\text{L})_m(\text{X})\text{Ar-}$

siendo L como se define en la reivindicación 6,
representando m un número entero desde 1 hasta 1000,
representando Ar un radical arileno o heteroarileno, y es más particularmente como se define en las reivindicaciones 2 o 3, y

representando X un enlace o un espaciador entre dicho(s) ligando(s) L y Ar,
en condiciones adecuadas para hacer reaccionar el grupo amino primario con el resto -N=C=S del reactivo de la fórmula (II).

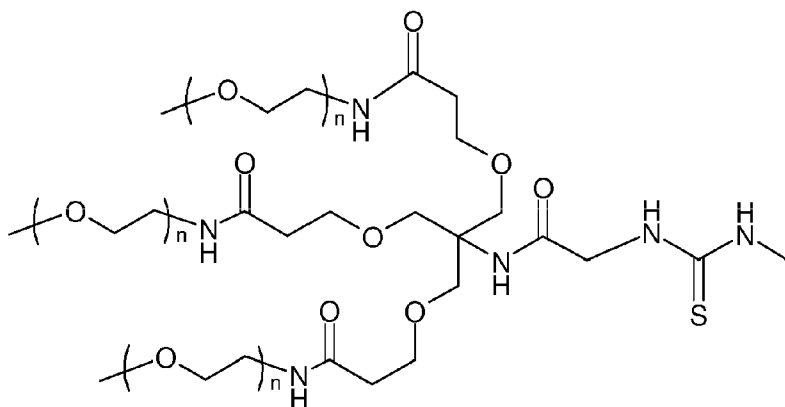
8. Un método según la reivindicación 7, en donde X representa:

- un grupo



en donde n representa un número entero desde 0 hasta 5000, en particular desde 1 hasta 500, desde 2 hasta 100, e incluso más particularmente desde 3 hasta 20 y es particularmente 3, o

- un grupo



en donde n representa un número entero desde 0 hasta 5000, en particular desde 1 hasta 2000, e incluso más particularmente desde 3 hasta 100 y es particularmente 3.

9. Un método según las reivindicaciones 7 o 8, en donde la etapa de poner en contacto dicha partícula de AAV con un reactivo de la fórmula (II) tiene lugar en presencia de un tampón seleccionado de solución salina tamponada con Tris, tampón carbonato sódico - bicarbonato sódico, PBS, dPBS y más particularmente en presencia de solución salina tamponada con Tris.

10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la reacción tiene lugar a un pH comprendido entre 7 y 9,6, en particular entre 9,2 y 9,4.

11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde la partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) se hace reaccionar adicionalmente para modificar las proteínas de la cápside en una segunda etapa de acoplamiento, en particular por acoplamiento químico con grupos amino no reaccionados de la primera etapa de acoplamiento.

12. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde dicho método se dedica a alterar el tropismo de la partícula de vector de virus adenoasociado (AAV) y en particular para dirigirse a un órgano específico deseado, tejido o tipos de células; para acentuar la transducción de una célula específica o tejido o para disminuir la interacción con anticuerpos neutralizantes.

13. La partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso como un medicamento, en particular para administrar ácidos nucleicos terapéuticos o para inducir edición correctiva del genoma; como un medio profiláctico; como un medio de diagnóstico, tal como un agente de obtención de imágenes o para su uso para estudios de eficiencia para genoterapia.

14. La partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para:

- alterar el tropismo del virus adenoasociado (AAV) y en particular para dirigirse a un órgano específico deseado, tejido o tipos de células;
- alterar la respuesta humoral a dicha partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV); o
- disminuir la interacción con anticuerpos neutralizantes.

5 15. La partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) tiene un tropismo selectivo para hepatocitos, retina, pulmón, corazón, riñón, hígado, cerebro, bazo, células tumorales o musculares, y más particularmente para hepatocitos, epitelio pigmentario de la retina, fotorreceptores, miocitos o cardiomiocitos.

10 16. Una composición farmacéutica que comprende la partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 17. La partícula de vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la composición farmacéutica según la reivindicación precedente, para su uso en un método de diagnóstico o para su uso en genoterapia, en particular para tratar trastornos genéticos o trastornos adquiridos, que incluyen, insuficiencia cardíaca, trastornos neurológicos, trastornos musculares, tales como distrofia muscular de Duchenne (DMD), enfermedades hepáticas, trastornos de la sangre, trastornos metabólicos, patologías oculares o cáncer, y para su uso en inmunoterapias y vacunación.

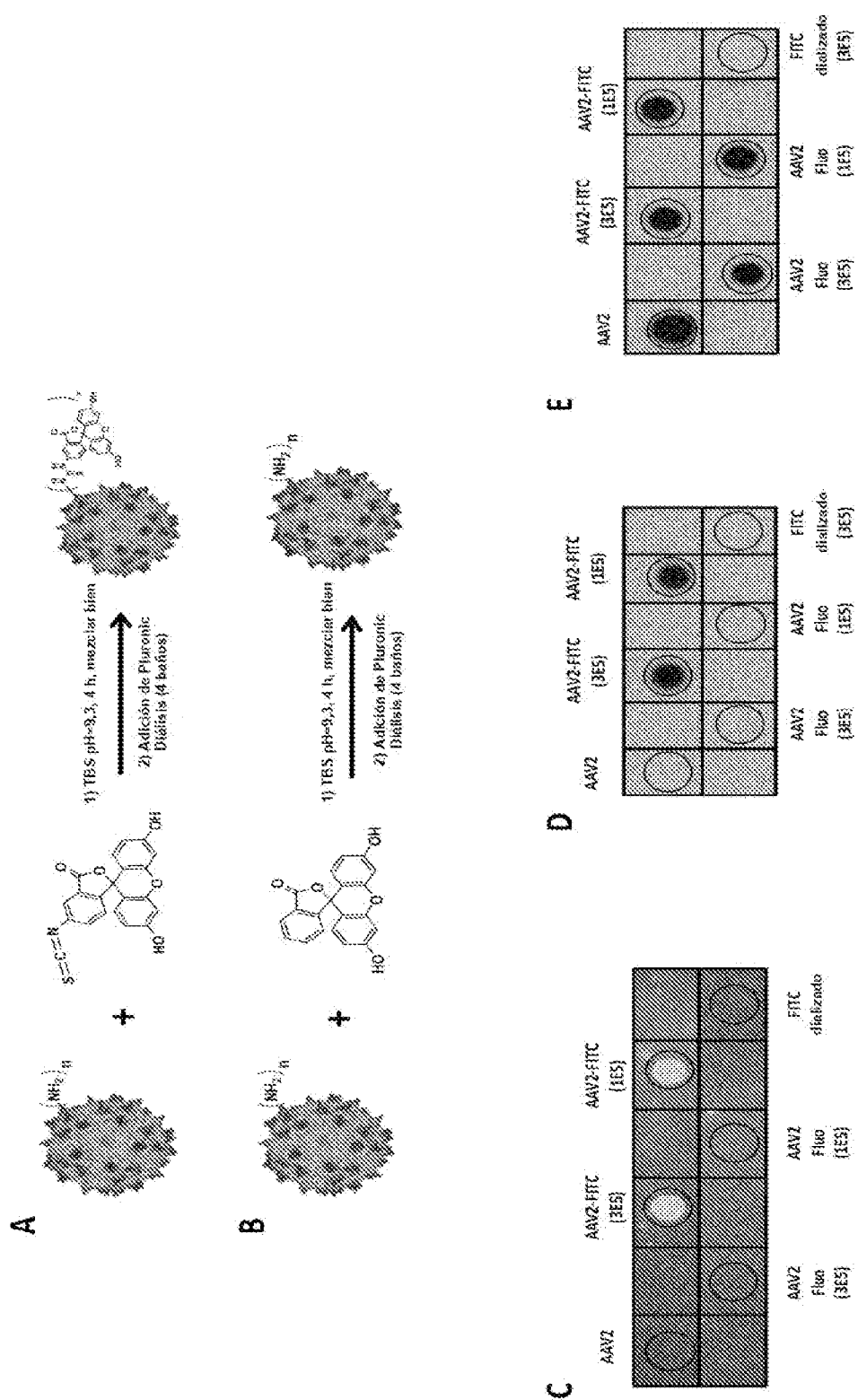


Figura 1

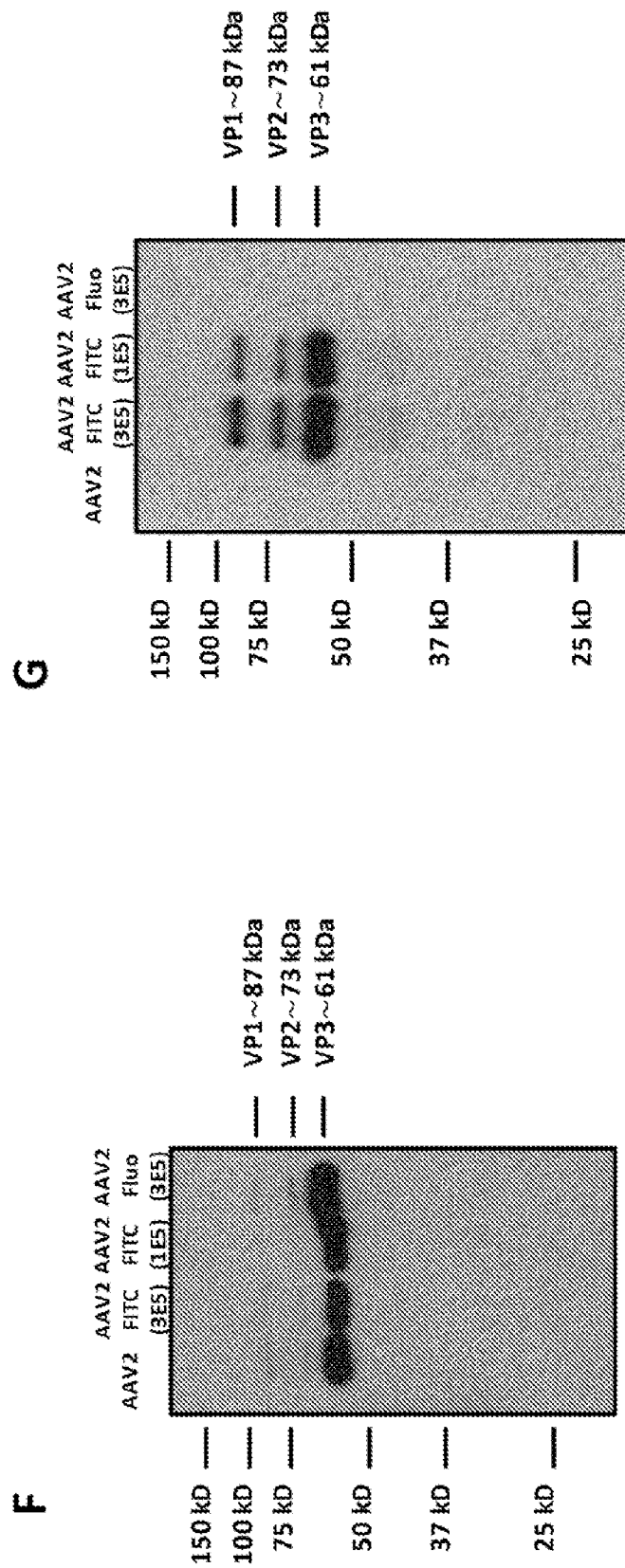


Figura 1 (continuación)

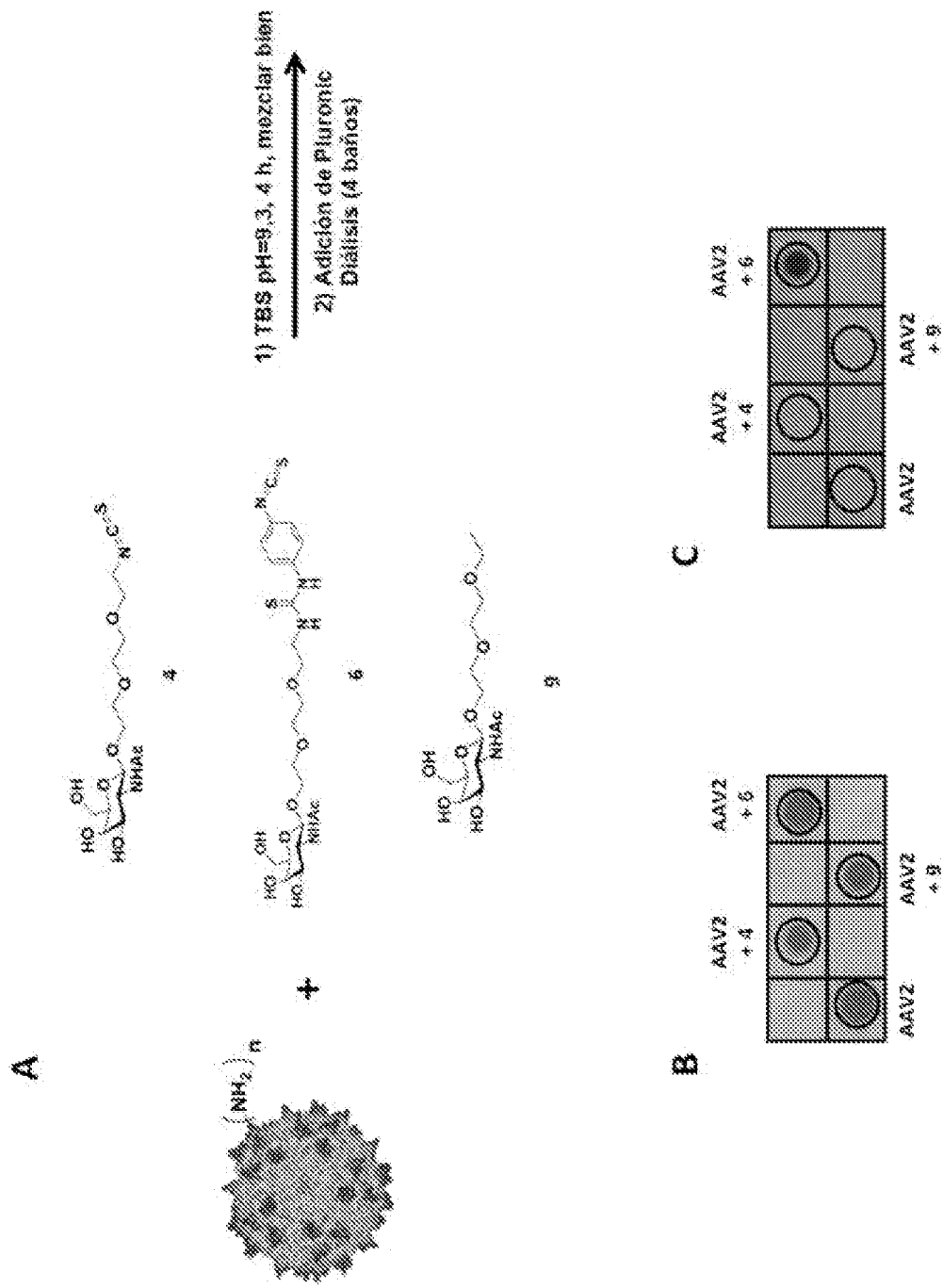


Figura 2

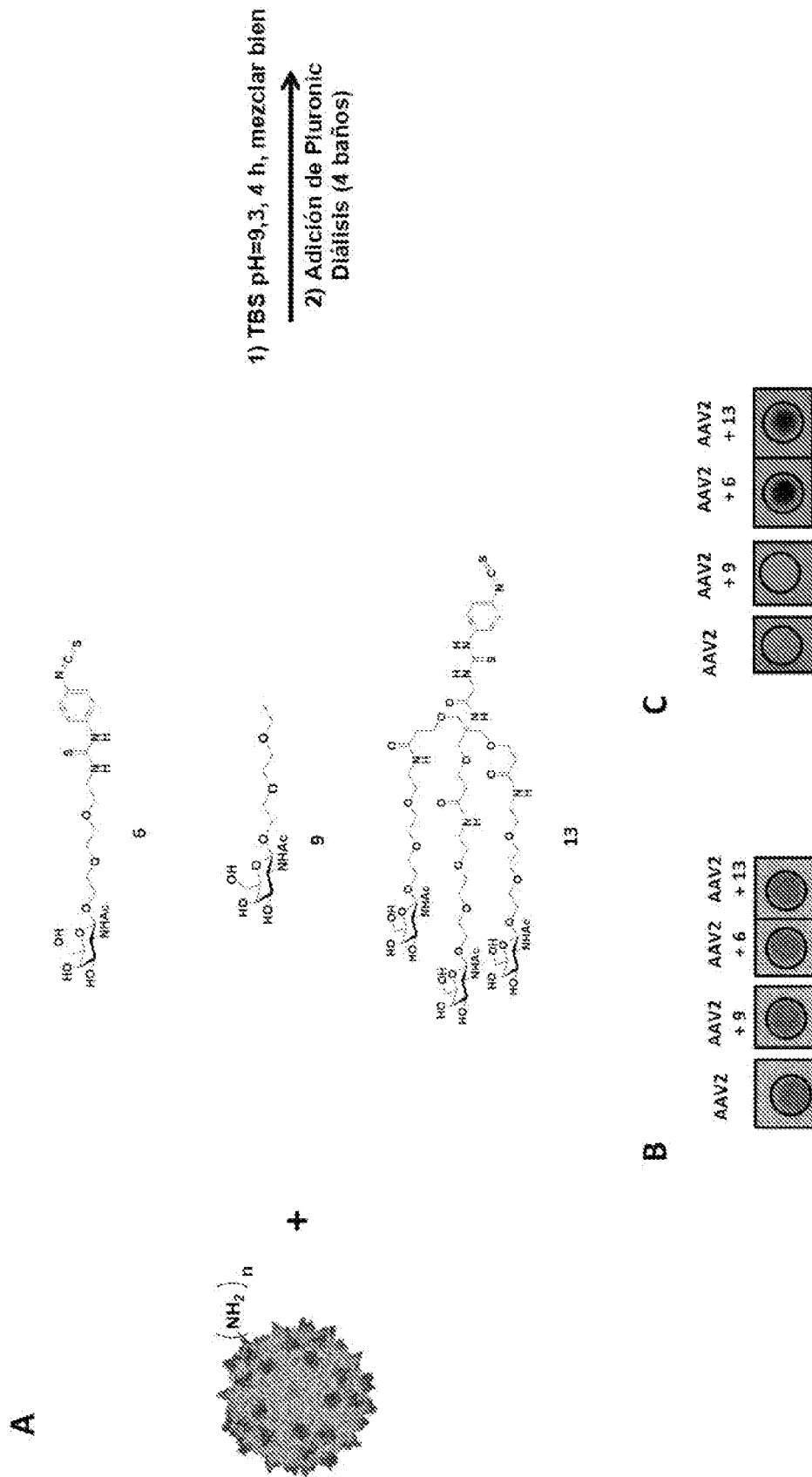


Figura 3

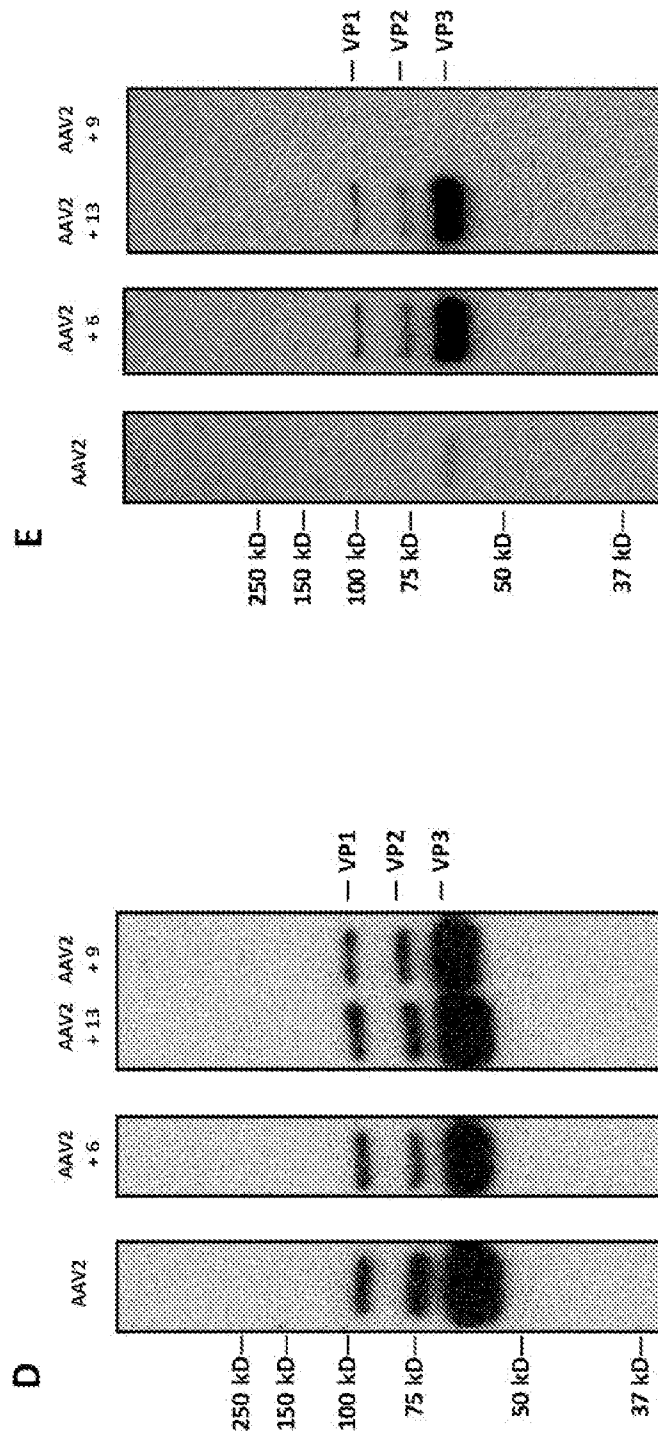


Figura 3 (continuación)

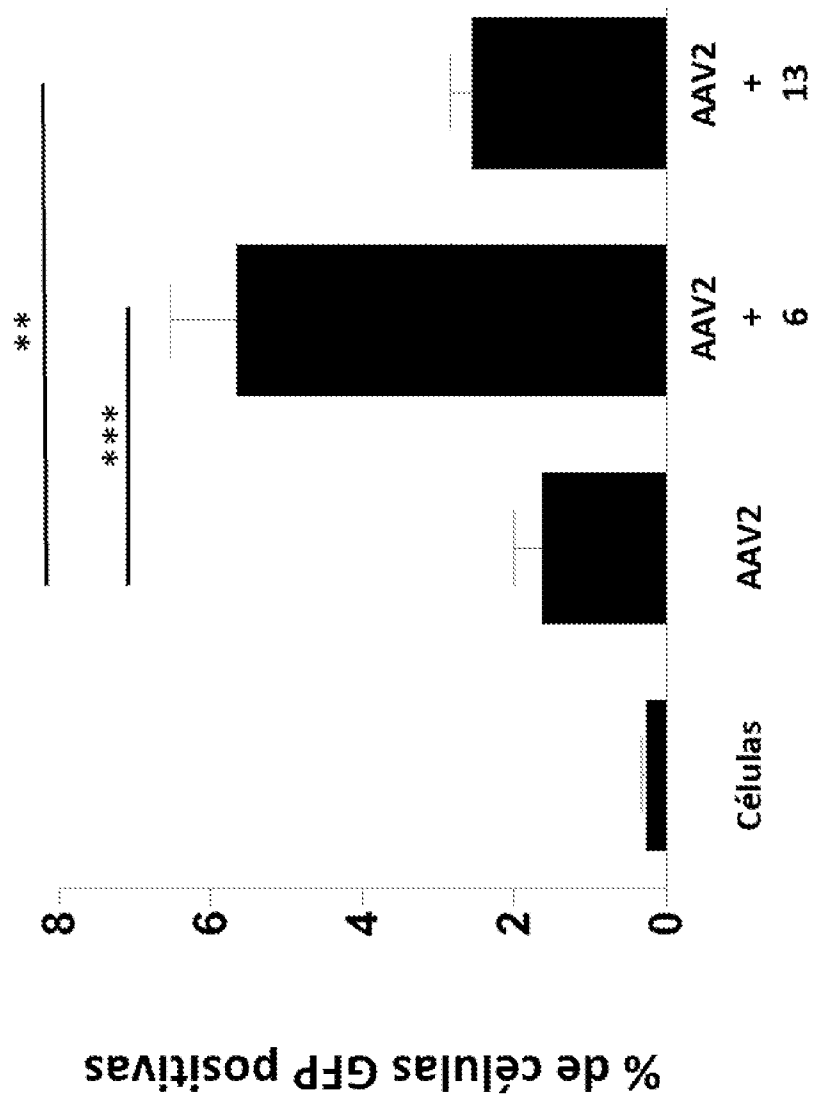


Figura 4

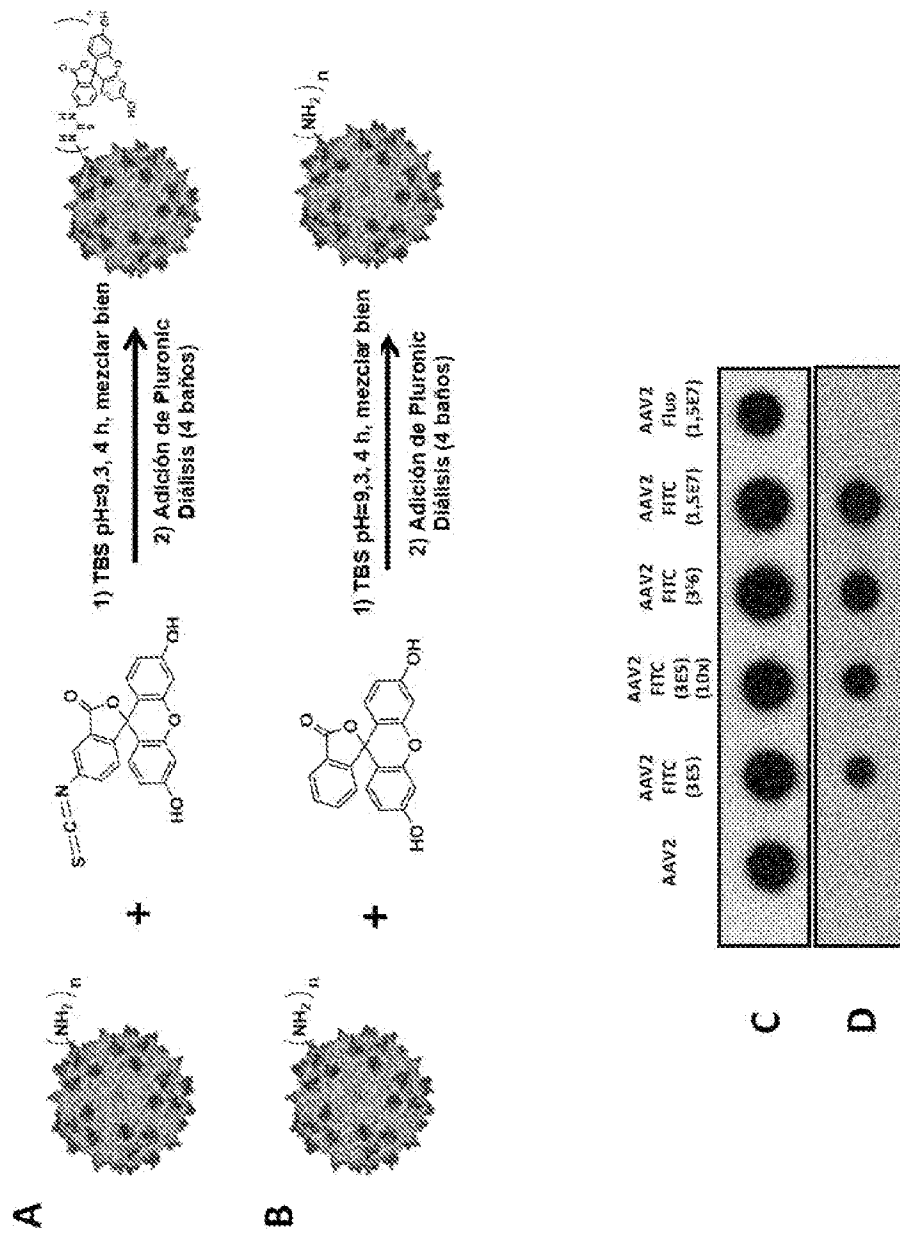


Figura 5

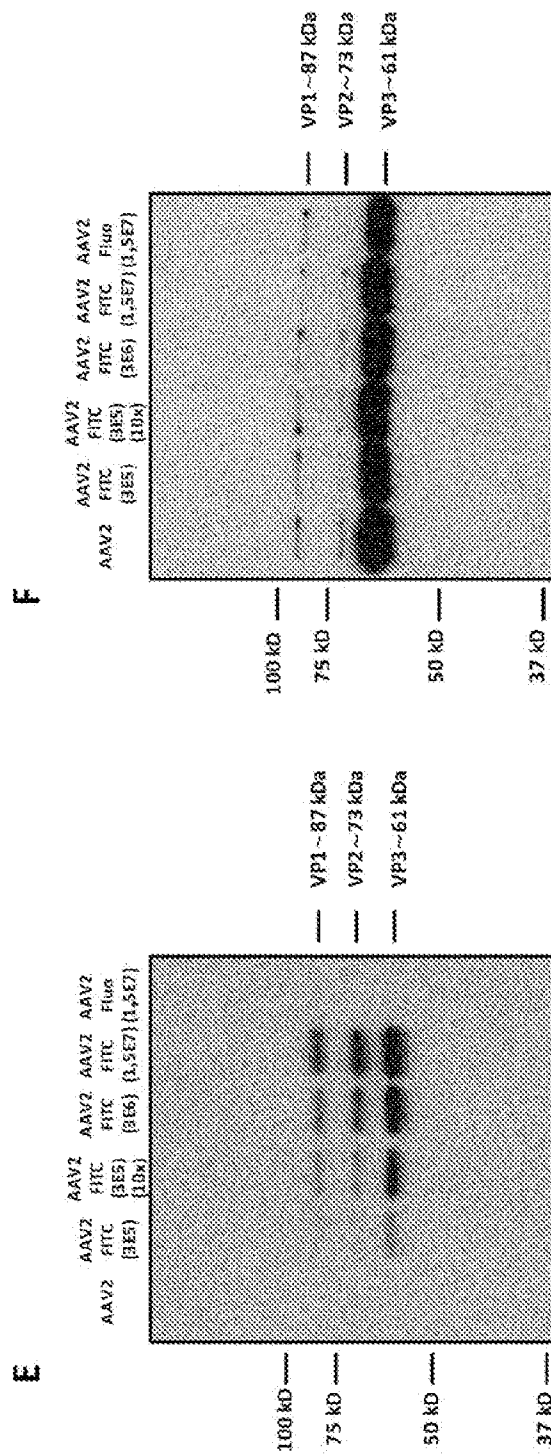


Figura 5 (continuación)

G

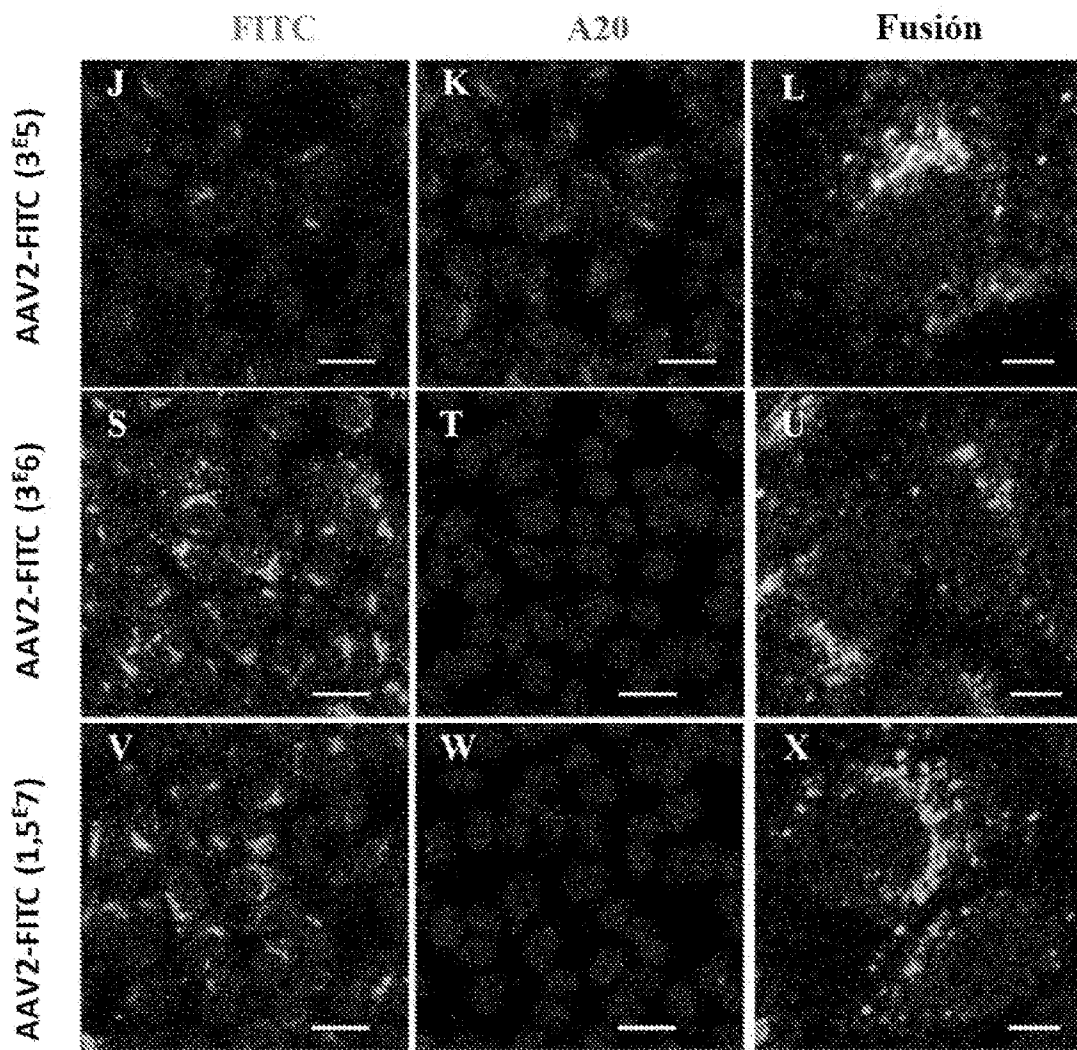


Figura 5 (continuación)

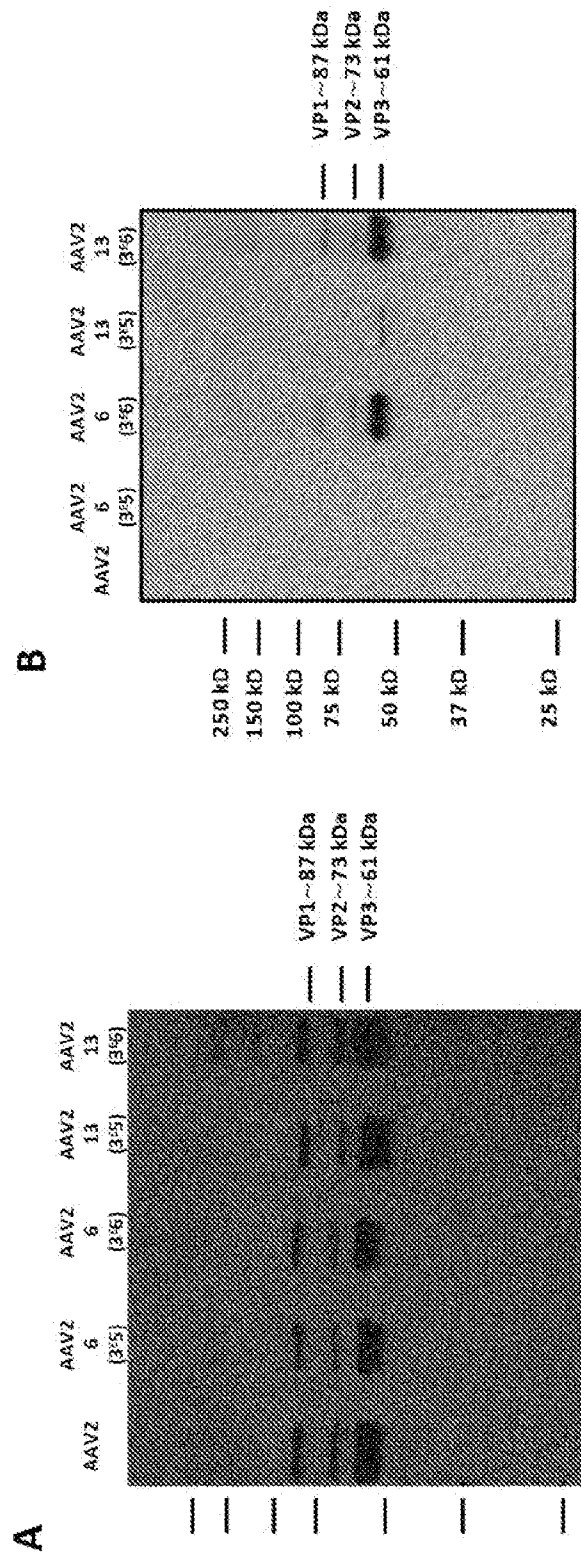


Figura 6

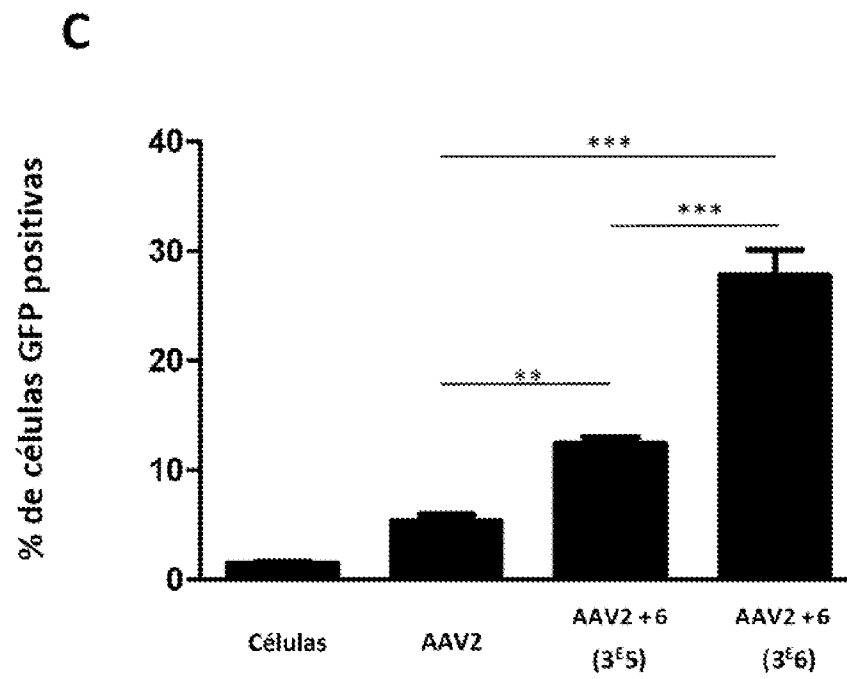


Figura 6 (continuación)

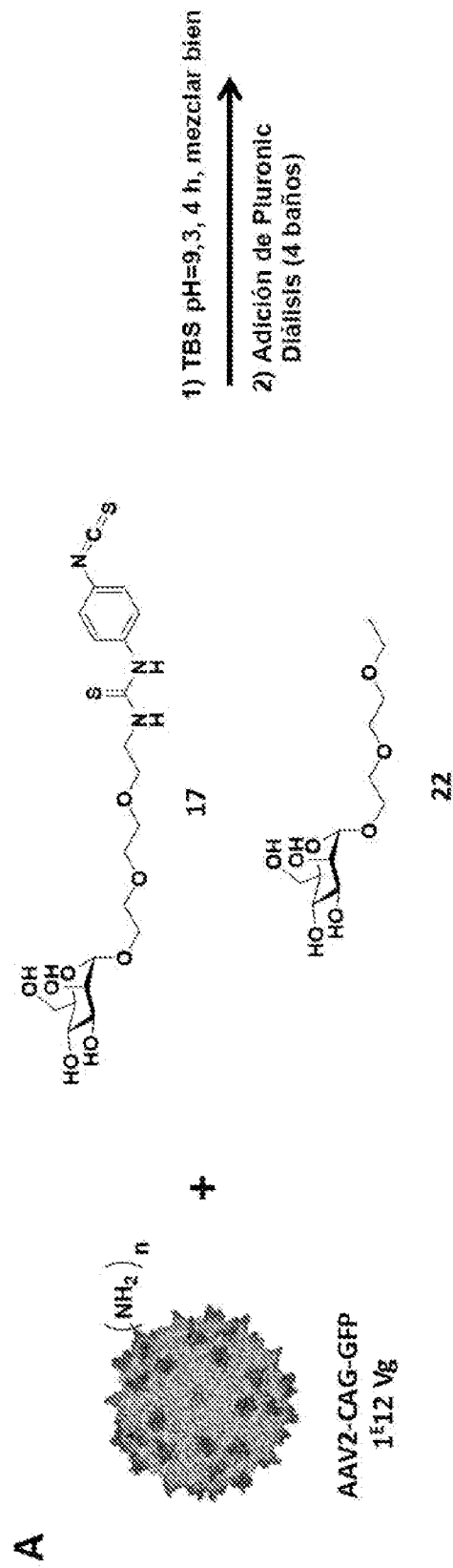


Figura 7

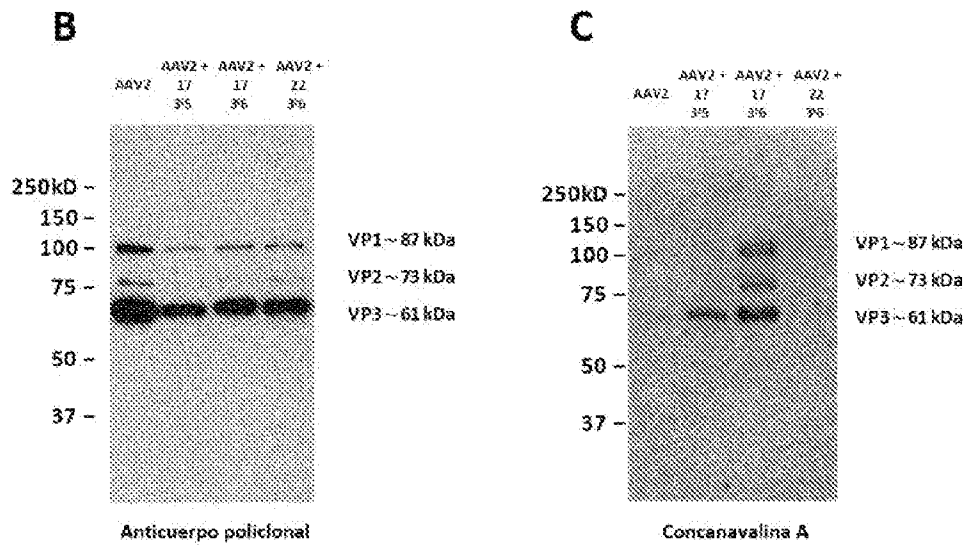


Figura 7 (continuación)

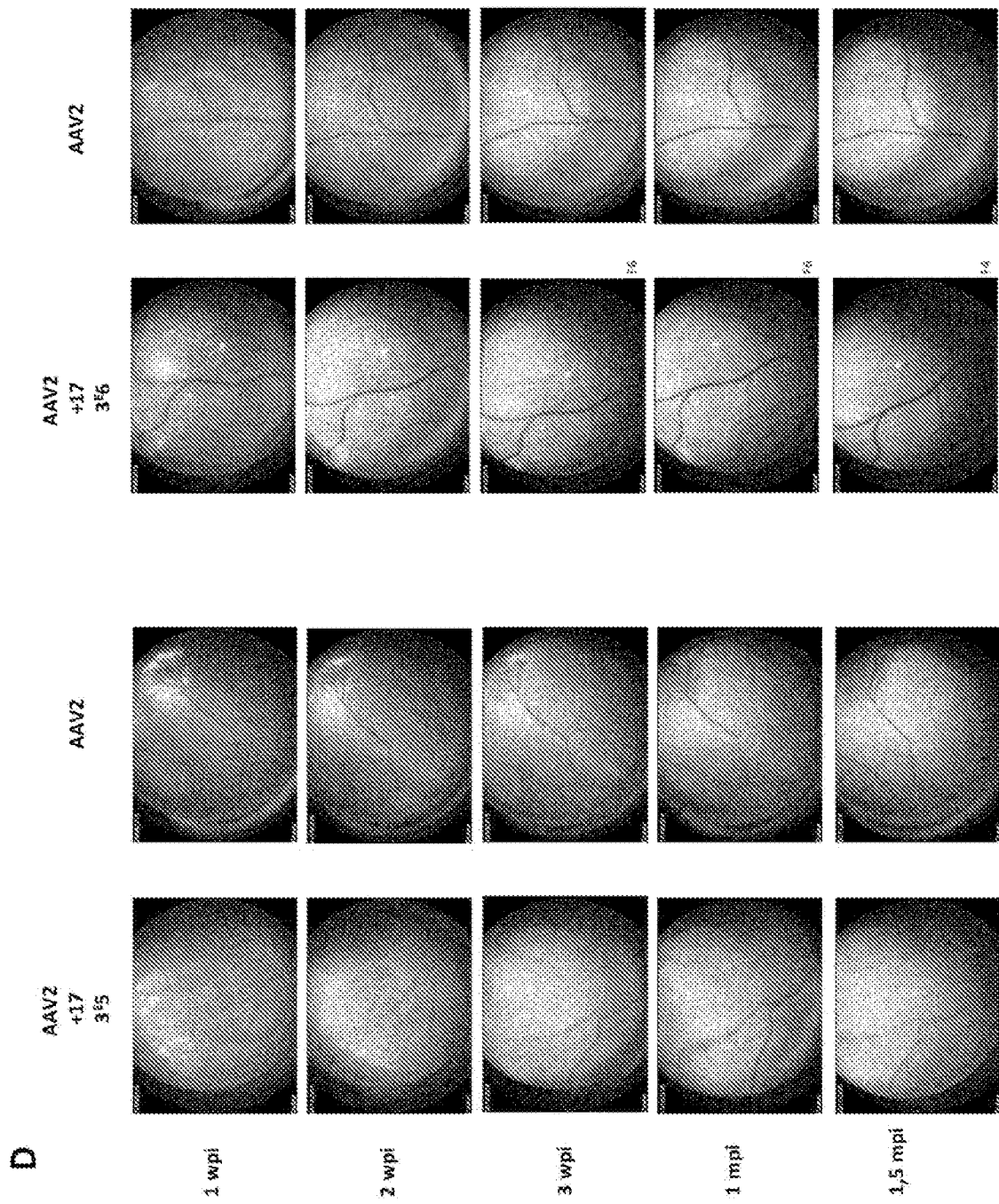


Figura 7 (continuación)

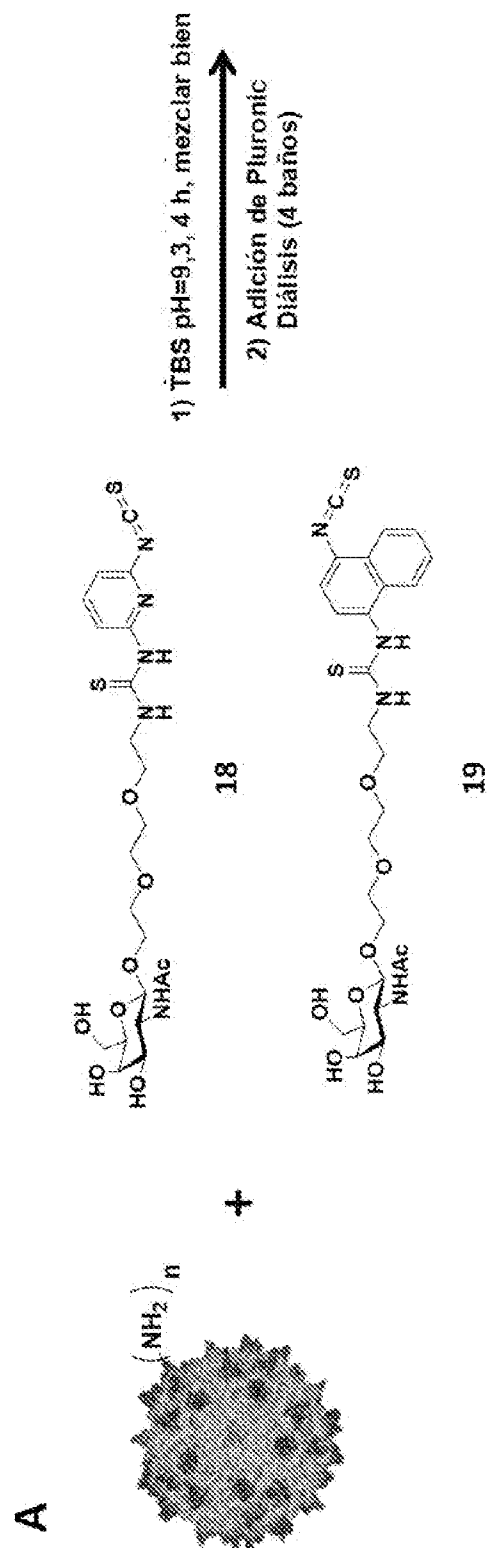


Figura 8

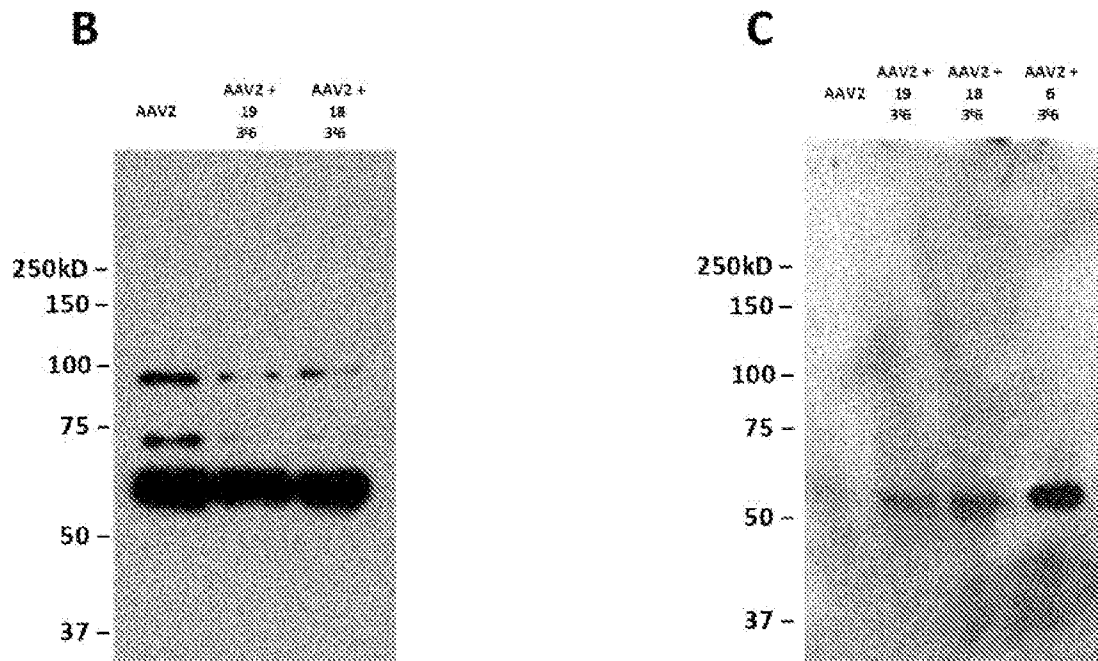


Figura 8 (continuación)

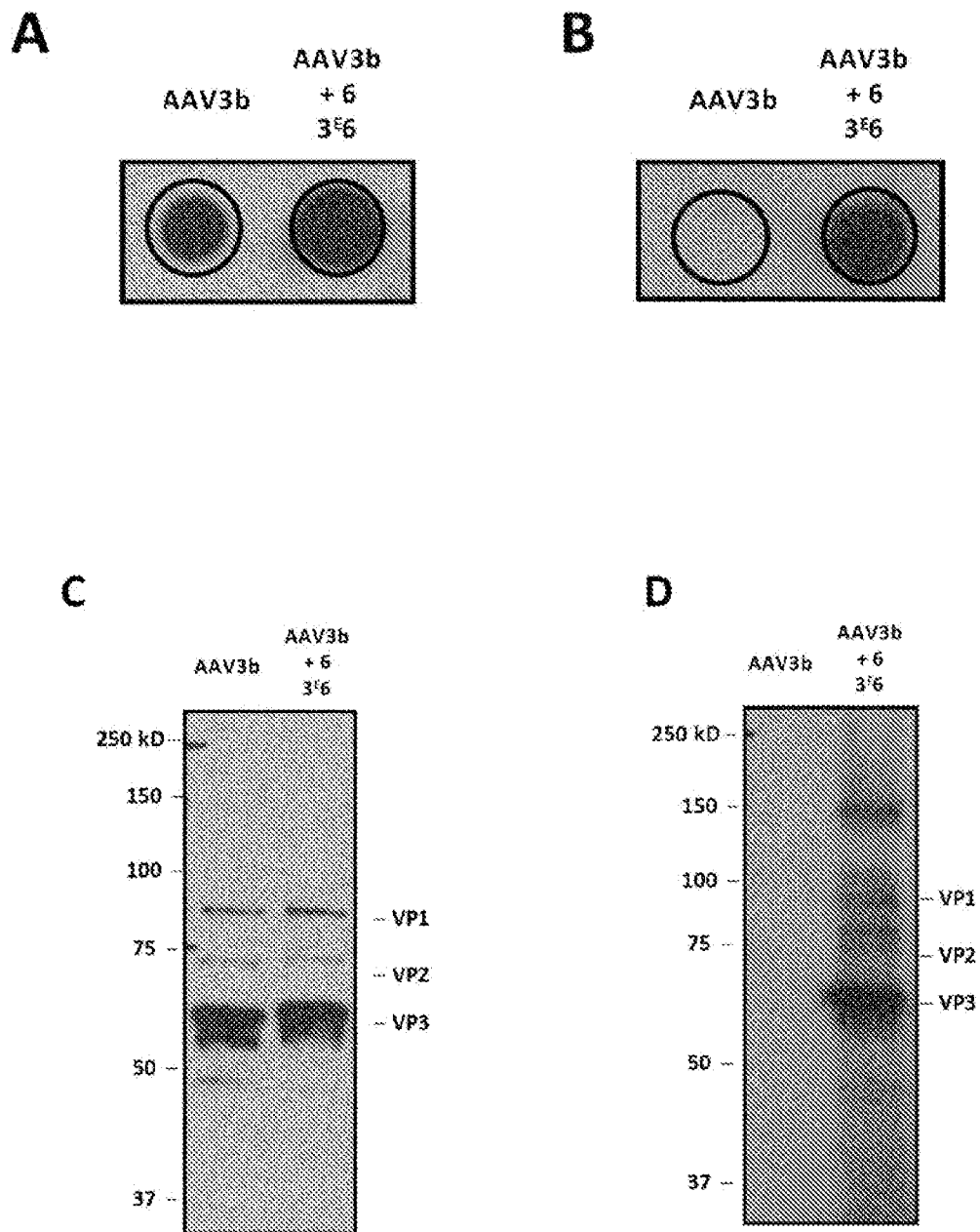


Figura 9