

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 297**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**A61K 31/436** (2006.01)  
**A61K 35/761** (2015.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 35/00** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2018** **PCT/US2018/033247**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2018** **WO18213618**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2018** **E 18801604 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024** **EP 3624856**

54 Título: **Terapia génica para la esclerosis tuberosa**

30 Prioridad:

**17.05.2017 US 201762507358 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.09.2024**

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION**  
(100.0%)  
**55 Fruit Street**  
**Boston, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

**BREAKEFIELD, XANDRA;**  
**MAGUIRE, CASEY;**  
**PRABHAKAR, SHILPA y**  
**YELLEN, DAVID**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 978 297 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

Terapia génica para la esclerosis tuberosa

## 5 Antecedentes de la invención

El complejo de esclerosis tuberosa (TSC, por sus siglas en inglés) es un síndrome supresor de tumores que se hereda de manera autosómica dominante con una incidencia de aproximadamente 1 en 5.500. Los pacientes heredan una mutación en un alelo del gen *TSC1* (que codifica la hamartina) o el gen *TSC2* (que codifica la tuberina). Estas proteínas juntas suprimen la actividad de la diana del complejo 1 de rapamicina (mTORC1) de los mamíferos. Si se produce una mutación en el alelo normal correspondiente durante el desarrollo o en algunas células somáticas, produce un agrandamiento y una mayor proliferación de las células, formando tumores benignos (por ejemplo, hamartomas). Estos tumores pueden afectar una diversidad de tejidos, incluyendo el cerebro, corazón, riñones, piel y pulmones. En el cerebro, pueden provocar retraso en el desarrollo, autismo, epilepsia e hidrocefalia. Las afecciones potencialmente mortales en el TSC incluyen angiomiolipomas renales, que pueden causar hemorragia interna, y

linfangioleiomiomatosis (LAM, por sus siglas en inglés), que puede comprometer la respiración. Aunque la rapamicina y los fármacos relacionados han sido eficaces para reducir el tamaño de las lesiones de algunos tipos de tumores, deben administrarse de forma continua y tienen efectos secundarios, incluido un desarrollo cerebral comprometido y supresión inmune. Además, algunos pacientes no responden a estos medicamentos o responden inicialmente y después se vuelven resistentes. Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de tratamientos mejorados para el TSC.

Los resúmenes de la ASGCT 18<sup>th</sup> Annual Meeting (Molecular Therapy, 2015, vol. 23, n.º Supl.1, págs. s1-s289) y Prabhakar *et al.* (Neurobiology of Disease, 2015, vol. 82, págs. 22-31) se refieren a la transferencia de génica mediada por AAV. Se inyecta un vector AAV que expresa una forma marcada de hamartina en ratones recién nacidos de un genotipo en el que *Tsc1* se pierde selectivamente en ratones recién nacidos a partir del día embrionario 12. Los ratones tratados con vector mostraron una mejora en la supervivencia. Sin embargo, el vector usado en los experimentos no comprende una cTuberina acortada que carezca de un sitio de fosforilación por Akt Thr 1462.

Inoki *et al.* (Nature Cell Biology, 2002, vol. 4, n.º 9, págs. 648-657) enseñan que la inactivación de cualquiera de los sitios de fosforilación por Akt de tuberina potencia la actividad de *Tsc2*. Los sitios de fosforilación por Akt descritos también incluyen Thr 1462. Para eliminar dicho sitio de fosforilación por Akt, se sugiere una mutación T1462A. Cai *et al.* (The Journal of Cell Biology, 2006, vol. 173, n.º 2, págs. 279-289) enseñan Thr 1462 como un sitio de fosforilación por Akt de tuberina y sugieren una mutación T1462A para eliminarlo. No se sugieren fragmentos acortados.

La Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2012/252877 describe el tratamiento del complejo de esclerosis tuberosa usando un vector AAV que comprende un polinucleótido que codifica *Tsc1* o *Tsc2* o una variante de los mismos. Sin embargo, no se propone usar cTuberina genomanipulada que carezca de un sitio de fosforilación por Akt Thr 1462.

La Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2016/009785 enseña una secuencia peptídica de *Tsc2* de acuerdo con la SEQ ID NO. 2 de la presente solicitud y el uso de fragmentos de dicha secuencia para terapia génica. Sin embargo, esta divulgación no conduce particularmente a una cTuberina donde, en comparación con la tuberina humana, se elimina una porción de secuencia más larga de los aminoácidos 451-1514 de SEQ ID NO. 10.

## 45 Sumario de la invención

La invención proporciona un virus adenoasociado recombinante (rAAV) como se define en las reivindicaciones 1-4, una composición que comprende el rAAV como se define en la reivindicación 5 y el rAAV para su uso en un método para tratar el complejo de esclerosis tuberosa (TSC) como definido en las reivindicaciones 6-15. Las composiciones y métodos descritos en el presente documento se refieren a una tuberina condensada (cTuberina) y moléculas de ácido nucleico que codifican la cTuberina.

En un primer aspecto, la invención presenta un virus adenoasociado recombinante (rAAV) como se define en la reivindicación 1 que comprende una cápside de AAV y un genoma de AAV empaquetado en la misma, incluyendo el genoma de AAV una molécula de ácido nucleico capaz de expresar cTuberina que comprende (i) una región de unión a hamartina que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2, y (ii) una región de proteína activadora de GTPasa (GAP) que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3, en donde la cTuberina carece de los aminoácidos 451-1514 de SEQ ID NO:10 que incluye un sitio de fosforilación por Akt Thr 1462.

Por ejemplo, el rAAV incluye una cápside de AAV y un genoma de AAV empaquetado en la misma, incluyendo el genoma de AAV: (a) una secuencia de repetición terminal invertida (ITR, por sus siglas en inglés) 5' de AAV; (b) una secuencia de control reguladora; (c) una molécula de ácido nucleico que codifica la cTuberina anterior; y (d) una secuencia ITR 3' de AAV.

En algunas realizaciones, la cápside de AAV es una cápside de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7,

AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 o AAV12, o una variante de una cualquiera de las cápsides de AAV.

En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico tiene codones optimizados para su expresión en una célula humana. En realizaciones adicionales, la molécula de ácido nucleico tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5. En realizaciones particulares, la molécula de ácido nucleico es la SEQ ID NO: 5.

En otras realizaciones, el ácido nucleico está unido operativamente a una secuencia de control reguladora. Las secuencias de control reguladoras ilustrativas incluyen, sin limitación, un promotor de citomegalovirus (CMV) humano, un promotor de  $\beta$ -actina de pollo (CBA), un promotor/potenciador de LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), un promotor de SV40, un promotor de dihidrofolato reductasa, un promotor de fosfoglicerol cinasa, un potenciador génico inmediato/temprano de CMV/promotor de CBA, un promotor de sinapsina o un promotor de proteína ácida fibrilar glial (GFAP).

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico incluye una repetición terminal invertida (ITR). En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico incluye una señal de poliadenilación tal como una región de poli A.

En un segundo aspecto, la invención presenta una composición como se define en la reivindicación 5 que incluye el rAAV de una cualquiera de las realizaciones anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un tercer aspecto, la invención presenta un rAAV para su uso en un método para tratar a un paciente que tiene complejo de esclerosis tuberosa (TSC) como se define en la reivindicación 7. El método de tratamiento *per se* y cualquier etapa de administración a un paciente no se incluyen en el alcance de la invención pero se describen en el presente documento para ilustrar el uso previsto.

En algunas realizaciones, el paciente tiene un angiomiolipoma renal. En algunas realizaciones, el rAAV es para su uso en método en donde la cTuberina se administra por vía intravascular, en particular en la arteria o vena renal.

En otras realizaciones, el paciente tiene una linfangioleiomiomatosis (LAM). En algunas realizaciones, la cTuberina es para su administración en los pulmones.

En otras realizaciones más, el paciente tiene una disfunción cerebral. En algunas realizaciones, la cTuberina está destinada a administrarse por vía intracerebral o intratecal.

En algunas realizaciones, la cTuberina está destinada a administrarse a un angiomiolipoma renal, una LAM o el cerebro.

En algunas realizaciones, el rAAV está destinado a administrarse a una célula cerebral, una célula cardíaca, una célula renal, una célula cutánea o una célula pulmonar. En otras realizaciones más, el rAAV está destinado a administrarse por vía intravascular, en particular por vía intravenosa, o intraventricular, intracerebral, intratecal o dérmica.

Al paciente se le puede administrar además un fármaco usado para tratar el TSC. Un fármaco de este tipo puede ser rapamicina o un análogo de rapamicina.

## Definiciones

Como se usa en el presente documento, "administrar" o una derivación gramatical del mismo se refiere a la colocación de un agente como se divulga en el presente documento en un sujeto mediante un método o ruta que da como resultado la localización, al menos parcial, del agente en un sitio deseado. La administración no está abarcada por el alcance de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, "optimización de codones" se refiere a modificar una secuencia de ácido nucleico para cambiar ácidos nucleicos individuales sin ningún cambio resultante en el aminoácido codificado. Las secuencias modificadas de esta manera se denominan en el presente documento "de codones optimizados". Este proceso puede realizarse en cualquiera de las secuencias descritas en esta memoria descriptiva para mejorar la expresión o la estabilidad. La optimización de codones puede realizarse de una manera tal como la descrita en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 7.561.972, 7.561.973 y 7.888.112. La secuencia que rodea el sitio de inicio de la traducción se puede convertir en una secuencia Kozak consenso de acuerdo con métodos conocidos. Véase, por ejemplo, Kozak *et al*, Nucleic Acids Res. 15(20): 8125-8148 (1987).

Como se usa en el presente documento, una secuencia que "codifica" una proteína particular es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso de ADN) y se traduce (en el caso de ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas; aunque un experto en la técnica apreciará fácilmente que diversos polinucleótidos no funcionan de esta manera (por ejemplo, ARN no codificante, ARNp, ribozimas, en donde el transcrito de ARN es el producto). Con respecto a los productos proteicos (es decir, productos distintos de ARN), los límites de la secuencia codificante se determinan mediante un codón de inicio en el extremo 5' (es decir, amino) y un codón finalizador de la traducción en el extremo 3' (es decir, carboxi). Un gen puede

incluir, pero sin limitación, ADNc de ARNm procariota o eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN procariota o eucariota e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción normalmente se ubicará en 3' con respecto a la secuencia génica. Además, un "gen" (i) comienza con una región promotora que contiene múltiples elementos reguladores, incluyendo posiblemente potenciadores, para dirigir la transcripción de las secuencias de la región codificante; (ii) incluye secuencias codificantes, que comienzan en el sitio de inicio de la transcripción que está ubicado cadena arriba del sitio de inicio de la traducción y termina en el sitio de terminación de la transcripción, que puede estar bastante cadena abajo del codón finalizador (una señal de poliadenilación generalmente está asociada con el sitio de terminación de la transcripción y está situada cadena arriba de la parada transcripcional); y (iii) puede contener intrones y otras secuencias reguladoras para modular la expresión y mejorar la estabilidad del transcrito de ARN. Aún de acuerdo con la presente invención, un "gen" puede referirse a una secuencia que codifica una proteína.

Como se usa en el presente documento, "expresión" se refiere al proceso mediante el cual un gen estructural produce un polipéptido. Implica la transcripción del gen en ARNm y la traducción de dicho ARNm en uno o más polipéptidos.

Como se usa en el presente documento, un "vector de expresión" es un vector o vehículo similar a un vector de clonación pero que es capaz de expresar un gen que se ha clonado en él después de la transformación en un hospedador. El gen clonado normalmente se coloca bajo el control de (es decir, unido operativamente a) determinadas secuencias de control tales como secuencias promotoras. Las secuencias de control de la expresión variarán dependiendo de si el vector está diseñado para expresar el gen unido operativamente en un hospedador procariota o eucariota y pueden contener adicionalmente elementos transcripcionales tales como elementos potenciadores, secuencias de terminación, elementos de especificidad tisular y/o sitios de inicio y terminación de la traducción.

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico", como se entiende y se usa generalmente en el presente documento, se refiere a cadenas de nucleótidos unidas entre sí mediante enlaces fosfodiéster para formar un heteropolímero de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser bicatenarias o monocatenarias y pueden ser moléculas de desoxirribonucleótidos (ADN), tales como ADNc o ADN genómico, o moléculas de ribonucleótidos (ARN). Como tal, la molécula de ácido nucleico puede incluir uno o más exones, con o sin, según corresponda, intrones.

Como se usa en el presente documento, "unido/a operativamente" se refiere a una primera molécula unida a una segunda molécula, en donde las moléculas están dispuestas de manera que la primera molécula afecta a la función de la segunda molécula. Las dos moléculas pueden formar parte o no de una única molécula contigua y pueden ser o no adyacentes. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una molécula polinucleotídica transcribible si el promotor modula la transcripción de la molécula polinucleotídica transcribible de interés en una célula. Adicionalmente, dos porciones de un elemento regulador de la transcripción están unidas operativamente entre sí si se unen de manera que la funcionalidad activadora de la transcripción de una porción no se vea afectada negativamente por la presencia de la otra porción. Dos elementos reguladores de la transcripción pueden estar unidos operativamente entre sí mediante un ácido nucleico enlazador (por ejemplo, un ácido nucleico no codificante intermedio) o pueden estar unidos operativamente entre sí sin nucleótidos intermedios presentes.

Como se usa en el presente documento, el "porcentaje de identidad" entre dos secuencias se determina mediante el algoritmo BLAST 2.0, que se describe en Altschul *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. El programa informático para realizar análisis de BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

Como se usa en el presente documento, "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas, que son adecuados para el contacto con los tejidos de un sujeto, tal como un mamífero (por ejemplo, un ser humano) sin demasiada toxicidad, irritación, respuesta alérgica y otras complicaciones problemáticas acordes con una relación razonable de beneficio/riesgo.

Como se usan en el presente documento, "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a un polímero de aminoácidos. Un péptido es un polipéptido relativamente corto, típicamente de entre aproximadamente 2 y 60 aminoácidos de longitud. Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia polipeptídica" o "secuencia de aminoácidos" puede referirse al propio material polipeptídico y/o a la información de secuencia (es decir, la sucesión de letras o códigos de tres letras usados como abreviaturas para nombres de aminoácidos) que bioquímicamente caracteriza un polipéptido. Una secuencia polipeptídica presentada en el presente documento se presenta en una dirección del extremo N a C, a menos que se indique lo contrario.

Como se usa en el presente documento, "elemento de control regulador" o "secuencia de control reguladora" se refiere colectivamente a regiones promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores cadena arriba, orígenes de replicación, sitios internos de entrada al ribosoma ("IRES"), potenciadores y similares, que en conjunto proporcionan la replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula receptora. No es necesario que estos elementos de control estén siempre presentes, siempre que la secuencia codificante seleccionada sea capaz de replicarse, transcribirse y traducirse en una célula hospedadora apropiada.

Como se usa en el presente documento, "virus recombinante" se refiere a un virus que ha sido alterado genéticamente (por ejemplo, mediante la adición o inserción de una construcción de ácido nucleico heteróloga en la partícula).

- 5 Como se usan en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" son intercambiables y se refieren a un organismo que recibe tratamiento para una enfermedad o afección particular como se describe en el presente documento.

- 10 Como se usan en el presente documento, "tratar", "tratamiento", "que trata", o "mejora" se usan en referencia a una enfermedad, trastorno o afección médica, se refieren a tratamientos terapéuticos para una afección, en donde el objetivo es revertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o detener la progresión o la gravedad de un síntoma o afección. El término "tratar" incluye reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma de una afección. Generalmente, el tratamiento es "eficaz" si se reducen uno o más síntomas o marcadores clínicos. Como alternativa, el tratamiento es "eficaz" si se reduce o se detiene la progresión de una patología. Es decir, "tratamiento" incluye no solo la mejora de los síntomas o los marcadores, sino también un cese o al menos una ralentización del progreso o empeoramiento de los síntomas que se esperarían en ausencia del tratamiento. Por ejemplo, en el caso de los angiomiolipomas renales, el tamaño del tumor se puede controlar mediante RMN y la reducción del tamaño de las células debido al reemplazo de la función de la tuberina puede revelarse de acuerdo con procedimientos estándar (por ejemplo, tales como los usados para controlar el tratamiento del TSC con rapamicina). Los métodos de tratamiento no están abarcados por el alcance de la presente invención.

- 25 Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, alivio de uno o más síntomas, disminución del alcance del déficit, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la progresión del complejo de esclerosis tuberosa, retraso o desaceleración de la invasividad o crecimiento de tumores o hamartomas, y mejora o paliación de los síntomas asociados con dichos tumores o hamartomas. El tratamiento también incluye una disminución de la mortalidad o un aumento de la esperanza de vida de un sujeto en comparación con uno que no recibe el tratamiento.

- 30 Como se usa en el presente documento, "vector" se refiere a cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc., que es capaz replicarse cuando se asocia con los elementos de control adecuados y que puede transferir secuencias génicas entre células. Por lo tanto, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores víricos.

- 35 A menos que se defina de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados con respecto a la presente solicitud tendrán los significados comúnmente entendidos por los expertos en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Esta invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares, etc., descritos en el presente documento y, como tal, puede variar. La terminología usada en el presente documento sirve para describir realizaciones particulares solamente y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones.

- 40 La invención descrita en el presente documento proporciona numerosas ventajas. Si bien el alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas, en el presente documento se describen aspectos adicionales con fines ilustrativos. Por ejemplo, en el presente documento se describen composiciones y métodos útiles para tratar el complejo de esclerosis tuberosa mediante terapia génica usando virus adenoasociados recombinantes. Anteriormente, el TSC causado por mutaciones en TSC2 no se corregía con terapia génica debido a la capacidad de inserción relativamente pequeña de un vector AAV de 4,7 kb en comparación con el ADNc de 5,4 kb de la tuberina humana. Como se describe en el presente documento, los métodos divulgados para corregir mutaciones en TSC2 utilizan una forma condensada de tuberina humana, cTuberina. El ADNc de la cTuberina descrita en el presente documento tiene aproximadamente 2,3 kb, que se expresa fácilmente en un vector AAV. De hecho, los vectores AAV han demostrado ser seguros y beneficiosos en la terapia génica. Estos vectores se pueden suministrar, por ejemplo, por vía intravascular para llegar a muchos tejidos en una sola inyección, y algunos serotipos pueden cruzar la barrera hematoencefálica. Típicamente, una sola inyección confiere resultados beneficiosos a largo plazo. Nuestras composiciones y métodos permiten el uso de vectores AAV que expresan cTuberina para el tratamiento de manifestaciones del complejo de esclerosis tuberosa en pacientes con mutaciones en TSC2. Dichos vectores no sólo son útiles para tratar angiomiolipomas renales, sino también para LAM y disfunciones cerebrales resultantes de TSC2.

- 60 Adicionalmente, el presente documento describe un método alternativo para tratar el TSC que no requiere necesariamente rapamicina o sus análogos, lo que puede causar toxicidad y acontecimientos adversos relacionados con la sobrepresión de mTORC1. En cambio, las composiciones divulgadas y los métodos descritos emplean la funcionalidad de la tuberina, que sólo es activa cuando forma complejo con hamartina. Debido a que los niveles de hamartina son normales en pacientes con TSC2, se prevé que haya una poca toxicidad o baja toxicidad debido a la sobreexpresión de cTuberina a través del suministro de vectores. Adicionalmente, si bien la rapamicina y los fármacos relacionados pueden inhibir la actividad de mTORC1, la cTuberina es capaz de inhibir las acciones patológicas dependientes de Rheb independientes de mTORC1 y de mTORC1 y, por lo tanto, es potencialmente más eficaz que las terapias anteriores para la esclerosis tuberosa.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones preferidas de la misma y de las reivindicaciones.

### Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1A muestra la secuencia de aminoácidos de cTuberina (SEQ ID NO: 1).
- La figura 1B muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica cTuberina (SEQ ID NO: 5).
- 10 La figura 2A es un diagrama esquemático de los dominios funcionales de las proteínas humanas de longitud completa TSC1 y TSC2 y la proteína tuberina condensada (cTuberina). Los residuos de aminoácidos se indican con los números encima de las flechas. T2BD se refiere al dominio de unión a TSC2, T1BD se refiere al dominio de unión a TSC1, espiral se refiere al dominio en espiral predicho y GAP se refiere a la proteína activadora de GTPasa, que es un dominio en la tuberina humana homólogo al de Rap1GAP.
- 15 La figura 2B es un diagrama esquemático del vector AAV de cTuberina.
- La figura 2C es un diagrama esquemático de la construcción del plásmido del vector AAV-CBA-cTuberina.
- 20 La figura 3A es una transferencia de Western que muestra el nivel de expresión de cTuberina en células COS-7 transfectadas con la construcción del plásmido del vector AAV-CBA-cTuberina. Aparece una banda en el peso molecular previsto para cTuberina de aproximadamente 85 kDa.
- La figura 3B es una transferencia de Western que muestra los niveles de expresión de pS6, S6 y GAPDH en células transfectadas con diversas construcciones. La expresión de pS6 estaba elevada en las células que carecían de actividad de cTuberina.
- 25 La figura 4A es un gráfico que muestra la supervivencia de ratones *Tsc2<sup>cl/c</sup>* inyectados con el vector AAV1-CBA-Cre al nacer (día postnatal 0 (P0)), ratones *Tsc2<sup>cl/c</sup>* inyectados con AAV9-CBA-cTuberina en P21, y ratones no inyectados. La esperanza de vida media de los ratones inyectados con AAV1-CBA-Cre fue de 35 días, mientras que la esperanza de vida media fue >185 días para los ratones inyectados con AAV9-CBA-cTuberina y >175 días para los ratones no inyectados.
- 30 La figura 4B es un gráfico que muestra la supervivencia de ratones *Tsc2<sup>cl/c</sup>* inyectados con el vector AAV1-CBA-Cre en P0 y ratones inyectados con el vector AAV1-CBA-Cre en P0 seguido de una inyección con el vector AAV1-CBA-cTuberina en P21. La esperanza de vida media fue de 26,5 días para los ratones no inyectados y 35 días para los ratones inyectados con AAV1-CBA-cTuberina.
- 35 La figura 4C es un gráfico que muestra la supervivencia de ratones *Tsc2<sup>cl/c</sup>* inyectados con el vector AAV1-CBA-Cre en P3 y ratones inyectados con el vector AAV1-CBA-Cre en P3 seguido de una inyección con el vector AAV1-CBA-cTuberina en P21. La esperanza de vida media fue de 36 días para los ratones no inyectados y 54 días para los ratones inyectados con AAV1-CBA-cTuberina.
- 40 La figura 4D es un gráfico que muestra la supervivencia de ratones *Tsc2<sup>cl/c</sup>* inyectados con el vector AAV1-CBA-Cre en P3 y ratones inyectados con el vector AAV1-CBA-Cre en P3 seguido de una inyección con el vector AAV9-CBA-cTuberina en P21. La esperanza de vida media fue de 32 días para los ratones no inyectados y 45 días para los ratones inyectados con AAV9-CBA-cTuberina.
- 45 La figura 4E es un gráfico que muestra la supervivencia de cuatro grupos de ratones *Tsc2<sup>cl/c</sup>*. Al primer grupo se le inyectó el vector AAV1-CBA-Cre únicamente en P0; al segundo grupo se le inyectó el vector AAV1-CBA-Cre en P0 seguido de una inyección con AAV9-CBA-cTuberina en P3; al tercer grupo de ratones se le inyectó el vector AAV1-CBA-Cre en P0 solo y se trataron con vigabatrina; y al cuarto grupo se le inyectó el vector AAV1-CBA-Cre en P0 seguido de una inyección con AAV9-CBA-cTuberina en P3 y se trató con vigabatrina. La esperanza de vida media de los ratones que no recibieron fármaco y no inyectados fue de 23 días; de los ratones tratados con vigabatrina y no inyectados fue de 27 días; de los ratones que no recibieron fármaco e inyectados fue de 35,5 días; y los ratones tratados con vigabatrina e inyectados fue de 40 días.
- 50 Las figuras 5A-5F muestran la tinción de cerebros de ratones tratados de acuerdo con el diseño experimental de la figura 4B usando tinción con hematoxilina y eosina (H&E) o inmunohistoquímica (IHC) para pS6. La figura 5A muestra la tinción en ratones normales no inyectados (control); las figuras 5B-5E muestran la tinción en ratones inyectados en P0 con el vector AAV1-CBA-Cre, y la figura 5F muestra la tinción de los ratones tratados adicionalmente en P3 con AAV1-CBA-cTuberina.
- 60 La figura 6A muestra los volúmenes de los tumores de linfangioleiomiomatosis (LAM) inyectados por vía subcutánea en ratones NOD-SCID Il2R gamma (NSG).
- 65

La figura 6B es un gráfico que muestra el crecimiento de tumores de LAM en ratones no inyectados y ratones inyectados con AAV9-CBA-cTuberina en las semanas 4 y 9.

### Descripción detallada de las realizaciones de la invención

La terapia génica sistémica, como se describe en el presente documento, se puede lograr en pacientes con TSC mediante el suministro (por ejemplo, a través del sistema vascular) de una tuberina condensada (cTuberina) tal como una codificada en un vector AAV, que es útil para disminuir la tamaño de las células afectadas y la reducción de hamartomas en múltiples tejidos, incluso en todo el sistema nervioso central, riñones y pulmones. La cTuberina es útil, por ejemplo, por su capacidad para suprimir la actividad de mTOR. Pueden identificarse formas útiles de cTuberina de acuerdo con cualquier método, por ejemplo, ensayando su capacidad para suprimir la fosforilación de S6 en células *in vitro* que carecen de tuberina como se describe en el presente documento. A continuación se describe un diseño útil de cTuberina en el tratamiento del TSC.

En los Ejemplos a continuación, se describe la genomaniplación de una versión condensada de tuberina humana, denominada cTuberina, que encaja en un vector AAV. El tamaño del ADNc de la tuberina humana es de 5,4 kb, lo que supera la capacidad de empaquetamiento del transgén del AAV. Para este fin, la genomaniplación de esta forma condensada de tuberina se logró eliminando la porción central del ADNc de la tuberina humana. Esta cTuberina conserva la región de unión a hamartina en el extremo N y la región GAP en el extremo C de la tuberina humana, pero carece de un sitio de fosforilación por Akt Thr1462, de modo que la activación de Akt de mTORC1 disminuye o se elimina. La región central de la proteína se reemplaza por un enlazador de glicina-serina para conferir flexibilidad conformacional. A continuación, este ADNc de cTuberina se clonó en un vector AAV bajo un fuerte promotor ubicuo de beta actina de pollo. Se han transducido fibroblastos embrionarios de ratón con esta construcción de AAV-CBA-cTuberina y, como lo demuestra el análisis de transferencia de Western, esto reduce la actividad de la cinasa S6, que es un marcador de activación de mTORC1, estableciendo así la actividad biológica de cTuberina.

### I. cTuberina

La cTuberina, como se describe en el presente documento, en general, incluye una región de unión a hamartina, una región de proteína activadora de GTPasa (GAP) y un espaciador que une la región de unión a hamartina a la región GAP, y carece del sitio de fosforilación por Akt en Thr 1462 de la tuberina humana. De acuerdo con la invención, la cTuberina carece de los aminoácidos 451-1514 de SEQ ID NO: 10, que incluye el sitio de fosforilación por Akt en Thr 1462.

Una cTuberina ilustrativa útil para tratar el TSC tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En esta cTuberina (SEQ ID NO: 1), la secuencia de aminoácidos de la región de unión a hamartina es la SEQ ID NO: 2. También en esta cTuberina (SEQ ID NO: 1), la secuencia de aminoácidos de la región GAP es la SEQ ID NO: 3.

La región de unión a hamartina y la región GAP de esta cTuberina (SEQ ID NO: 1) están conectadas mediante una secuencia espaciadora de proteínas. En un ejemplo, la secuencia espaciadora incluye una secuencia enlazadora de glicina-serina (SGGG), por ejemplo, SEQ ID NO: 4. En este caso, un enlazador de 16 a.a. conecta la región de unión a hamartina y la región GAP. La proteína cTuberina relativa a la tuberina humana (SEQ ID NO: 10) carece del sitio de fosforilación por Akt Thr 1462 de la tuberina humana, que es uno de varios sitios de fosforilación implicados en la regulación de la actividad de la tuberina (Huang *et al.*, Biochem. J. 412(2):179-190 2008).

En otro ejemplo, la cTuberina tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia) con la SEQ ID NO: 1. De esta cTuberina, la región de unión a hamartina de cTuberina tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia) con la SEQ ID NO: 2, y la región GAP de cTuberina tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia) con la SEQ ID NO: 3. En algunas cTuberinas, la región de unión a hamartina y la región GAP de la cTuberina están conectadas mediante una secuencia espaciadora de proteína. En un ejemplo, la secuencia espaciadora incluye una secuencia enlazadora de glicina-serina (SGGG), por ejemplo, SEQ ID NO: 4.

La cTuberina de SEQ ID NO: 1 descrita en el presente documento se produjo usando tuberina humana, cuyas secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos se pueden encontrar en el N.º de registro de NCBI NP\_000539.2 y el N.º de registro de GenBank X75621.1, respectivamente. También pueden usarse otras isoformas de tuberina humana para producir cTuberinas adicionales. Las isoformas de tuberina humana ilustrativas útiles para producir dichas moléculas incluyen, pero sin limitación, la isoforma de tuberina 4 (N.º de registro de NCBI NP\_001070651.1), la isoforma de tuberina 5 (N.º de registro de NCBI NP\_001107854.1), la isoforma de tuberina 6 (N.º de registro de NCBI NP\_001305756.1), la isoforma de tuberina 7 (N.º de registro de NCBI NP\_001305758.1), la isoforma de tuberina 8 (N.º de registro de NCBI NP\_001305760.1), la isoforma de tuberina 9 (N.º de registro de NCBI NP\_001305761.1), la isoforma de tuberina X7 (N.º de registro de NCBI XP\_024306181.1), la isoforma de tuberina X8 (N.º de registro de NCBI XP\_005255586.2), la isoforma de tuberina X9 (N.º de registro de NCBI XP\_016879105.1), la isoforma de tuberina X10 (N.º de registro de NCBI XP\_005255588.2), la isoforma de tuberina X11 (N.º de registro de

NCBI XP\_016879106.1), la isoforma de tuberina X12 (N.º de registro de NCBI XP\_016879107.1), y otras. Dichas tuberinas son útiles para genomanipular cualquier cTuberina como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, se puede genomanipular una cTuberina usando la isoforma de tuberina humana 4 (N.º de acceso de NCBI NP\_001070651.1). Usando la isoforma de tuberina humana 4, la secuencia de aminoácidos de una región de unión a hamartina que tiene al menos un 90 % (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y la secuencia de aminoácidos de una región GAP que tiene al menos un 90 % (por ejemplo, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 se producen como se describe para la cTuberina (SEQ ID NO: 1). Adicionalmente, las regiones GAP y de unión a hamartina se pueden conectar mediante una secuencia espaciadora de proteínas. En un ejemplo, la secuencia espaciadora incluye una secuencia enlazadora de glicina-serina (SGGG), por ejemplo, SEQ ID NO: 4. Una cTuberina genomanipulada a partir de la isoforma de tuberina humana 4 carece además de un sitio de fosforilación por Akt.

## II. Moléculas de ácido nucleico de cTuberina

Adicionalmente, la cTuberina ilustrativa de SEQ ID NO: 1 está codificada por una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 5. En esta molécula de ácido nucleico de cTuberina (SEQ ID NO: 5), la región de unión a hamartina está codificada por la SEQ ID NO: 6. También en esta molécula de ácido nucleico de cTuberina (SEQ ID NO: 5), la región GAP está codificada por la SEQ ID NO: 7.

En esta cTuberina ilustrativa de SEQ ID NO: 1, codificada por la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5, la región de unión a hamartina y la región GAP están unidas por una secuencia espaciadora de proteínas, es decir, un enlazador de glicina-serina de SEQ ID NO: 4. El enlazador glicina-serina está codificado por la SEQ ID NO: 8.

En realizaciones adicionales, el ácido nucleico que codifica cTuberina tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia) con la SEQ ID NO: 5. De esta cTuberina, la región de unión a hamartina está codificada por un ácido nucleico que tiene al menos al menos un 80 % de identidad de secuencia (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia) con la SEQ ID NO: 6, y la región GAP está codificada por un ácido nucleico que tiene al menos al menos un 80 % de identidad de secuencia (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad de secuencia) con la SEQ ID NO: 7. Adicionalmente, el ácido nucleico que codifica cTuberina puede incluir una secuencia codificante espaciadora de proteínas, por ejemplo, SEQ ID NO: 8.

La molécula de ácido nucleico de cTuberina puede tener codones optimizados para su expresión en una célula humana. Adicionalmente, la molécula de ácido nucleico de cTuberina puede estar unida operativamente a una secuencia de control reguladora, tal como, por ejemplo, un potenciador génico inmediato/temprano de CMV/promotor de CBA y un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WRPE), o, sin limitación, un promotor de citomegalovirus (CMV) humano, un promotor de  $\beta$ -actina de pollo (CBA), un promotor/potenciador de LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), un promotor de SV40, un promotor de dihidrofolato reductasa, un promotor de fosfoglicerol cinasa, un potenciador génico inmediato/temprano de CMV/promotor de CBA, un promotor de sinapsina o un promotor de proteína ácida fibrilar glial (GFAP). La molécula de ácido nucleico también puede estar unida operativamente a un casete de expresión.

Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico de cTuberina (SEQ ID NO: 5) se puede insertar debajo de un promotor de CBA con una secuencia Kozak seguida de un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPPE) y una secuencia señal de poliadenilación de SV40 y hormonal de crecimiento bovino. El vector se inserta en una cadena principal AAV2-LTR y está flanqueado por secuencias AAV2 ITR.

Adicionalmente, la molécula de ácido nucleico de cTuberina (SEQ ID NO: 5) puede incorporarse en un genoma de plásmido vector. Un genoma de plásmido vector ilustrativo que incluye la molécula de ácido nucleico de cTuberina (SEQ ID NO: 5) tiene la secuencia de SEQ ID NO: 11.

## III. Moléculas de AAV recombinantes

Puede usarse cualquier vector de ácido nucleico adecuado junto con las presentes composiciones y métodos para diseñar y ensamblar los componentes de una molécula de ácido nucleico que codifica cTuberina y un virus adenoasociado (AAV) recombinante. Los vectores rAAV útiles en las composiciones y métodos descritos en el presente documento son construcciones de ácido nucleico recombinantes que incluyen (1) una secuencia heteróloga a expresar (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica cTuberina) y (2) secuencias víricas que facilitan la integración y expresión de los genes heterólogos. Las secuencias víricas pueden incluir aquellas secuencias de AAV que se requieren en cis para la replicación y el empaquetamiento (por ejemplo, ITR funcionales) del ADN en un virión. Tales vectores rAAV también pueden contener marcadores o genes indicadores. Los vectores rAAV útiles tienen uno o más de los genes WT de AAV eliminados total o parcialmente, pero conservan secuencias ITR flanqueantes funcionales. Las ITR de AAV pueden ser de cualquier serotipo adecuado para una aplicación particular. Se describen



métodos para usar vectores rAAV, por ejemplo, en Tal *et al.*, J. Biomed. Sci. 7:279-291 (2000), y Monahan *et al.*, Gene Therapy. 7:24-30 (2000).

- 5 En una realización, el vector es un AAV recombinante que porta la molécula de ácido nucleico de cTuberina y es impulsado por un promotor que expresa una molécula de cTuberina en células seleccionadas de un sujeto. Se conocen en la técnica métodos para ensamblar los vectores recombinantes. Véanse, por ejemplo, Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1989; Kay, M. A. *et al.*, Nat. Med. 7(1):33-40 (2001); y Walther W. y Stein U., Drugs 2000, 60(2):249-71.
- 10 En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, la molécula de ácido nucleico de cTuberina se suministra a las células seleccionadas, por ejemplo, una célula cerebral, cardíaca, renal, cutánea o pulmonar, que necesitan tratamiento mediante un vector AAV de acuerdo con métodos estándar conocidos en la técnica. Se encuentran disponibles más de 30 serotipos de origen natural de AAV. Existen muchas variantes naturales en la cápside de AAV, lo que permite la identificación y el uso de un AAV con propiedades específicamente adecuadas para
- 15 las células seleccionadas. Los virus AAV pueden genomanipularse mediante técnicas de biología molecular convencionales, lo que hace posible optimizar estas partículas para el suministro celular específico de las secuencias de la molécula de ácido nucleico de cTuberina, para minimizar la inmunogenicidad, para ajustar la estabilidad y la vida útil de las partículas, para una degradación eficiente, para un suministro intracelular preciso, por ejemplo, al núcleo.
- 20 La expresión de las moléculas de ácido nucleico de cTuberina descritas en el presente documento se puede lograr en las células seleccionadas mediante el suministro mediante AAV genomanipulados de forma recombinante o AAV artificiales que contienen secuencias que codifican la molécula de ácido nucleico de cTuberina deseada. El uso de AAV es un modo común de suministro exógeno de ADN, ya que es relativamente no tóxico, proporciona una transferencia génica eficiente y se puede optimizar fácilmente para fines específicos. Entre los serotipos ya
- 25 caracterizados de AAV aislados de primates humanos o no humanos, el serotipo 2 humano se ha usado ampliamente para experimentos eficientes de transferencia génica en diferentes tejidos diana y modelos animales. Otros serotipos de AAV incluyen, pero sin limitación, AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, o un serotipo híbrido de los mismos. A menos que se especifique de otro modo, las ITR de AAV y otros componentes de AAV seleccionados descritos en el presente documento, pueden seleccionarse fácilmente de cualquier serotipo de
- 30 AAV, incluyendo, sin limitación, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, un serotipo híbrido de los mismos, u otros serotipos de AAV conocidos y desconocidos. En una realización, las ITR son de AAV2. Estas ITR u otros componentes de AAV pueden aislarse fácilmente usando técnicas disponibles para los expertos en la técnica a partir de un serotipo de AAV. Dicho AAV puede aislarse u obtenerse de fuentes académicas, comerciales o públicas (por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA). Como
- 35 alternativa, las secuencias de AAV pueden obtenerse mediante medios sintéticos u otros medios adecuados haciendo referencia a secuencias publicadas tales como las que están disponibles en la bibliografía o en bases de datos tales como, por ejemplo, GenBank, PubMed o similares.
- 40 Los fragmentos de AAV deseables para ensamblar en vectores incluyen las proteínas de caperuza, incluyendo vp1, vp2, vp3 y regiones hipervariables, las proteínas rep, incluyendo rep 78, rep 68, rep 52 y rep 40, y las secuencias que codifican estas proteínas. Estos fragmentos pueden utilizarse fácilmente en diversos sistemas de vectores y células hospedadoras. Dichos fragmentos pueden usarse solos, junto con otras secuencias o fragmentos de serotipo de AAV, o junto con elementos de otras secuencias víricas de AAV o no AAV. Como se usan en el presente documento, los serotipos de AAV artificiales incluyen, sin limitación, AAV con una proteína de la cápside de origen no natural. Una
- 45 cápside artificial de este tipo puede generarse mediante cualquier técnica adecuada, usando una secuencia de AAV seleccionada (por ejemplo, un fragmento de una proteína de la cápside vp1) junto con secuencias heterólogas que pueden obtenerse un serotipo de AAV seleccionado diferente, porciones no contiguas de la mismo serotipo de AAV, de una fuente vírica no AAV, o de una fuente no vírica. Un serotipo de AAV artificial puede ser, sin limitación, un AAV pseudotipado, una cápside de AAV quimérica, una cápside de AAV recombinante o una cápside de AAV "humanizada".
- 50 Los vectores pseudotipados, en donde la cápside de un AAV se utiliza con las ITR de un AAV que tiene una proteína de la cápside diferente, son útiles en las composiciones y métodos descritos en el presente documento.
- En un ejemplo, el AAV incluye una secuencia de la cápside derivada de AAV1. En otra realización, el AAV incluye una secuencia de la cápside derivada de AAV9. El uso de AAV1 y AAV9 se ha descrito previamente en Broekman *et al.*, Neuroscience. 138:501-510, 2006.
- 55 En otro ejemplo, los vectores útiles en las composiciones y métodos descritos en el presente documento contienen secuencias que codifican una cápside del serotipo de AAV seleccionada, por ejemplo, una cápside de AAV1 o AAV9, o un fragmento de la misma. Otros vectores útiles contienen secuencias que codifican una proteína rep de serotipo de AAV seleccionada, por ejemplo, proteína rep de AAV1 o AAV9, o un fragmento de la misma. Opcionalmente, dichos vectores pueden contener proteínas cap y rep de AAV. En vectores en los que se proporcionan tanto rep como cap de AAV, las secuencias rep y cap de AAV pueden ser ambas de un origen de serotipo, por ejemplo, un origen de AAV1 o AAV9.
- 60 Como alternativa, pueden usarse vectores en los que las secuencias rep son de un serotipo de AAV que difiere del que proporcionan las secuencias cap. En una realización, las secuencias rep y cap se expresan a partir de fuentes
- 65

separadas (por ejemplo, vectores separados o una célula hospedadora y un vector). En otra realización, estas secuencias rep se fusionan en marco con secuencias cap de un serotipo de AAV diferente para formar un vector de AAV quimérico descrito en la Patente de EE.UU. N.º 7.282.199.

5 Se genera un AAV recombinante (rAAV) adecuado cultivando una célula hospedadora que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside del serotipo de AAV, o un fragmento de la misma, como se define en el presente documento; un gen rep funcional; un minigén compuesto, por ejemplo, por ITR de AAV y la secuencia de ácido nucleico de cTuberina; y suficientes funciones auxiliares para permitir el empaquetamiento del minigén en la proteína de la cápside de AAV. Los componentes requeridos para cultivarse en la célula hospedadora para empaquetar un minigén de AAV en una cápside de AAV pueden proporcionarse a la célula hospedadora en *trans*.  
10 Como alternativa, uno cualquiera o más de los componentes requeridos (por ejemplo, minigén, secuencias rep, secuencias cap y/o funciones auxiliares) pueden proporcionarse mediante una célula hospedadora estable que se ha genomanipulado para contener uno o más de los componentes requeridos usando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

15 En un ejemplo de trabajo, el AAV incluye un promotor (o un fragmento funcional de un promotor). La selección del promotor a emplear en el rAAV puede realizarse entre un amplio número de promotores constitutivos o inducibles que pueden expresar el transgén seleccionado en la célula diana deseada, que se conocen en la técnica. En una realización, el promotor es específico de célula. La expresión "específico de célula" significa que el promotor particular seleccionado para el vector recombinante puede dirigir la expresión del transgén seleccionado en un tipo de célula particular. En una realización, el promotor es específico para la expresión del transgén en una célula cerebral, una célula cardíaca, una célula renal, una célula cutánea o una célula pulmonar.

20 En otra realización, el promotor es el promotor nativo para el gen diana que se va a expresar. Los promotores útiles incluyen, sin limitación, promotor de citomegalovirus (CMV) humano, promotor de  $\beta$ -actina de pollo (CBA), promotor/potenciador de LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotor de SV40, promotor de dihidrofolato reductasa, promotor de fosfoglicerol cinasa, potenciador inmediato temprano (IE) de CMV/promotor de CBA, promotor de sinapsina y promotor de proteína ácida fibrilar glial (GFAP).

30 Se conocen en la técnica otras secuencias reguladoras convencionales contenidas en el minigén o rAAV. Un experto en la técnica puede hacer una selección entre estas y otras secuencias de control de expresión sin apartarse del alcance descrito en el presente documento

35 Un minigén de AAV puede incluir la molécula de ácido nucleico de cTuberina descrita en el presente documento y sus secuencias reguladoras, y las ITR de AAV 5' y 3'. En una realización, se usan las ITR del serotipo 2 de AAV. Sin embargo, pueden seleccionarse ITR de otros serotipos adecuados. En algunas realizaciones, el minigén se empaqueta en una proteína de la cápside y se suministra a una célula hospedadora seleccionada.

40 El minigén, secuencias rep, secuencias cap y funciones auxiliares necesarias para producir el rAAV pueden suministrarse a la célula hospedadora de empaquetamiento en forma de cualquier elemento genético que transfiera las secuencias transportadas en el mismo. El elemento genético seleccionado puede suministrarse mediante cualquier método adecuado, incluyendo los descritos en el presente documento. Los métodos usados para construir cualquier realización descrita en el presente documento son conocidos por los expertos en la manipulación de ácidos nucleicos e incluyen ingeniería genética, ingeniería recombinante y técnicas de síntesis. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*,  
45 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. De manera similar, se conocen bien métodos para generar viriones de rAAV y la selección de un método adecuado no es una limitación de la presente invención. Véase, por ejemplo, K. Fisher *et al.*, J. Virol., 1993 70: 520-532 y la Patente de EE.UU. 5.478.745.

50 En otro ejemplo de trabajo, se prepara un minigén de cTuberina en un plásmido provírico, tal como los divulgados en la Publicación de Patente Internacional N.º WO 2012/158757. Tal plásmido provírico contiene un genoma de AAV recombinante modular que comprende en asociación operativa: una secuencia de ITR de AAV2 5' de tipo natural flanqueada por sitios de restricción únicos que permiten la fácil eliminación o reemplazo de dicha ITR; un promotor que comprende una secuencia de citomegalovirus cadena arriba de una secuencia de beta actina de pollo de citomegalovirus (CMV), o un promotor/potenciador específico de célula, el promotor flanqueado por sitios de restricción  
55 únicos que permiten la fácil eliminación o reemplazo de toda la secuencia promotora, y la secuencia cadena arriba flanqueada por sitios de restricción únicos que permiten la fácil eliminación o reemplazo sólo del CMV cadena arriba o de la secuencia potenciadora, de la secuencia promotora. La molécula de ácido nucleico de cTuberina descrita en el presente documento se puede insertar en el sitio de un polienlazador de clonación múltiple, en donde la molécula de ácido nucleico de cTuberina está unida operativamente al promotor y bajo el control regulatorio de este. Una secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina flanqueada por sitios de restricción únicos que permiten la fácil eliminación o reemplazo de dicha secuencia de poli A; y una secuencia de ITR de AAV2 3' de tipo natural flanqueada por sitios de restricción únicos que permiten la fácil eliminación o reemplazo de la ITR 3'; también forman parte de este plásmido. La cadena principal del plásmido comprende los elementos necesarios para la replicación en células bacterianas y está a su vez flanqueada por secuencias terminadoras/aisladoras de la  
60 transcripción.  
65

En otro ejemplo de trabajo más, un plásmido provírico comprende un genoma de AAV recombinante modular que comprende en asociación operativa: (i) una secuencia de ITR de AAV2 5' de tipo natural flanqueada por sitios de restricción únicos que permiten la fácil eliminación o reemplazo de dicha ITR; (ii) un promotor que comprende (A) una secuencia potenciadora inmediata/temprana de CMV cadena arriba de una secuencia de beta actina de pollo de CMV; o (B) un promotor/potenciador específico de célula que incluye, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV) humano, un promotor de  $\beta$ -actina de pollo (CBA), un promotor/potenciador de LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), un promotor de SV40, un promotor de dihidrofolato reductasa, un promotor de fosfoglicerol cinasa, un potenciador génico inmediato/temprano de CMV/promotor de CBA, un promotor de sinapsina o un promotor de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), y otros. El promotor está flanqueado por sitios de restricción únicos que permiten la fácil eliminación o reemplazo de toda la secuencia promotora, y la secuencia cadena arriba está flanqueada por sitios de restricción únicos que permiten la fácil eliminación o reemplazo sólo del CMV cadena arriba o de la secuencia potenciadora, de la secuencia promotora. También forma parte de este plásmido provírico una secuencia de polienlazador de clonación múltiple que permite la inserción de una secuencia de ácido nucleico de cTuberina que incluye cualquiera de las descritas en el presente documento, en donde la molécula de ácido nucleico de cTuberina está unida operativamente al promotor y bajo el control regulatorio de este; una secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina flanqueada por sitios de restricción únicos que permiten la fácil eliminación o reemplazo de dicha secuencia de poli A; y una secuencia de ITR de AAV2 3' de tipo natural flanqueada por sitios de restricción únicos que permiten la fácil eliminación o reemplazo de la ITR 3'. El plásmido provírico también contiene una cadena principal del plásmido que comprende los elementos necesarios para la replicación en células bacterianas, y que comprende además un gen de resistencia a la kanamicina, y dicha cadena principal del plásmido está flanqueada por secuencias terminadoras/aisladoras de la transcripción. El plásmido provírico descrito en el presente documento también puede contener en la cadena principal del plásmido una secuencia de relleno de 5,1 kb del fago lambda no codificante para aumentar la longitud de la cadena principal y evitar el empaquetamiento inverso de genomas de AAV no funcionales.

En algunas realizaciones, un plásmido provírico contiene múltiples copias de una molécula de ácido nucleico de cTuberina. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico de cTuberina que son menos de la mitad del límite de empaquetamiento para AAV se pueden repetir una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces o más en un único plásmido provírico.

En otro aspecto más, el promotor del plásmido provírico se modifica para reducir el tamaño del promotor para permitir que se inserten secuencias de moléculas de ácido nucleico de cTuberina más grandes en el rAAV. En una realización, el promotor híbrido de CMV/CBA, que normalmente incluye un exón y un intrón no codificantes que suman aproximadamente 1.000 pares de bases, se reemplaza por un intrón quimérico de 130 pares de bases, como se conoce en la técnica.

A continuación, estos plásmidos províricos se emplean en metodologías de empaquetamiento actualmente convencionales para generar un virus recombinante que expresa el transgén de la molécula de cTuberina transportado por los plásmidos províricos. Un experto en la técnica selecciona fácilmente líneas celulares de producción adecuadas. Por ejemplo, una célula hospedadora adecuada puede seleccionarse de cualquier organismo biológico, incluyendo células procariotas (por ejemplo, bacterianas) y células eucariotas, incluyendo, células de insecto, células de levadura y células de mamífero. Brevemente, el plásmido provírico se transfecta en una célula de empaquetamiento seleccionada, donde puede existir de forma transitoria. Como alternativa, el minigén o casete de expresión génica con sus ITR flanqueantes se integra de forma estable en el genoma de la célula hospedadora, ya sea cromosómicamente o como un episoma. Se conocen técnicas de transfección adecuadas y pueden utilizarse fácilmente para suministrar el genoma de AAV recombinante a la célula hospedadora. Típicamente, los plásmidos províricos se cultivan en las células hospedadoras que expresan las proteínas cap y/o rep. En las células hospedadoras, el minigén que consiste en la molécula de ácido nucleico de cTuberina con ITR de AAV flanqueantes se rescata y se empaqueta en la proteína de la cápside o la proteína de la envoltura para formar una partícula vírica infecciosa. Por lo tanto, se produce una partícula infecciosa de AAV recombinante cultivando una célula de empaquetamiento que porta el plásmido provírico en presencia de secuencias virales suficientes para permitir el empaquetamiento del genoma vírico del casete de expresión génica en una envoltura o cápside infecciosa de AAV.

#### IV. Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (VE) son útiles en los métodos y composiciones descritos en el presente documento. Por ejemplo, las VE que incluyen cualquier cTuberina descrita en el presente documento se pueden administrar a un sujeto de acuerdo con métodos estándar. En un ejemplo adicional, también se pueden administrar a un sujeto VE que incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que codifique cTuberina.

Las vesículas extracelulares, incluyendo, pero sin limitación, exosomas, microvesículas, micropartículas, microvesículas circulantes, microvesículas desprendidas, nanovesículas, nanopartículas, cuerpos apoptóticos y vesículas de membrana, son fragmentos de membrana plasmática que varían de, por ejemplo, 20 nm a 10  $\mu$ m, desprendidos de casi todos los tipos de células. Las microvesículas desempeñan un papel en la comunicación

intercelular y pueden transportar ARNm, miARN y proteínas entre células. Como resultará evidente para los expertos en la técnica, existen diversos protocolos de aislamiento y purificación de VE basados en filtración, centrifugación diferencial, ultracentrifugación, flotación de vesículas en gradientes (sacarosa, OptiPrep™) y captura por inmunoadinidad utilizando anticuerpos contra proteínas de membrana. Puede encontrarse información ilustrativa para aislar vesículas extracelulares en Simpson R J, Mathivanan S (2012) Extracellular Microvesicles: The Need for Internationally Recognised Nomenclature and Stringent Purification Criteria. *J Proteomics Bioinform* 5: ii-ii; van der Pol *et al.*, Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles, *Pharmacol Rev.* Julio de 2012; 64(3):676-705; Raposo y Stoorvogel, Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends, *J Cell Biol.* 18 de febrero de 2013; 200(4):373-83; y Witwer *et al.*, Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research, *J Extracell Vesicles.* 27 de mayo de 2013; 2. Además, véanse Sarkar *et al.*, 2009, Taylor y Gercel-Taylor, 2008, y Balaj *et al.*, 2011.

Típicamente, las VE se cargan de acuerdo con procedimientos estándar con cualquiera de las cTuberinas descritas en el presente documento. Por ejemplo, la VE se puede cargar con la cTuberina de SEQ ID NO: 1.

De manera similar, las VE se cargan con cualquiera de las moléculas de ácido nucleico que codifican cTuberina descritas en el presente documento. La molécula de ácido nucleico puede incorporarse a un genoma de AAV. Adicionalmente, la molécula de ácido nucleico puede unirse operativamente a una secuencia de control reguladora que incluye, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV) humano, un promotor de  $\beta$ -actina de pollo (CBA), un promotor/potenciador de LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), un promotor de SV40, un promotor de dihidrofolato reductasa, un promotor de fosfoglicerol cinasa, un potenciador génico inmediato/temprano de CMV/promotor de CBA, un promotor de sinapsina o un promotor de proteína ácida fibrilar glial (GFAP). En un ejemplo, la secuencia de control reguladora incluye un potenciador génico inmediato/temprano de CMV/promotor de CBA y un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPPE). En un ejemplo adicional, la molécula de ácido nucleico puede incluir una ITR. En otro ejemplo, la molécula de ácido nucleico incluye una poli A.

Cualquier VE como se describe en el presente documento también puede incluirse en una composición con un portador farmacéuticamente aceptable.

## V. Composiciones farmacéuticas y kits

En el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen una molécula de ácido nucleico de cTuberina, VE que incluyen una molécula de ácido nucleico de cTuberina descrita en el presente documento (por ejemplo, un rAAV), o un rAAV que incluye una molécula de ácido nucleico de cTuberina como se describe en el presente documento. Dichas composiciones farmacéuticas incluyen cualquiera de las moléculas de ácido nucleico de cTuberina o cTuberinas descritas en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden evaluarse para determinar la contaminación mediante métodos convencionales y a continuación formularse en una composición farmacéutica destinada a una vía de administración adecuada. Aún otras composiciones que contienen una molécula de ácido nucleico de cTuberina, las VE que comprenden una molécula de ácido nucleico de cTuberina o un rAAV que comprende una molécula de ácido nucleico de cTuberina, pueden formularse de manera similar con un portador adecuado. Dicha formulación implica el uso de un vehículo o portador farmacéutica y/o fisiológicamente aceptable, particularmente dirigido para la administración a la célula diana. En una realización, los portadores adecuados para la administración a las células diana incluyen una solución salina tamponada, una solución isotónica de cloruro de sodio u otros tampones, por ejemplo, HEPES, para mantener el pH a niveles fisiológicos apropiados y, opcionalmente, otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, agentes estabilizantes, tampones, portadores, adyuvantes, diluyentes, etc.

Típicamente, el portador es un líquido para inyección. Los portadores fisiológicamente aceptables ilustrativos incluyen agua estéril apirógena y una solución salina tamponada con fosfato estéril apirógena. En una realización, el portador es una solución isotónica de cloruro de sodio. En otros ejemplos, el portador es una solución salina equilibrada. Otros portadores incluyen Tween. Si el virus se va a almacenar a largo plazo, se puede congelar en presencia de glicerol o Tween20.

Las composiciones que contienen moléculas de ácido nucleico de cTuberina descritas en el presente documento también pueden incluir un tensioactivo. Pueden incluirse tensioactivos útiles, tales como Pluronic F68 (Poloxámero 188, también conocido como LUTROL® F68), ya que evitan que el AAV se adhiera a superficies inertes y, por lo tanto, garantizan la administración de la dosis deseada. Como ejemplo, una composición ilustrativa diseñada para el tratamiento de enfermedades o trastornos causados por una mutación en TSC2, por ejemplo, complejo de esclerosis tuberosa, como se describe en el presente documento, comprende un vector adenoasociado recombinante que porta una secuencia de ácido nucleico que codifica cTuberina como se describe en el presente documento, bajo el control de secuencias reguladoras que expresan la molécula de ácido nucleico de cTuberina en una célula cerebral, una célula cardíaca, una célula renal, una célula cutánea o una célula pulmonar de un sujeto mamífero, y un portador farmacéuticamente aceptable. El vehículo es una solución isotónica de cloruro de sodio e incluye un tensioactivo Pluronic F68. En una realización, la molécula de ácido nucleico de cTuberina es cualquiera de las descritas en el

presente documento.

En otra realización ilustrativa más, la composición incluye un virus adenoasociado pseudotipado de AAV1 o AAV9 recombinante que lleva una molécula de ácido nucleico de cTuberina para reemplazo, la secuencia de ácido nucleico bajo el control del promotor que dirige la expresión de la molécula de ácido nucleico de cTuberina en células cerebrales, cardíacas, renales, cutáneas o pulmonares, en donde la composición se formula con un portador y componentes adicionales adecuados para administración dérmica o inyección intravascular, intracerebroventricular, intracraneal o intratecal. En otra realización más, la composición o los componentes para la producción o ensamblaje de esta composición, incluyendo los portadores, partículas de rAAV, tensioactivos y/o los componentes para generar el rAAV, así como el hardware de laboratorio adecuado para preparar la composición, pueden incorporarse en un kit.

Adicionalmente, en el presente documento se proporcionan kits que contienen una primera composición farmacéutica que incluye una molécula de ácido nucleico de cTuberina y una segunda composición farmacéutica que incluye fármacos usados para el tratamiento del complejo de esclerosis tuberosa incluyendo, por ejemplo, rapamicina y sus análogos. En algunas realizaciones, el kit incluye instrucciones para mezclar las dos composiciones farmacéuticas antes de la administración.

## VI. Métodos

Las composiciones descritas anteriormente son útiles en métodos para tratar enfermedades o trastornos causados por una mutación en *TSC2* reemplazando un alelo normal de *TSC2*. Dichos métodos implican poner en contacto un gen *TSC2* diana con una molécula de ácido nucleico de cTuberina como se describe en el presente documento, en condiciones en las que la molécula de ácido nucleico de cTuberina se suministra a una célula seleccionada para corregir la expresión de *TSC2* en la célula diana. Por lo tanto, los métodos y composiciones se usan para tratar las enfermedades o trastornos causados por una mutación en *TSC2* asociada con las mutaciones específicas y/o la expresión génica.

Una molécula de ácido nucleico de cTuberina, VE que incluyen una molécula de ácido nucleico de cTuberina o un rAAV que incluye una molécula de ácido nucleico de cTuberina se pueden administrar a una célula cerebral, una célula cardíaca, una célula renal, una célula cutánea o una célula pulmonar. Una molécula de ácido nucleico de cTuberina, VE que incluyen una molécula de ácido nucleico de cTuberina o un rAAV que incluye una molécula de ácido nucleico de cTuberina se pueden administrar al sujeto afectado por vía dérmica o mediante inyección intravascular, intracerebroventricular, intracraneal o intratecal.

Los métodos pueden incluir la administración de una molécula de ácido nucleico de cTuberina, VE que incluyen una molécula de ácido nucleico de cTuberina, o un rAAV que incluye una molécula de ácido nucleico de cTuberina para tratar a un sujeto que tiene un trastorno asociado con una mutación en *TSC2*, como el complejo de esclerosis tuberosa. Dicha selección se puede basar en el genotipo del sujeto. En algunas realizaciones, un trastorno asociado con *TSC2* puede ser un trastorno autosómico dominante. En algunos casos, el sujeto es homocigoto o heterocigoto compuesto para la mutación en *TSC2*. Se conocen en la técnica métodos para cribar e identificar mutaciones particulares en *TSC2*.

### *Terapias posológicas y combinadas*

En el presente documento se usan métodos estándar de dosificación. Adicionalmente, a continuación se describen la dosificación para el tratamiento de un angiomiolipoma renal, una linfangioleiomiomatosis (LAM) y una disfunción cerebral, así como la administración a una célula cerebral, una célula cardíaca, una célula renal, una célula cutánea o una célula pulmonar. También se describen métodos de dosificación para administración mediante inyección dérmica, intravascular, intracerebral, intraventricular o intratecal.

Una concentración eficaz de un virus adenoasociado recombinante que porta una molécula de ácido nucleico de cTuberina como se describe en el presente documento varía entre aproximadamente  $10^9$  y  $10^{15}$  copias del genoma (cg) por kg de peso corporal del sujeto (cg/kg). Por ejemplo, la concentración eficaz varía entre  $10^9$  y  $10^{15}$  cg/kg, por ejemplo,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$ ,  $10^{14}$ , y  $10^{15}$  cg/kg. En otro ejemplo, la concentración eficaz varía entre  $10^{10}$  y  $10^{13}$  cg/kg, por ejemplo,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$  y  $10^{13}$  cg/kg. El médico tratante puede seleccionar otras dosificaciones en estos intervalos o en otras unidades, teniendo en cuenta el estado físico del sujeto que se está tratando, incluida la edad del sujeto; la composición que se administra y el trastorno particular; la célula diana y el grado en que se ha desarrollado el trastorno, si es progresivo.

### *Angiomiolipoma renal*

Por ejemplo, se puede usar un rAAV que porta una molécula de ácido nucleico de cTuberina para tratar a un paciente con un angiomiolipoma renal. El rAAV se puede administrar al paciente de acuerdo con cualquier método, por ejemplo, mediante inyección intravascular, por ejemplo, en la arteria o vena renal. La dosificación eficaz del rAAV para el tratamiento del angiomiolipoma renal mediante inyección intravascular está entre  $10^9$  y  $10^{15}$  cg/kg. La cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^9$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV

administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{10}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{11}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{12}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{13}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{14}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{15}$  cg/kg.

#### LAM

- 10 También se puede usar un rAAV que porta una molécula de ácido nucleico de cTuberina para tratar a un paciente con linfangioleiomiomatosis (LAM). El rAAV se puede administrar al paciente de acuerdo con cualquier método, por ejemplo, mediante inyección intravascular. La dosificación eficaz de rAAV para el tratamiento de una LAM mediante inyección intravascular está entre  $10^9$  y  $10^{15}$  cg/kg. La cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^9$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{10}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{11}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{12}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{13}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{14}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{15}$  cg/kg. Adicionalmente, el rAAV se puede administrar a un paciente con LAM por vía nasal u otra vía médicamente aprobada hasta los pulmones.

#### Disfunción cerebral

- 25 En otro ejemplo, se puede usar un rAAV que porta una molécula de ácido nucleico de cTuberina en un paciente con una disfunción cerebral. El rAAV se puede administrar al paciente de acuerdo con cualquier método, por ejemplo, mediante inyección intravascular, intracerebroventricular, intracraneal o intratecal.

- 30 Para el tratamiento de una disfunción cerebral mediante inyección intravascular, la dosificación eficaz del rAAV es de entre  $10^9$  y  $10^{15}$  cg/kg. La cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^9$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{10}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente es de aproximadamente  $10^{11}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{12}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{13}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{14}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{15}$  cg/kg.

- 40 Adicionalmente, para el tratamiento de una disfunción cerebral mediante inyección intracerebroventricular, la dosificación eficaz del rAAV es de entre  $10^{10}$  y  $10^{13}$  cg/kg. La cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{10}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{11}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{12}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{13}$  cg/kg.

- 45 Adicionalmente, para el tratamiento de una disfunción cerebral mediante inyección intracraneal, la dosificación eficaz del rAAV es de entre  $10^{10}$  y  $10^{13}$  cg/kg. La cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{10}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{11}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{12}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{13}$  cg/kg.

- 50 Adicionalmente, para el tratamiento de una disfunción cerebral mediante inyección intratecal, la dosificación eficaz del rAAV es de entre  $10^{10}$  y  $10^{13}$  cg/kg. La cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{10}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{11}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{12}$  cg/kg. Adicionalmente, la cantidad de rAAV administrada al paciente puede ser de aproximadamente  $10^{13}$  cg/kg.

#### Suministro

- 60 La composición puede suministrarse en un volumen de aproximadamente 50  $\mu$ l a aproximadamente 1 ml, incluidos todos los números dentro del intervalo, dependiendo del tamaño del área a tratar, el valor vírico usado, la vía de administración y el efecto deseado del método. El volumen puede ser de aproximadamente 50  $\mu$ l. Como alternativa, el volumen puede ser de aproximadamente 70  $\mu$ l. En otra realización, el volumen es de aproximadamente 100  $\mu$ l. Como alternativa, el volumen puede ser de aproximadamente 125  $\mu$ l. En otra realización, el volumen es de aproximadamente 150  $\mu$ l. Como alternativa, el volumen puede ser de aproximadamente 175  $\mu$ l. Como alternativa, el volumen puede ser de aproximadamente 200  $\mu$ l. Como alternativa, el volumen puede ser de aproximadamente 250  $\mu$ l. Como alternativa, el volumen puede ser de aproximadamente 300  $\mu$ l. Como alternativa, el volumen puede ser de

aproximadamente 350 µl. Como alternativa, el volumen puede ser de aproximadamente 400 µl. En otra realización, el volumen puede ser de aproximadamente 450 µl. Como alternativa, el volumen puede ser de aproximadamente 500 µl. Como alternativa, el volumen puede ser de aproximadamente 600 µl. Como alternativa, el volumen puede ser de aproximadamente 750 µl. Como alternativa, el volumen puede ser de aproximadamente 850 µl. Como alternativa, el volumen puede ser de aproximadamente 1.000 µl.

El volumen y la concentración de la composición de rAAV se pueden seleccionar de modo que sólo se vean afectadas determinadas regiones anatómicas que tienen células diana. Como alternativa, el volumen y/o la concentración de la composición de rAAV es una cantidad mayor, para alcanzar porciones más grandes del órgano diana, por ejemplo, cerebro, corazón, riñón, piel o pulmón. De manera similar, las dosificaciones se ajustan para la administración a otros órganos.

En el presente documento se describen métodos para tratar el complejo de esclerosis tuberosa en un paciente. El presente documento describe un método para tratar un angiomiolipoma renal, una LAM o una disfunción cerebral en un sujeto. Para cada uno de los métodos descritos, el tratamiento puede usarse para prevenir la aparición de daños mayores o para rescatar tejido que tenga una enfermedad leve o avanzada. Como se usa en el presente documento, el término "rescate" significa prevenir la progresión de la enfermedad, prevenir la propagación del daño a células no lesionadas o mejorar el daño en células lesionadas.

Por lo tanto, la composición se puede administrar antes de la aparición de la enfermedad. Adicionalmente, la composición se puede administrar antes del desarrollo de los síntomas. Como alternativa, la composición se puede administrar después del desarrollo de los síntomas. Adicionalmente, la composición se puede administrar cuando menos del 90 % de las células diana están funcionando o permanecen, por ejemplo, en comparación con un tejido de referencia. Adicionalmente, la composición se puede administrar cuando más del 10 % de las células diana están funcionando o permanecen, por ejemplo, en comparación con un tejido de referencia. Adicionalmente, la composición se puede administrar cuando más del 20 % de las células diana están funcionando o permanecen. Adicionalmente, la composición se puede administrar cuando más del 30 % de las células diana están funcionando o permanecen.

Cualquiera de los métodos descritos anteriormente se puede realizar junto con otra terapia secundaria. La terapia puede ser cualquier terapia ahora conocida o aún desconocida que ayude a prevenir, detener o mejorar estas mutaciones o defectos o cualquiera de los efectos asociados con los mismos. La terapia secundaria se puede administrar antes, simultáneamente con o después de la administración de la molécula de ácido nucleico de cTuberina o rAAV que porta una molécula de ácido nucleico de cTuberina como se ha descrito anteriormente. Una terapia secundaria puede implicar el tratamiento de las convulsiones en el sujeto, incluyendo, por ejemplo, la administración de un fármaco anticonvulsivo. Adicionalmente, la terapia secundaria puede implicar la administración de rapamicina. Adicionalmente, la terapia secundaria puede implicar la administración conjunta con rapamicina. La administración o administración conjunta de rapamicina puede ser a un sujeto que tenga complejo de esclerosis tuberosa. Adicionalmente, la administración o administración conjunta de rapamicina puede ser a un sujeto que tenga un angiomiolipoma renal, una LAM o una disfunción cerebral. La administración o administración conjunta de rapamicina puede realizarse durante la primera infancia en el momento de las convulsiones infantiles. Adicionalmente, la administración o administración conjunta de rapamicina puede realizarse después de la detección de crecimientos excesivos subependimarios mediante, por ejemplo, RMN. Adicionalmente, la administración o administración conjunta de rapamicina puede realizarse en cualquier momento posterior de la vida debido a síntomas causados por crecimientos excesivos debido a la pérdida somática de la función de la tuberina.

Para su uso en estos métodos, el volumen y el valor vírico de cada inyección se determinan individualmente. Las dosificaciones, administraciones y regímenes pueden determinarse por el médico tratante dadas las enseñanzas de esta divulgación.

## Ejemplos

Lo siguiente son ejemplos de los métodos y composiciones que se describen en el presente documento. Se entiende que pueden ponerse en práctica diversas realizaciones diferentes, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

### Ejemplo 1. Cultivo celular

Se cultivaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) Tsc2-null (Huang *et al.*, Biochem. J. 412(2):179-190 2008) y células de angiomiolipoma humano TR102 inmortalizadas (Hong *et al.*, Mol. Cell. 30:701-711, 2008; Yu *et al.*, Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 286:L694-L700, 2004) en medios de crecimiento de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Cellgro®, Manassas, VA), complementados con suero bovino fetal (FBS) al 10 % (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO) y penicilina/estreptomicina al 1 % (Cellgro®) y las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 % y aire al 95 %. Los vectores de lentivirus se generaron usando CSCW-IG, un vector lentivírico autoinactivante, que tiene un promotor de CMV que controla la expresión de los ADNc tanto del transgén como de GFP separados por un elemento IRES (Sena-Esteves *et al.*, J. Virol. Methods. 122(2):131-139, 2004). El Fluc que codifica el ADNc (pGL3-básico; Promega®, Madison, WI) y la proteína fluorescente roja monomérica (mCherry)

(Rizzo *et al.*, 2004) se amplificaron por PCR. Las secuencias Fluc se insertaron directamente cadena abajo del promotor de CMV en el sitio Nhe I y las secuencias mCherry se insertaron en lugar del ADNc de GFP en los sitios Bsa I y Sal I, generando pCSCW-Fluc-IRES-mCherry. Los vectores de lentivirus se generaron como se describe con un valor típico de  $10^8$ - $10^{10}$  unidades de transducción (ut) por ml (Sena-Esteves *et al.*, J. Virol. Methods. 122(2):131-139, 2004). Para conferir una expresión estable de Fluc y mCherry a las células de linfangioleiomiomatosis (LAM), se infectaron con el lentivirus CSCW-Fluc-IRES-mCherry con una multiplicidad de infección (M.O.I, por sus siglas en inglés) de 100, lo que dio >90 % de infectabilidad (línea celular denominada TSC2-LAM-FC). Las células COS-7 se cultivaron en DMEM complementado con FBS al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 % y se transfectaron con un vector plasmídico que contenía ADNc para cTuberina (pAAV-CBA-cTuberina) usando Lipofectamine™ 3000 (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA).

## Ejemplo 2. Diseño y empaquetamiento de vectores AAV

El plásmido del vector AAV AAV-CBA-Cre-BGHpA se obtuvo como se describe en Prabhakar *et al.*, PLoS One. 8(5):e64224, 2013. Estos vectores AAV portan elementos ITR de AAV2 y la expresión génica está controlada por un promotor híbrido ( $\beta$ -actina de pollo (CBA)) compuesto por el potenciador del gen inmediato/temprano del CMV fusionado al promotor de beta-actina (Gray *et al.*, Hum. Gene Ther. 22:1143-1153 2011). El plásmido del vector AAV-CBA-cTuberina se obtuvo del plásmido pAAV-CBA-W (CSCW-IG) (Sena-Esteves *et al.*, J. Virol. Methods. 122(2):131-139, 2004). Este vector contiene el promotor de CBA que impulsa la cTuberina, seguido de un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) y secuencias de señal de poliadenilación (poli A) de SV40 y hormona de crecimiento bovino (BGH) (figura 2C). La construcción de tuberina condensada (cTuberina) contiene: ACC (secuencia de Kozak)::aminoácidos 1-450 de tuberina humana::enlazador gly/ser: aminoácidos 1515-1807 de tuberina humana::etiqueta cmc. La secuencia de ADNc de 2307 pb codifica una proteína de 85 kDa (figura 1A).

Se produjeron vectores de serotipo de AAV1 y AAV9 mediante cotransfección transitoria de células 293T mediante precipitación con fosfato de calcio de plásmidos de vector (AAV-CBA-cTuberina-cmyc), plásmido auxiliar adenovirico pFA6 y un plásmido que codifica genes de la cápside de AAV9 (pXR9) o AAV1 (pXR1), como se ha descrito previamente en Broekman *et al.*, Neuroscience. 138:501-510, 2006. La identidad de todas las secuencias amplificadas por PCR se confirmó mediante secuenciación. Brevemente, los vectores AAV se purificaron mediante centrifugación en gradiente de densidad de yodixanol. Las fracciones que contenían virus se concentraron usando dispositivos de centrífuga Amicon® Ultra 100 kDa MWCO (EMD Millipore®, Billerica, MA) y el valor (copias del genoma (cg)/ml) se determinó mediante amplificación por PCR en tiempo real con cebadores y sondas específicas para la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino.

## Ejemplo 3. Transferencias de Western

Brevemente, las células cultivadas se lisaron en tampón de lisis (HEPES 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, dodecilsulfato de sodio al 2,5 %, CHAPS al 2 %, sacarosa 2,5 mM, glicerol al 10 %, fluoruro de sodio 10 mM, vanadato de sodio 2 mM, PMSF 1 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, cóctel inhibidor de proteasa). Después de la sonicación e incubación a 8 °C durante 10 min, las muestras se centrifugaron a 14.000 g durante 30 min a 8 °C. Se hirvieron cantidades iguales de proteína, determinadas mediante un kit de ensayo de proteínas compatible con detergente (Bio-Rad®, Hercules, CA), durante 5 min en tampón de muestra Laemmli, se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad®). La carga equivalente de proteínas se confirmó mediante tinción con Ponceau S. Las membranas se bloquearon en reactivo de bloqueo al 2 % (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) durante 1 h a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpos primarios durante una noche a 4 °C. Como anticuerpos primarios se usaron anticuerpos anti tuberina/TSC2 (n.º 3612), anti fosfo-S6 (n.º 2211), anti-S6 (n.º 2212) (Cell Signaling Technology®) y anti gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (n.º 2275-PC) (Trevigen®, Gaithersburg, MD). Como anticuerpo secundario se usó anticuerpo IgG anti conejo o anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante. Se usó reactivo de quimioluminiscencia mejorado, Lumigen® ECL Ultra (TMA-6) (Lumigen®, Southfield, MI) para detectar el complejo antígeno-anticuerpo.

## Ejemplo 4. Animales e inyecciones intracerebroventriculares (ICV)

Los protocolos de investigación experimental fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) para el Hospital General de Massachusetts (MGH) siguiendo las directrices de los Institutos Nacionales de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Los experimentos se realizaron en ratones floxeados Tsc2<sup>cl</sup> (Onda *et al.*, J. Clin. Invest. 104(6):687-695, 1999). En respuesta a la recombinasa Cre, los alelos Tsc2<sup>cl</sup> se convierten en alelos nulos y el alelo *lacZ* expresa  $\beta$ -galactosidasa. Estos ratones tienen una esperanza de vida normal y saludable.

Para las inyecciones de vector, el día del nacimiento (día postnatal 0 (P0)) o en P3, los recién nacidos fueron crioadestesiados y se les inyectó 1  $\mu$ l o 2  $\mu$ l del vector viral AAV1-CBA-Cre en cada ventrículo lateral cerebral con una micropipeta de vidrio (70-100 mm de diámetro en la punta) usando un microinyector Narishige® IM300 a una velocidad de 2,4 psi/s (Narshige International, East Meadow, Nueva York). A continuación, los ratones se colocaron sobre una almohadilla térmica y se los devolvió a sus madres después de recuperar el color normal y la actividad completa típica



de los ratones recién nacidos.

#### **Ejemplo 5. Inyecciones retroorbitales (RO)**

5 A las 3 semanas de edad (P21), los ratones se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano (isoflurano al 3,5 % en una cámara de inducción, a continuación se mantuvieron anestesiados con isoflurano al 2-3 % y 1-2 litros/min de oxígeno durante la duración del experimento). Los vectores AAV se inyectaron por vía retroorbital en la vasculatura justo detrás de uno de los globos oculares en un volumen de 70 µl de solución (10 µl de AAV1- o AAV9-CBA-cTuberina + 60 µl de solución salina) o no se inyectaron usando una jeringa de 0,3 ml de insulina durante menos de 2 min  
10 (Yardeni *et al.*, Lab. Anim. (Nueva York). 40(5):155-160, 2011).

#### **Ejemplo 6. Modelo de linfangioleiomiomatosis (LAM) subcutánea**

15 Se suspendieron tres millones de células de angiomiolipoma inmortalizadas nulas en TSC2 humano que expresaban Fluc en 50 µl de medio de suero reducido (Opti-MEM®, Gibco®), mezcladas con 50 µl de Matrigel® (BD Matrigel™ Matrix HC) (BD Biosciences, Bedford, MA) y se implantaron por vía subcutánea en la espalda de ratones NOD-SCID Il2R gamma (NSG™). Después de 4 semanas, a los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal el sustrato Fluc D-luciferina (LUCNA-1G) (Gold Biotechnology®, St. Louis, MO), y se adquirió una señal 5 min después con un espectro IVIS® de alta eficiencia (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) con un sistema de anestesia con gas XGI-8 (Caliper Life Sciences).  
20

#### **Ejemplo 7. Histología e inmunohistoquímica (IHC)**

25 La histología estándar de cerebros de ratón se realizó como se describe en Prabhakar *et al.*, PLoS One. 8(5):e64224, 2013. Se tiñeron secciones de cinco µm con hematoxilina y eosina (H&E) o se usaron para IHC, como se describe (*ibid.*) usando anticuerpos para pS6 (n.º 2211, Cell Signaling), con anticuerpos secundarios, como se describe (*ibid.*).

#### **Ejemplo 8. Análisis estadístico**

30 Todos los análisis de las curvas de supervivencia (prueba de chi-cuadrado) se realizaron usando el software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Los valores de P representados son estadísticamente significativos.

#### **Ejemplo 9. Expresión de cTuberina en células COS-7 transfectadas con el plásmido del vector AAV-CBA-cTuberina**

35 Se transfectaron células COS-7 de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1 con el plásmido del vector AAV-CBA-cTuberina del Ejemplo 2. Después de 24 horas, se detectó la expresión de cTuberina mediante transferencia de Western como se ha descrito en los ejemplos anteriores con anticuerpo anti tuberina/TSC2. La expresión de cTuberina fue evidente al peso molecular (PM) esperado de 85 kDa, como se muestra en la figura 3A.

#### **Ejemplo 10. Actividad de pS6 cinasa en células COS-7 transfectadas con diversas construcciones de AAV**

45 Para ensayar la actividad de cTuberina, se transfectaron células COS-7 con GFP, vectores pAAV-CBA-cTSC2, TSC2-FLAG, pAAV-CBA-cTSC2 + TSC1-FLAG, TSC1-FLAG + TSC2-FLAG y TSC1-FLAG. Los niveles de expresión de S6 (pS6), S6 y GAPDH fosforilados se detectaron mediante transferencia de Western. Si bien los niveles de pS6 cinasa normalmente están elevados en ausencia de actividad de tuberina, las células transfectadas con el plásmido AAV-CBA-cTuberina mostraron niveles de pS6 más bajos, lo que indica una disminución de la actividad de pS6 cinasa. Esto se muestra en la figura 3B, donde los niveles de pS6 están elevados en las columnas 1 (GFP (control)) y 7 (control, sin plásmido) en comparación con las otras células.  
50

#### **Ejemplo 11. Supervivencia de ratones inyectados P0 con el vector AAV1-CBA-Cre, ratones inyectados en P21 con el vector AAV9-CBA-cTuberina y ratones no inyectados**

55 La eficacia del vector AAV-CBA-cTuberina se ensayó en ratones *Tsc2<sup>co/c</sup>*. Las inyecciones intracereboventriculares (ICV) y retroorbitarias (RO) se realizaron como se ha descrito en los ejemplos anteriores. Los vectores AAV1-CBA-Cre y AAV9-CBA-cTuberina se prepararon como se ha descrito anteriormente. A los ratones se les inyectó ICV en P0 AAV1-CBA-Cre (N = 16), se les inyectó RO en P21 AAV9-CBA-cTuberina (N = 7) o no se les inyectó (N = 6). Los valores de las inyecciones de AAV1-CBA-Cre y AAV9-CBA-cTuberina fueron  $9,1 \times 10^{12}$  c.g./ml y  $4,5 \times 10^{12}$  c.g./ml, respectivamente. La supervivencia media fue de 35 días para los ratones AAV1-CBA-Cre, >175 días para los ratones no inyectados y >185 días para los ratones AAV9-CBA-cTuberina. La diferencia entre dos grupos fue de  $P < 0,0001$  (rango logarítmico) o  $P < 0,0001$  (Gehan-Breslow-Wilcoxon), ambos estadísticamente significativos. Las curvas de supervivencia se representan en la figura 4A.  
60

#### **Ejemplo 12. Supervivencia e histología de ratones inyectados en P0 con el vector AAV1-CBA-Cre + P21 con el vector AAV1-CBA-cTuberina**

65

Se ensayó la eficacia de la terapia génica con el vector AAV1-CBA-cTuberina en ratones que carecían de tuberina. El vector AAV1-CBA-cTuberina se preparó como se ha descrito en los ejemplos anteriores. A todos los ratones se les inyectó ICV en P0 AAV1-CBA-Cre. En P21, a un grupo de ratones se le inyectó RO AAV1-CBA-cTuberina (N = 7), mientras que a un segundo grupo no se le inyectó (N = 10). Los valores de las inyecciones de AAV1-CBA-Cre y AAV1-CBA-cTuberina fueron  $5,1 \times 10^{13}$  c.g./ml y  $3 \times 10^{11}$  c.g./ml, respectivamente. La supervivencia media de los ratones no inyectados fue de 26,5 días, mientras que los ratones a los que se les inyectó AAV1-CBA-cTuberina sobrevivieron una mediana de 35 días. La diferencia entre los dos grupos fue  $P = 0,0001$  (rango logarítmico) o  $P = 0,0004$  (Gehan-Breslow-Wilcoxon), ambos estadísticamente significativos. Las curvas de supervivencia se representan en la figura 4B.

Adicionalmente, los cerebros de los ratones carentes de tuberina y los ratones tratados con AAV-CBA-cTuberina se estudiaron usando tinción H&E o IHC para determinar la pS6 realizada como se describe en el Ejemplo 7. A los ratones Tsc2<sup>co</sup> se les inyectó en P0 AAV1-CBA-Cre y en P21 AAV1-CBA-cTuberina de acuerdo con el mismo diseño del experimento anterior, a continuación se sacrificaron en P27. Los resultados se muestran en las figuras 5A-5F. La figura 5A muestra la tinción en un cerebro normal no inyectado (control). Las figuras 5B-5E muestran la tinción en un ratón inyectado solo con AAV1-CBA-Cre en P0, que muestra la proliferación de células endimarias (figura 5B), células piramidales agrandadas en el hipocampo (figura 5C), un nódulo subependimario (figura 5D), y múltiples nódulos subependimarios y proliferación (figura 5E). Finalmente, en el ratón tratado con AAV1-CBA-cTuberina en P21, la figura 5F muestra un nódulo muy pequeño, inflamación y edema en la región subependimaria.

#### **Ejemplo 13. Supervivencia de ratones inyectados en P3 con el vector AAV1-CBA-Cre + P21 con los vectores AAV1- o AAV9-CBA-cTuberina**

La eficacia de la terapia génica con el vector AAV1-CBA-cTuberina o el vector AAV9-CBA-cTuberina se ensayó adicionalmente en los dos experimentos siguientes. A los ratones se les inyectó inicialmente en P3 en lugar de P0 AAV1-CBA-Cre cuando la barrera del líquido cefalorraquídeo (LCR) es algo menos penetrable que en P0, lo que debería causar una menor pérdida de tuberina en el cerebro.

##### *AAV1-CBA-cTuberina*

A todos los ratones Tsc2<sup>co</sup> se les inyectó ICV en P3 AAV1-CBA-Cre. En P21, a un grupo de ratones se le inyectó RO AAV1-CBA-cTuberina (N = 9), mientras que a un segundo grupo no se le inyectó (N = 7). Los valores de las inyecciones de AAV1-CBA-Cre y AAV1-CBA-cTuberina fueron  $5,1 \times 10^{13}$  c.g./ml y  $3 \times 10^{11}$  c.g./ml, respectivamente. La supervivencia media de los ratones no inyectados fue de 36 días, mientras que los ratones a los que se les inyectó AAV1-CBA-cTuberina sobrevivieron una mediana de 54 días. La diferencia entre los dos grupos fue de  $P < 0,0001$  (rango logarítmico) o  $P = 0,0004$  (Gehan-Breslow-Wilcoxon), ambos estadísticamente significativos. Las curvas de supervivencia se representan en la figura 4C.

##### *AAV9-CBA-cTuberina*

A todos los ratones Tsc2<sup>co</sup> se les inyectó ICV en P3 AAV1-CBA-Cre. En P21, a un grupo de ratones se le inyectó RO AAV9-CBA-cTuberina (N = 11), mientras que a un segundo grupo no se le inyectó (N = 9). Los valores de las inyecciones de AAV1-CBA-Cre y AAV9-CBA-cTuberina fueron  $5,1 \times 10^{13}$  c.g./ml y  $4,5 \times 10^{12}$  c.g./ml, respectivamente. La supervivencia media de los ratones no inyectados fue de 32 días, mientras que los ratones a los que se les inyectó AAV9-CBA-cTuberina sobrevivieron una mediana de 45 días. La diferencia entre los dos grupos fue de  $P < 0,0006$  (rango logarítmico) o  $P = 0,0014$  (Gehan-Breslow-Wilcoxon), ambos estadísticamente significativos. Las curvas de supervivencia se representan en la figura 4D.

#### **Ejemplo 14. Supervivencia de los ratones inyectados con vector AAV9-CBA-cTuberina y vigabatrina**

Es posible que el vector terapéutico también disminuya las convulsiones. En caso contrario, las convulsiones pueden ser la causa de una muerte prematura, es decir, muerte previa a la hidrocefalia producida por los nódulos subependimarios (SEN, por sus siglas en inglés). La eficacia de AAV9-CBA-cTuberina se ensayó adicionalmente junto con vigabatrina, que es eficaz para bloquear las convulsiones en ratones floxeados para Tsc1/GFAP-Cre (Zhang *et al.*, PLoS One. 8(2):e57445, 2013).

A todos los ratones se les inyectó ICV en P0 AAV1-CBA-Cre. A un grupo de ratones se le inyectó RO en P3 AAV9-CBA-cTuberina, mientras que un segundo grupo no fue inyectado. De los ratones inyectados, un grupo se trató con vigabatrina (50 mg/kg) (N = 7), mientras que un segundo grupo no recibió tratamiento (N = 10). De los ratones no inyectados, un grupo se trató con vigabatrina (200 mg/kg) (N = 7), mientras que un segundo grupo no recibió tratamiento (N = 8). Los valores de AAV1-CBA-Cre y AAV9-CBA-cTuberina fueron  $5,1 \times 10^{13}$  c.g./ml y  $4,5 \times 10^{12}$  c.g./ml, respectivamente. La dosis de vigabatrina suministrada fue de 50 mg/kg para los ratones inyectados con AAV9-CBA-cTuberina y de 200 mg/kg para los ratones no inyectados. La supervivencia media fue de 23 días para los ratones que no recibieron fármaco no inyectados; 27 días para los ratones tratados con vigabatrina no inyectados; 35,5 días para los ratones que no recibieron fármaco e inyectados; y 40 días para los ratones tratados con vigabatrina e inyectados. La diferencia entre los dos grupos inyectados con AAV9-CBA-cTuberina fue de  $P < 0,0001$  (rango logarítmico) o  $P$

<0,0001 (Gehan-Breslow-Wilcoxon), ambos estadísticamente significativos.

**Ejemplo 15. Eficacia de AAV9-CBA-cTuberina en tumores de LAM *in vivo***

- 5 La eficacia de AAV9-CBA-cTuberina también se ensayó *in vivo* en tumores de linfangioleiomiomatosis (LAM) inyectados por vía subcutánea en ratones NSG inmunocomprometidos, que se prepararon como se describe en el Ejemplo 4. Los tumores de LAM que expresan Fluc se muestran en la figura 6A. El volumen del tumor se controló mediante bioluminiscencia en las semanas 1, 4, 6, 9 y 14. En las semanas 4 y 9, a los tumores se les inyectó el vector AAV9-CBA-cTuberina (N = 7) o no se inyectaron (N = 5). El valor del vector AAV9-CBA-cTuberina fue de  $4,3 \times 10^{10}$  c.g/ml. En la Semana 14, los tumores inyectados con el vector cTuberina habían dejado de aumentar de tamaño, mientras que los tumores no inyectados continuaron expandiéndose en volumen, como se representa en la figura 6B.
- 10

## REIVINDICACIONES

1. Un virus adenoasociado recombinante (rAAV), comprendiendo dicho rAAV una cápside de AAV y un genoma de AAV empaquetado en el mismo, comprendiendo dicho genoma de AAV una molécula de ácido nucleico capaz de expresar una cTuberina que comprende (i) una región de unión a hamartina que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, y (ii) una región de proteína activadora de GTPasa (GAP) que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, en donde la cTuberina carece de los aminoácidos 451-1514 de SEQ ID NO:10, que incluye un sitio de fosforilación por Akt en Thr 1462.
2. El rAAV de la reivindicación 1, en donde dicha cápside de AAV es una cápside de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 o AAV12, o una variante de una cualquiera de las cápsides de AAV.
3. El rAAV de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha molécula de ácido nucleico está unida operativamente a una secuencia de control reguladora, que es opcionalmente un promotor del citomegalovirus humano (CMV), un promotor de  $\beta$ -actina de pollo (CBA), un promotor/potenciador de LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), un promotor de SV40, un promotor de dihidrofolato reductasa, un promotor de fosfoglicerol cinasa, un potenciador génico inmediato/temprano de CMV/promotor de CBA, un promotor de sinapsina o un promotor de proteína ácida fibrilar glial (GFAP).
4. El rAAV de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de ácido nucleico es la SEQ ID NO: 5.
5. Una composición que comprende el rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un portador farmacéuticamente aceptable.
6. El rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en un método para tratar a un paciente que tiene complejo de esclerosis tuberosa (TSC).
7. El rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el uso de la reivindicación 6, en donde dicho paciente tiene un angiomiolipoma renal o una linfangioleiomiomatosis (LAM).
8. El rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el uso de la reivindicación 7, en donde dicha cTuberina se administra por vía intravascular, opcionalmente en una arteria o vena renal.
9. El rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el uso de la reivindicación 7, en donde dicha cTuberina se administra en los pulmones.
10. El rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el uso de la reivindicación 6, en donde dicho paciente tiene una disfunción cerebral.
11. El rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el uso de la reivindicación 10, en donde dicha cTuberina se administra por vía intracerebral o intratecal.
12. El rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el uso de la reivindicación 6, en donde dicha cTuberina se administra a un angiomiolipoma renal, una LAM o el cerebro.
13. El rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el uso de la reivindicación 6, en donde dicho rAAV se administra a una célula cerebral, una célula cardíaca, una célula renal, una célula cutánea o una célula pulmonar.
14. El rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el uso de la reivindicación 6, en donde dicho rAAV se administra por vía intravascular, intravenosa, intracerebral, intraventricular, intratecal o dérmica.
15. El rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el uso de la reivindicación 6, en donde a dicho paciente se le administra además rapamicina.

FIG. 1A

MAKPTSKDGLKEFKIILLGLGTPRPNPRAEGKQTEFIITAEILRELSMECGLN  
 NRIRMIGQICEVAKTKKFEHAEALWKAVADLLQPERPLEARHAVLALLKAIVQGQGER  
 LGVLRALFFKVIKDYPSTNEDLHERLEVFKAITDNGRHITYLEEEELADFVLQWMDVGLSSE  
 FLVLVNLVKFNSCYLDEYIARMVQMICLLCVRTASSVDIEVSLQVLDAVVCYNCLPAES  
 LPLEFIVTLCRTINVKELCEPCWKLMRNLLGTHLGHSAIYNMCHLMEDRAYMEDAPLLRGA  
 VFEVGMALWGAHRLYSLRNSPTSVLPSEFYQAMACPNVSVYEIVLSITRLIKKYRKELQV  
 VAWDILLNIIERLLQQLQTLDSPELRTIVHDLLTTVEELCDQNEFHGSGQERYFELVERCA  
 DQRPESSLLNLISYRAQSIHPAKDGIQNLQALMESGGSGGGSGGGKPIILLPNES  
 QSEFERSVQLLDQIPSYDTHKIAVLYVGEQGSNSELAILSNEHGSYRYTEFLTGLGRLLIEL  
 KDCQPDKVYLGGLDVCGEDGQFTYCWHDDIMQAVFHIAITLPTKDVDKHRCDKKRHLGND  
 FVSI VYNDSGEDFKLGTIKGQENFVHVIVTPLDYEENLVSLQCRKDMEGLVDTSVAKIVS  
 DRNLPFVARQMALHANMASQVHHSRSNPTDIYPSKWIARLRIKRLRQRICEEAAYSNPS  
 LPLVHPPSHKAQAQTPAETPGYEVGQQRRLISSVEDFTEFV (SEQ ID NO: 1)

FIG. 1B

GCTAGCACTAGTaccatggcgaaacgcgaccagcaaaagatagcggcctgaaagaaaaatttataaattctgtctgggcctgggcaacccccgggc  
 ccgaacccgcgcagcgcggaaggcaaacagacccgaatttattattaccgcggaaattctgcgcgaaattctgcgcgaaactgagcatggaatgcggcctgaac  
 aaccgcattcgcgatgattggccagatttgcgaaagtggcgaaacccaaaaatttgaagaaacatgcggtggaagcgtgtggaagcgggtg  
 gcgcatctgtgcagccggaacgcgcgcctggaagcgcgcctggaagcgtgcgcctgctgaaagcgtattgtgcagggccagggcggaacgc  
 ctggcgctgtgcgcgcgtgtgttttttaaagtattaaagattatccgagcaacgaagatctgcatgaacgcctggaagtgttttaaagcg  
 ctgaaccgataaacggccgcataattaccctatctggaaagaagaaactggcggattttgtgctgcagtggatggatgtgggcctgagcagcgaa  
 tttctgctggctgtggtgaacctggtgaaatttaacagctgctatctggtgatgaatatattgcgcgcctggtgcagatgatttgccctgctg  
 tgcgtgcgaaccgcgagcagcgtggatattgaagtgcgcctgcaggtgctggatgcggtggtgtgtctataactgcctgcgcggcggaagc  
 ctgcgcctgtttattgtgacctgtgcgcgcacattaaactgaaagaactgtgcgaacccgtgctggaaactgatgcgcacacctgctgggc  
 acccatctggccatagcgcgatttataacatgtgccatctgatggaaagatgcgcgtatatggaaagatgcgcgcctgctgctgcgcgcgcg  
 gtgtttttttgtggcatggcgctgtggggcgccatgcctgtatagcctgcgaacagccgcagcgtgtgtgcgcgacttttttatcag  
 gcgatggcgtgcccgaacgaagtggcgagctatgaaattgtgctgagcattaccgcgcctgattaaaaaatatcgcaaaagaactgcaggtg  
 gtggcgtgggatattctgtgaaacattattgaacgcctgtgcagcagctgcagacccctggatagcccggaactgcgcacacattgtgcacat  
 gatctgtgaccacccgtggaagaactgtgcgatcagaacgaatttcatggcagccaggaacgctattttgaaactggtggaacgctgcgcg  
 gatcagcgcgcggaaagcagcctgtgaacctgattagctatcgcgcgcagagcattcatccggcggaagatggtggtattcaggaacctg  
 caggcgtgatggaaTCTGGTGGGGTAGCGGAGGAGGGTCAGGGGGCGGCAGTGGAGCGGAAAAacccgattctgctgcccgaacgaaagc  
 cagagccttgaacgcagcgtgcagctgctggatccgagctatgatccccataaaattgcggtgctgtatgtggcggaagccag  
 agcaacagcgaactggcattctgagcaacgaacatggcagctatgcctataccgaatttctgacccggcctgggcgcctgattgaaactg  
 aaagattgccagccggataaaagtgtatctgggcggcctggatgtgtgcgcggaagatggccagtttaacctattgctggcatgatgatatt  
 atgcagggcgtgtttcatatttgcgaacctgatgcgaccaaagatgtggataaaacatgcctgcgataaaaaacgccatctgggcaacgat  
 tttgtgagcattgtgtataacgatagcggcggaagattttaaactgggcacccattaaaggccagtttaacctttgtgcattgtgattgtgacc  
 ccgctggattatgaatgcaacctggtgagcctgcagtcgcgcaagatatggaaaggcctggtggatataccagcgtggcgaaaaattgtgagc  
 gatcgeaacctgccgtttgtggcgccagatggcgtgcattgcgaacatggcgagccaggtgcattcatagccgcagcaaacccgacccgat  
 atttatccgagcaaatggattgcgcgcctgcgcctattaaacgcctgcgcagcgcatttgcgaagaagcggcgtatagcaaccccgagc  
 ctgcgcctggtgcattccgcgagccatagcaaaagccggcgagaccccggaaccccggtctatgaagtgggcccagcgcgaaa  
 cgctgattagcagcgtggaagattttaccgaatttgtGTAGGGGGGGCCCTCGAG (SEQ ID NO: 5)

FIG. 2A

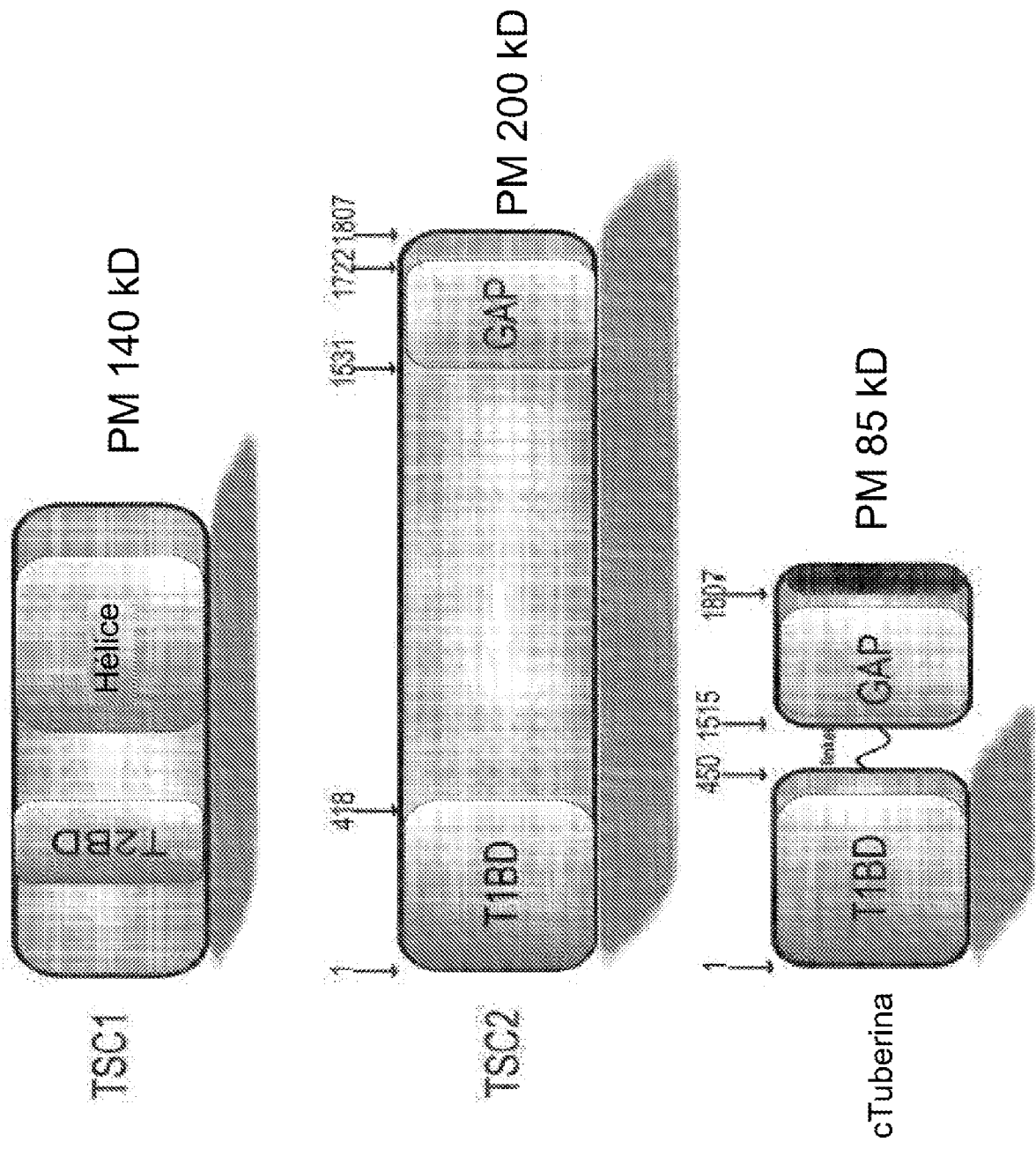


FIG. 2B

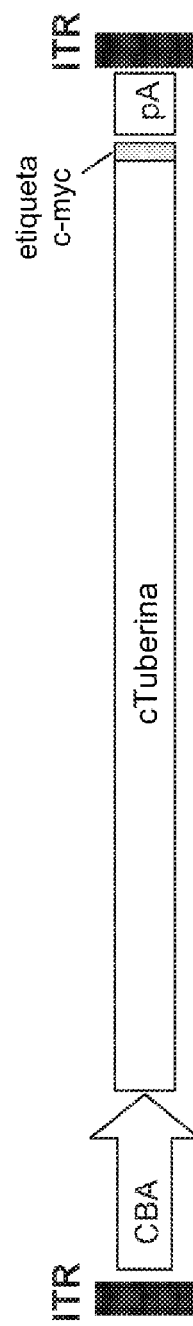




FIG. 2C

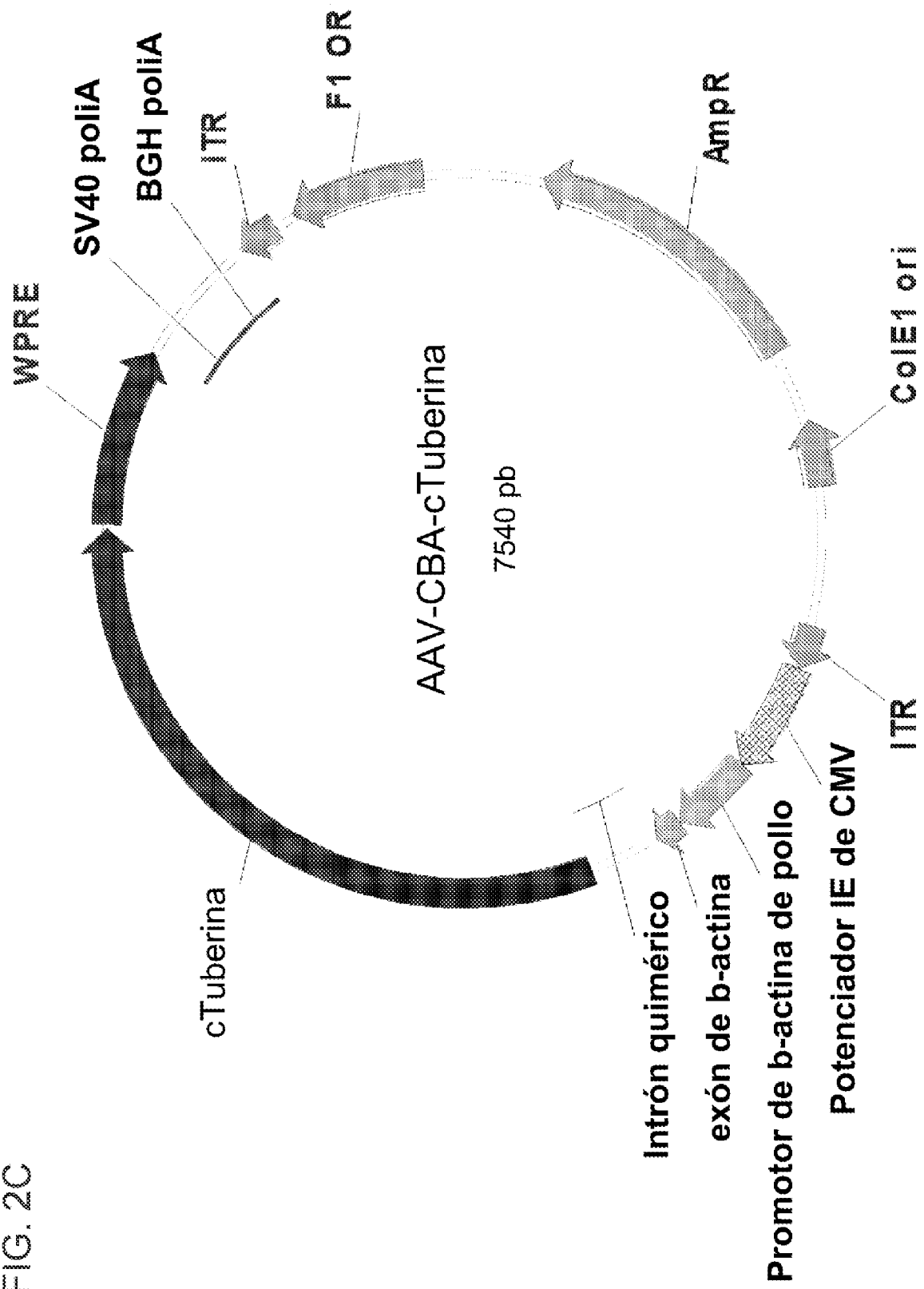


FIG. 3A

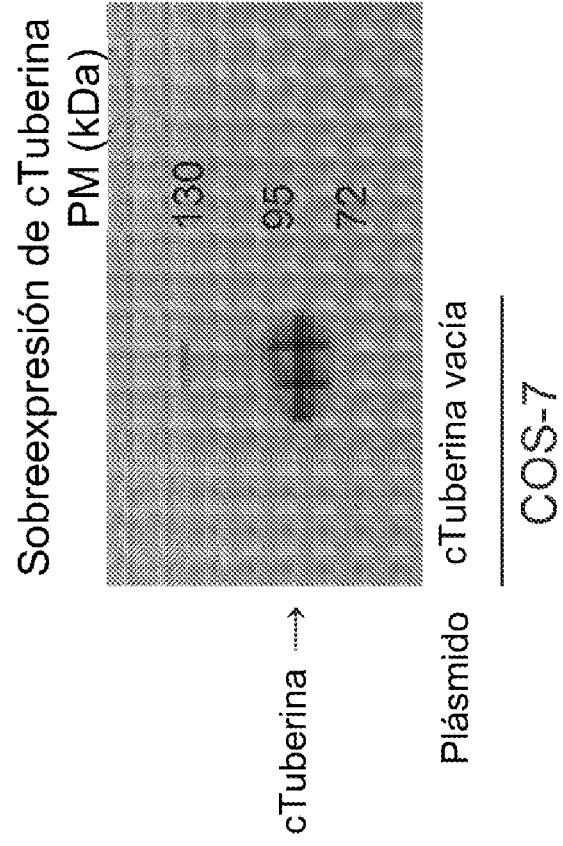


FIG. 3B

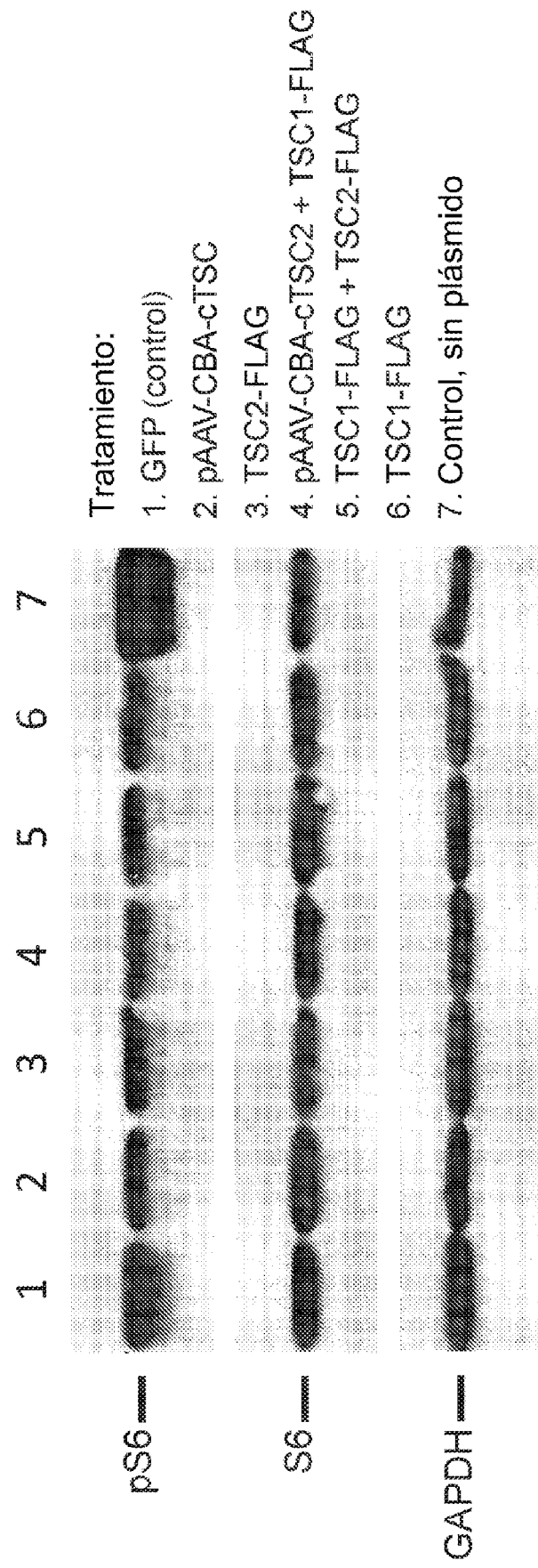


FIG. 4A

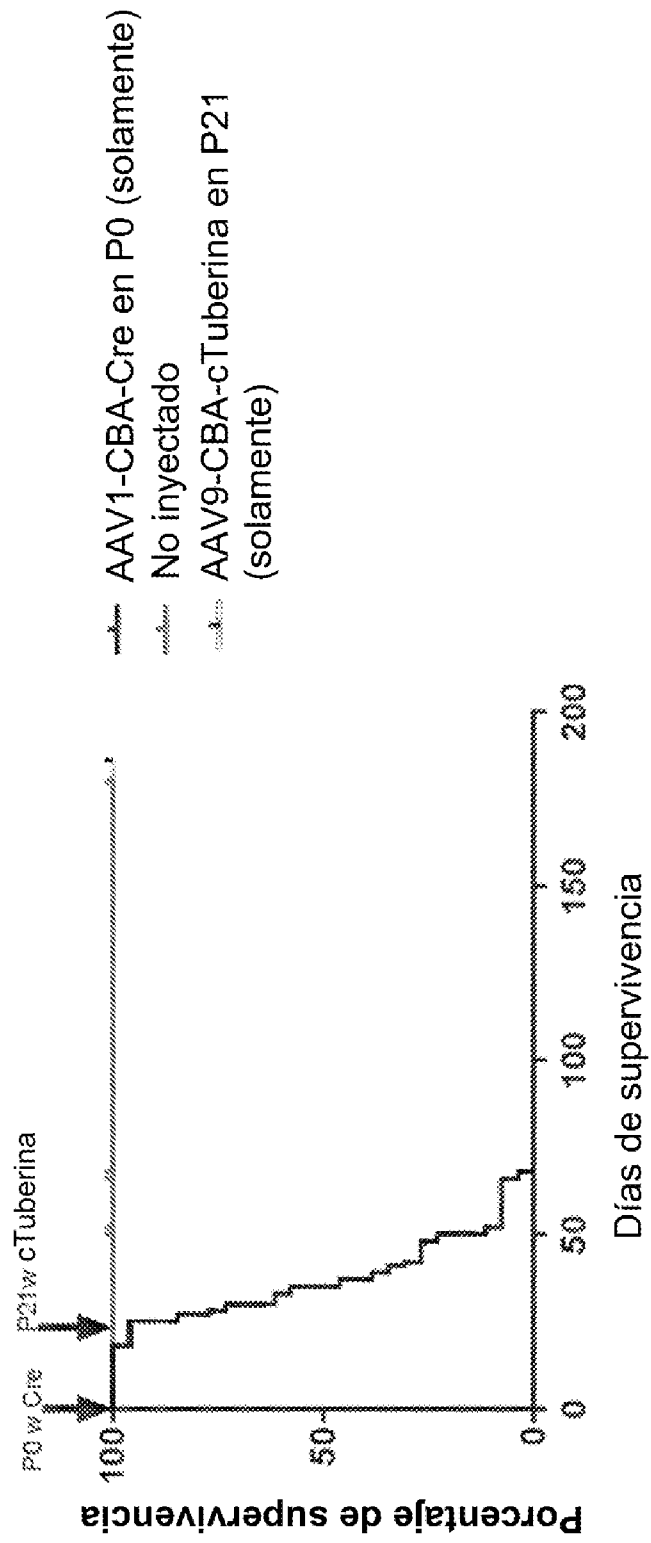


FIG. 4B

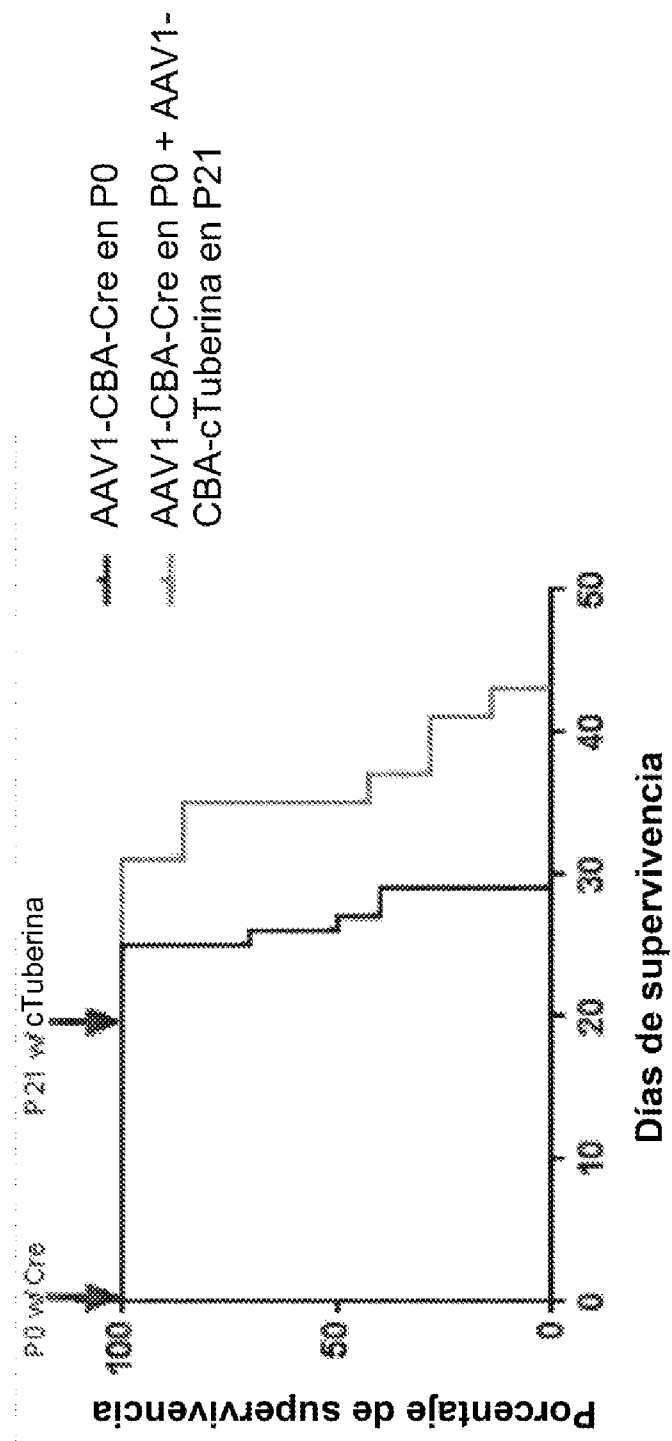


FIG. 4C

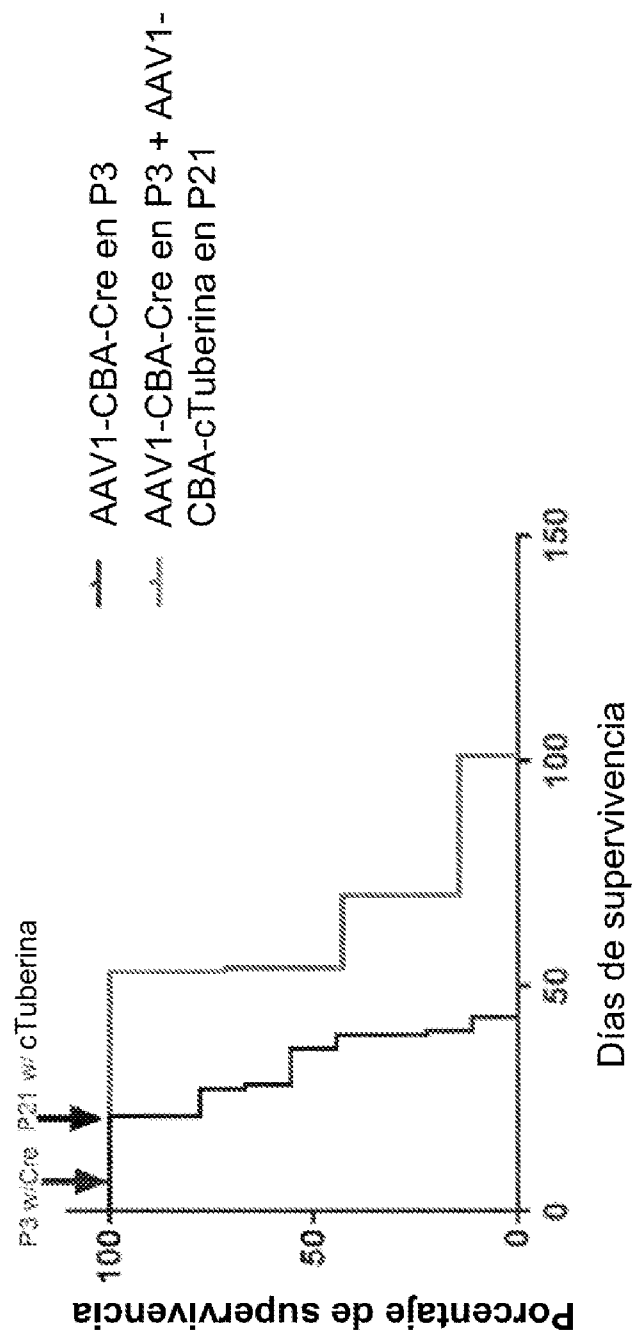


FIG. 4D

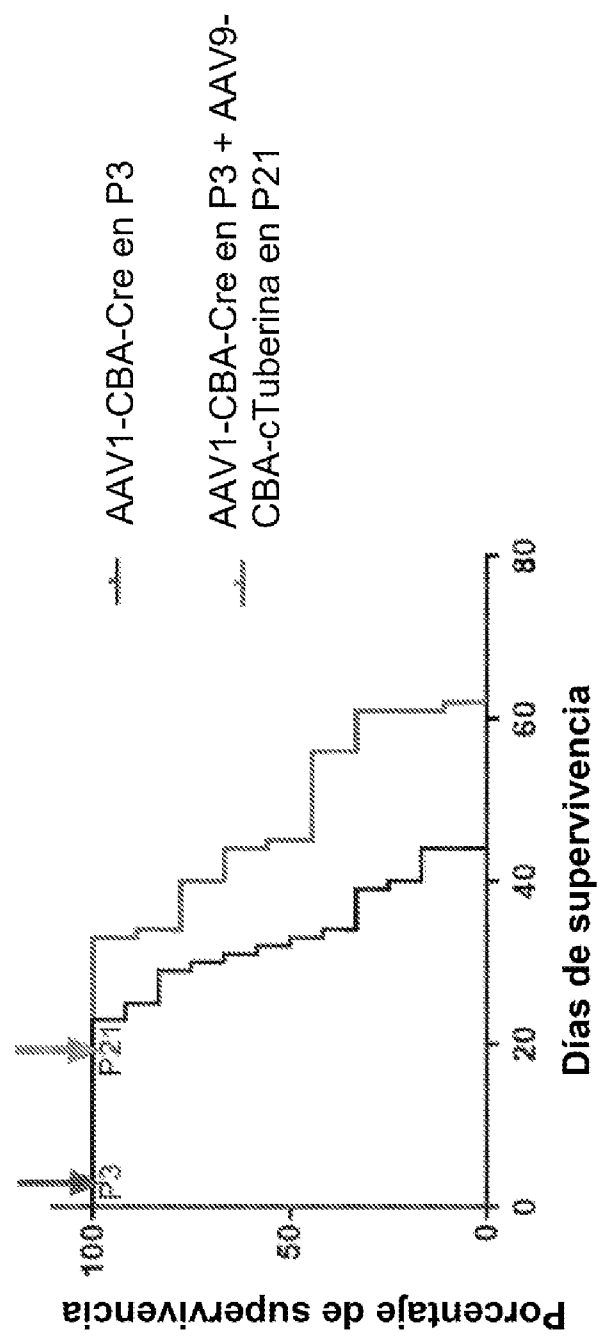


FIG. 4E

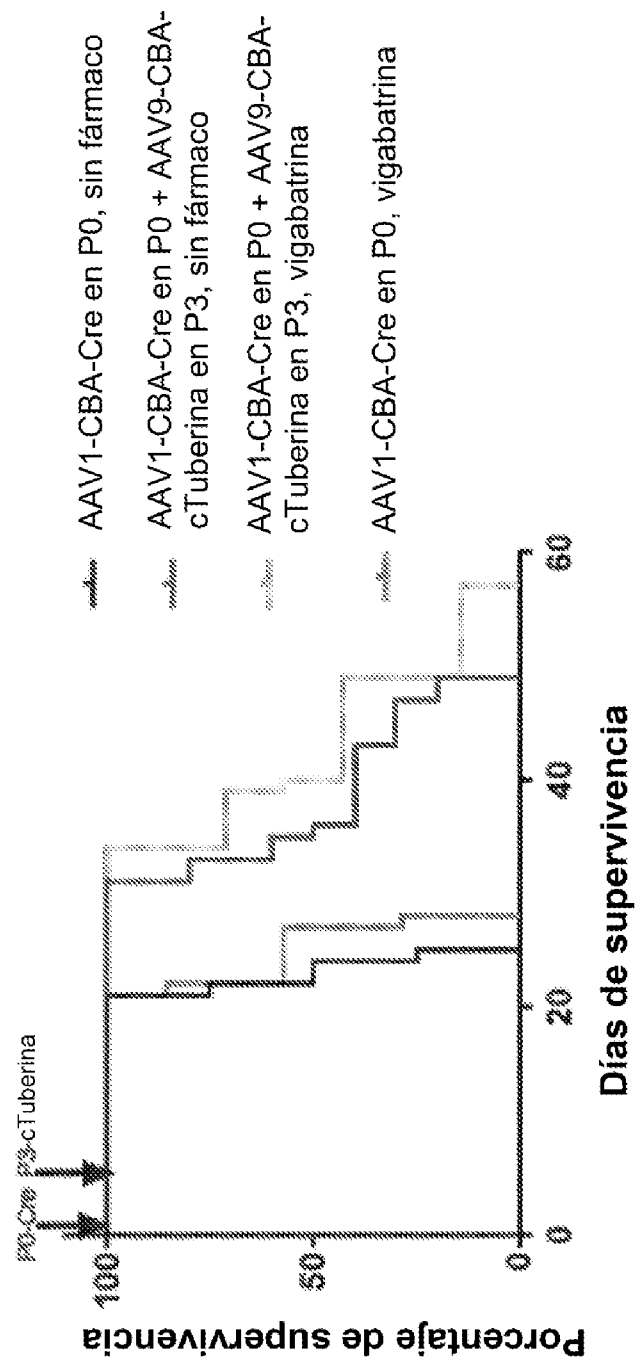




Fig. 5A

Cerebro normal, de control, no inyectado



Fig. 5B

Floreados para TSC2, Cre en P3- 1  $\mu$ l/ventrículo, sacrificados a los 27 días



Fig. 5C

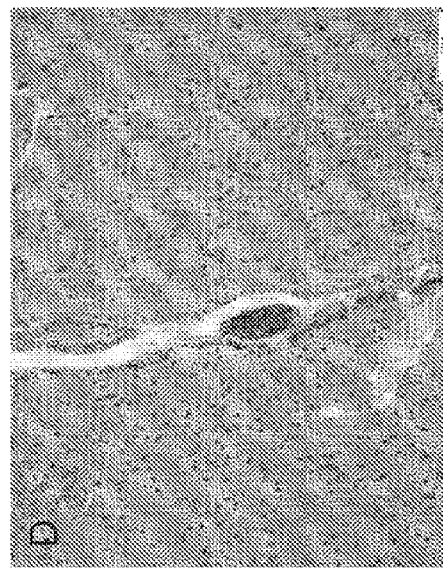
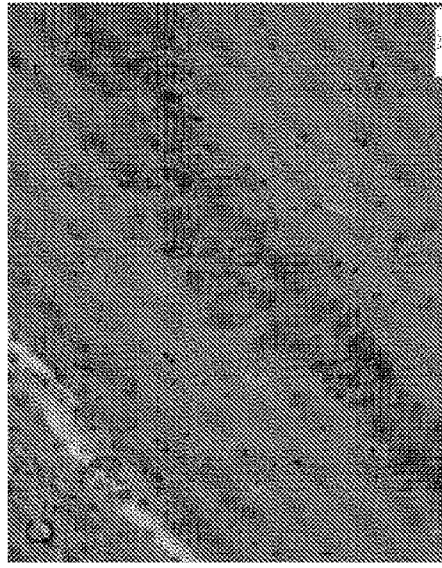


Fig. 5D

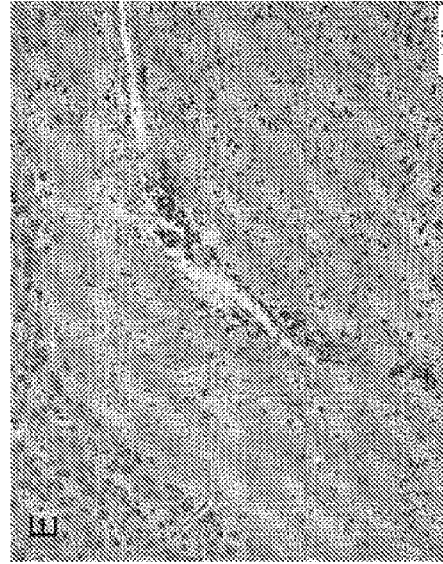
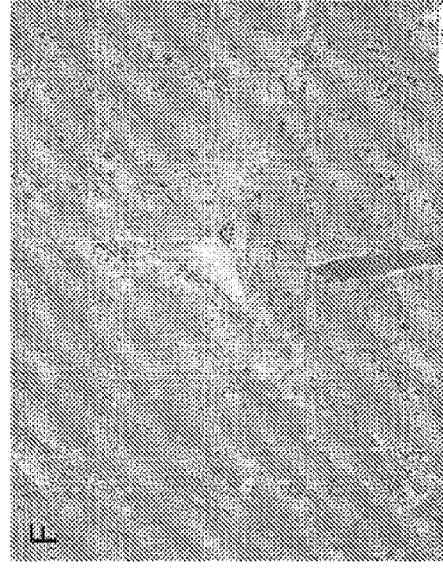


Fig. 5E



Tsc2, inyectados con cTuberina

Fig. 5F

FIG. 6A

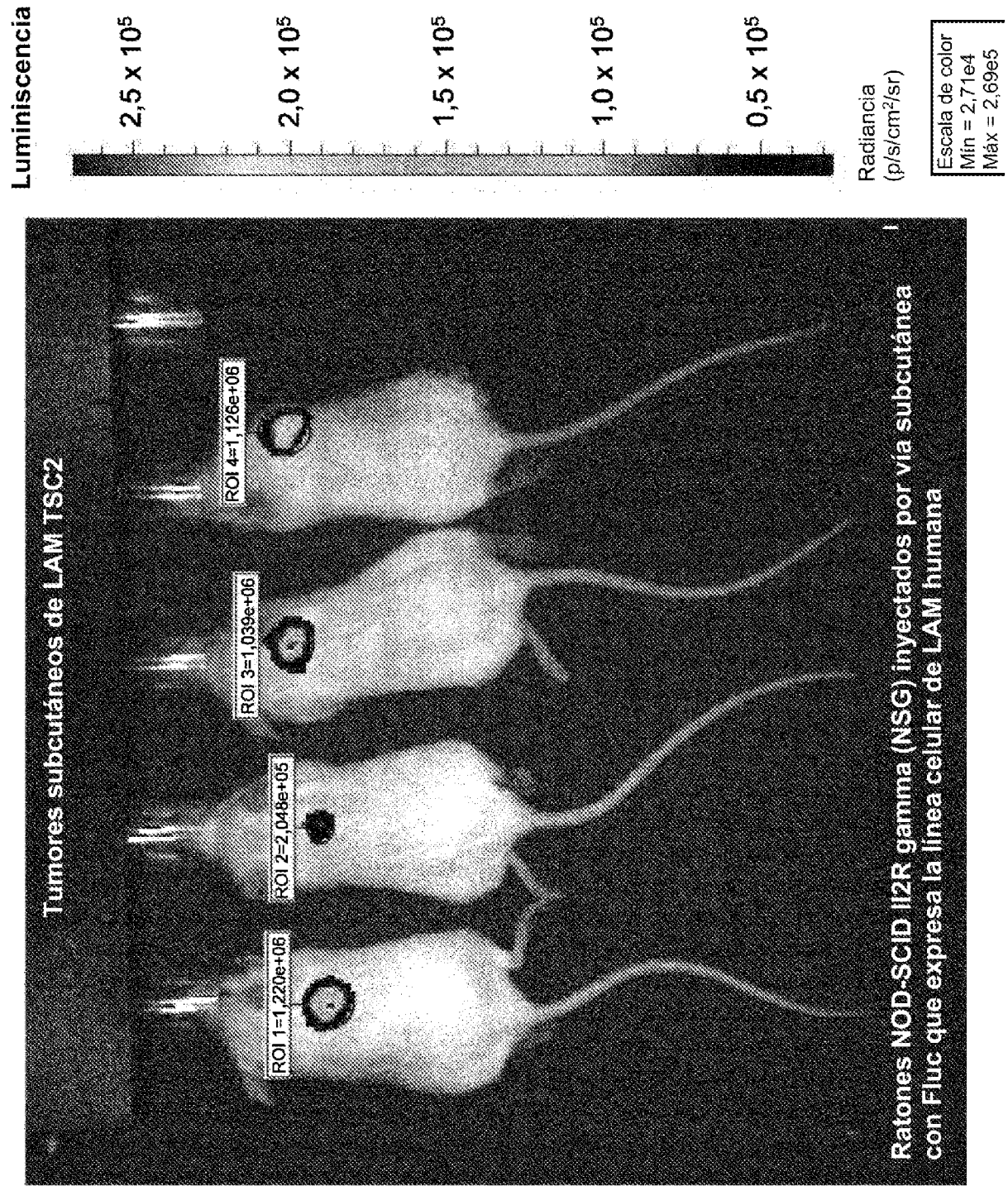


FIG. 6B

Tratamiento con AAV9-CBA-cTuberina para tumores subcutáneos de LAM

