(11) **MX 2016001204 A**

IMPI
INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

(12) **SOLICITUD de PATENTE**

(43) Fecha de publicación: **21/07/2016**

(22) Fecha de presentación: **27/01/2016**
(21) Número de solicitud: **2016001204**

(51) Int. Cl: ***C12N 15/864*** *(2006.01)*
C12N 15/86 *(2006.01)*

(86) Número de solicitud PCT: **EP 2013/066271**
(87) Número de publicación PCT: **WO 2014/020149 (06/02/2014)**

(71) Solicidante:
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
Edifici A. Campus universitari s/n E-08193 Bellatera (Cerdanyola del Valles) ES

(72) Inventor(es):
Verónica JIMÉNEZ CENZANO
Cbateg, Campus de la UAB s/n Cerdanyola del Vallès E-08193 ES
Fàtima BOSCH TUBERT

(74) Representante:
Francisco Javier UHTHOFF ORIVE
Hamburgo No. 260 CUAUHTEMOC Distrito Federal 06600 MX

(54) Título: **VECTORES VIRALES ADENO-ASOCIADOS (AAV) UTILES PARA TRANSDUCIR TEJIDO ADIPOSO.**

(54) Title: **ADENO-ASSOCIATED VIRAL (AAV) VECTORS USEFUL FOR TRASDUCING ADIPOSE TISSUE.**

(57) Resumen

La presente invención se refiere a vectores virales adeno-asociados útiles para transducir tejido adiposo. La invención también se refiere a polinucleótidos, plásmidos, vectores y métodos para la producción de estos vectores virales adeno-asociados. La invención también se refiere a métodos de terapia génica útiles para el tratamiento de una enfermedad que requiere la regulación de los niveles de expresión de un gen.

(57) Abstract

The present invention relates to adeno-associated viral vector useful for transducing adipose tissue. The invention also relates to polynucleotides, plasmids, vectors and methods for the production of such adeno-associated viral vector. The invention also relates to gene therapy methods useful for the treatment of a disease that requires the regulation ofthe expression levels of a gene.

VECTORES VIRALES ADENO-ASOCIADOS (AAV) ÚTILES PARA TRANSDUCIR TEJIDO ADIPOSO

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a vectores virales adeno-asociados (AAV, por sus siglas en inglés) útiles para transducir tejido adiposo. Los vectores pueden transducir tejido adiposo blanco o café de una manera específica del tejido.

Antecedentes de la Invención

Recientemente, se ha reconocido al tejido adiposo como un órgano metabólico y endocrino principal, además de su ya conocido papel como un depósito de grasa y modulador de la homeostasis energética. Se ha propuesto que la función deteriorada de tejido adiposo blanco (WAT, por sus siglas en inglés), así como la actividad disminuida del tejido adiposo café (BAT, por sus siglas en inglés) o masa BAT, son contribuyentes principales al desarrollo de la obesidad. A este respecto, la disfunción de los adipocitos y de WAT se ha descrito en humanos. Además, también se ha reportado una correlación inversa entre la actividad de BAT y el índice de masa corporal (BMI, por sus siglas en inglés). Ver Yee J, *et al.*, Lipids Health Dis. 2012, 11:19-30, Ichimura A, *et al.*, Nature 2012; 483: 350-354, Mazzatti D, *et al.*, Arch. Physiol. Biochem. 2012; 118(3):112-120, Cypess A, *et al.*, N. Engl. J.

Med. 2009; 360:1509-1517, y van Marken Lichtenbelt W, *et al.*, N. Engl. J. Med. 2009; 360:1500-1508.

La incidencia de obesidad se ha incrementado dramáticamente durante las últimas décadas hasta alcanzar proporciones epidémicas. Se estima que más de 500 millones de individuos son obesos. En la actualidad la obesidad es un problema mayor de salud pública. Ver IASO, "Global Prevalence of Adult Obesity, Report IOTF 2008" (IASO, London, GB, 2009). La obesidad incrementa *per se* el riesgo de mortalidad y se ha asociado por largo tiempo fuertemente con resistencia a insulina y diabetes tipo 2. Ver Peeters A, *et al.*, Ann. Intern. Med. 2003; 138:24-32 y Moller D, *et* 30 *al.*, N. Engl. J. Med. 1991; 325:938-948. Además, la disfunción de los adipocitos y la obesidad también son factores significativos de riesgo para ciertos tipos de cáncer y para muchas otras enfermedades serias, tal como enfermedad de corazón, disfunción inmunitaria, hipertensión, artritis, y enfermedades neurodegenerativas. Ver Roberts D, *et al.*, Annu. Rev. Med. 2010; 61:301-316, Spiegelman B, *et al.*, J. Biol. Chem. 1993; 268(10):6823-6826, y Whitmer R, *et al.*, Curr. Alzheimer Res. 2007; 4(2):117-122.

La dieta y el ejercicio son los tratamientos de soporte principal para la obesidad, pero un número creciente de pacientes también requieren intervención farmacoterapéutica para disminuir y mantener el peso

corporal. Sin embargo, la farmacoterapia no induce pérdida de peso involuntaria o sustancial, y adicionalmente, los fármacos anti-obesidad frecuentemente exhiben importantes efectos secundarios debido a sus acciones sistémicas. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de nuevos y más seguros planteamientos para prevenir y combatir la epidemia actual de obesidad. A este respecto, el desciframiento de los eventos patológicos que apuntalan la obesidad es crucial para el desarrollo de nuevas terapias anti-obesidad. La transferencia génica *in vivo* de genes candidatos hacia tejido adiposo blanco y café puede ofrecer mayor potencial para comprender mejor los mecanismos moleculares que fundamentan el comienzo y el desarrollo de la obesidad. Además, los planteamientos de terapia génica que tienen como dianas a los adipocitos pueden abrir nuevas oportunidades para el tratamiento futuro de la obesidad y sus trastornos asociados en tanto que reducen al mínimo los efectos sistémicos. Sin embargo, a la fecha, permanece elusiva la transferencia génica efectiva y específica a tejido adiposo blanco y café.

Recientemente, se ha mostrado que AAV de serotipo 1 (AAV1) infecta modestamente el WAT de ratón *in vivo* cuando se combina con un agente tensioactivo no iónico o celastrol. Ver Mizukami H, *et al.*, Hum. Gene Ther. 2006; 17:921-928 y Zhang F, *et al.*, Gene Ther. 2011; 18:128-134. Otros serotipos de AAV, tal como AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9 se han reportado que

son altamente infecciosos pero no es clara su eficiencia de transducción de tejido adiposo. Ver Gao G, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 2002; 99:11854-11859, Nakai H, *et al.*, J. Virol. 2005;79:214-224, Pacak C, *et al.*, Circ. Res. 2006; 99:e3-e9, Broekman M, *et al.*, Neuroscience 2006; 138:501-510, Wang Z, *et al.*, Diabetes 2006; 55:875-884, Taymans J, *et al.*, Hum. Gene Ther. 2007; 18:195-206, Bish L, *et al.*, Hum. Gene Ther. 2008; 19:1359-1368, y Lebherz C, *et al.*, J. Gene Med. 2008; 10:375-382. De esta manera, existe la necesidad en la técnica del desarrollo de vectores que permitan la transducción específica de tejido adiposo, y además, la transducción de tipos particulares de células adiposas.

Breve Descripción de la Invención

La presente invención se refiere a vectores virales adeno-asociados (AAV) que permiten la distribución de polinucleótidos de interés a tipos específicos de células adiposas y su expresión. El uso de los elementos reguladores específicos de tejido adiposo, de la invención, restringe la expresión de los polinucleótidos de interés a otro tejido adiposo blanco o tejido adiposo café. Además, los vectores de la invención se han probado útiles para el tratamiento de enfermedades asociadas a tejido adiposo tal como, por ejemplo, diabetes tipo 2. Los aspectos inventivos de la presente invención se describen en las reivindicaciones.

Depósito de microorganismos

Los plásmidos pAAV-mini/aP2-null y pAAV-mini/UCP1-null se depositaron el 8 de Junio de 2012 en el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Inhoffenstraβe 7 B, D-38124 Braunschweig, República Federal de Alemania, bajo los números de acceso DSM 26057 y DSM 26058, respectivamente.

Breve Descripción de las Figuras

Figuras 1A-1H. Transducción de adipocitos blancos por administración intra-eWAT de AAV. A-B. Inmunotinción contra proteína fluorescente verde (GFP, en verde) en secciones de eWAT tratadas con AAV-CAG-GFP de serotipos 1, 2, 4, y 5 con o sin Pluronics F88 (Fig. 1A) y AAV-CAG-GFP de serotipos 6, 7, 8, y 9 (Fig. 1B). Azul, núcleos. Las flechas indican adipocitos transducidos. Aumento original 100X (B, panel izquierdo) y 200X (A; B, panel derecho). Fig. 1C. contenido de GFP en eWAT tratado con AAV-CAG-GFP de serotipos 1, 6, 7, 8, o 9 (n = 5 por grupo). Los valores mostrados son medias ± SEM. RLU, unidades relativas de luz. Fig. 1D. Tinción X-gal *In toto* de eWAT que recibe AAV8-CMV-LacZ. La tinción X-gal se distribuyó a todo lo largo del eWAT transducido. En contraste, no se detectó tinción X-gal en eWAT de animales tratados con solución salina. Fig. 1E. Niveles de expresión relativa de mHKII en adipocitos aislados obtenidos de eWAT de animales tratados con vectores AAV9-CMV-

mHKII o AAV9-CMV-null. Fig. 1F. captación de 2-[1-^{3}H]desoxi-D-glucosa basal y estimulada con insulina por adipocitos aislados de ratones inyectados con AAV9-CMV-null y AAV9-CMV-mHKII. Se obtuvieron adipocitos de al menos 5 ratones/grupo. Fig. 1G. Inmunotinción contra GFP (café) en secciones de tejido adiposo blanco inguinal (iWAT) dos semanas después de la administración intra-iWAT de $2x10^{11}$ vg de vectores AAV8 o AAV9-CAG-GFP. Aumento original x100. Fig. 1H: niveles de expresión de GFP en iWAT dos semanas después de la inyección de $2x10^{11}$ vg de AAV8 o AAV9-CAG-GFP (n = 6). Los valores mostrados son medias ± SEM. *p<0.05, **p <0.01 y ***p<0.001; # p<0.05 vs AAV9-CMV-null a la misma concentración de insulina. Todos los análisis se realizaron dos semanas después de la administración intra-eWAT de $2x10^{11}$ vg/eWAT.

Figuras 2A-2D. Transducción específica de adipocitos blancos después de la administración intra-eWAT de AAV por medio de la región reguladora mini/aP2. Fig. 2A. Inmunotinción contra GFP (en café) en eWAT que recibe 10^{12} vg/eWAT de vectores AAV8 y AAV9-mini/aP2-GFP. Se realizó el análisis dos semanas después de la inyección. Aumento original x400. Fig. 2B. Niveles en circulación de hSeAP. Una dosis de $4x10^{12}$ vg/ratón de vectores AAV9-mini/aP2-hSeAP se inyectó bilateralmente en eWAT y se realizó la medición de los niveles en circulación de hSeAP en varios puntos de tiempo después de la inyección. RLU, unidades relativas de

luz. Los valores mostrados son medias ± SEM. n = 3 (solución salina) y n = 4 (AAV9-mini/aP2-SEAP). Fig. 2C. Niveles de expresión relativa de hSeAP en hígado y eWAT un año después de la administración intra-eWAT de $4x10^{12}$ vg/ratón de AAV9-mini/aP2-hSeAP. Fig. 2D. Captación *in vivo* de 2-[1-^{3}H]desoxi-D-glucosa por eWAT, iBAT, y corazón se evaluó dos semanas después de la administración intra-eWAT de los vectores AAV9-mini/aP2-null y AAV9-mini/aP2-mHKII ($1.4.x10^{12}$ vg/ratón). Los valores mostrados son medias ± SEM. n = 7 ratones por grupo. * P <0.05.

Figuras 3A-3D. Transducción de adipocitos cafés por administración intra-IBAT de AAV. Fig. 3A. Inmunotinción contra GFP (en café) en secciones de iBAT tratadas con $2x10^9$ vg/ratón de AAV8 o AAV9-CAG-GFP. Aumento original x200 y x400 (inserciones). Fig. 3B. Niveles de expresión relativa de GFP en iBAT que recibe $2x10^9$ vg/ratón de AAV8 o AAV9-CAG-GFP. Los valores mostrados son medias ± SEM. n = 5 ratones por grupo. *p<0.05. Fig. 3C. Los niveles de expresión relativa de proteína fluorescente roja (RFP) en iBAT que recibe $2x10^{10}$ vg/ratón de AAV4 o AAV8-CMV-RFP o $2x10^{10}$ vg/ratón de AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9-CMV-RFP. Los patrones de transducción son similares a eWAT. Ver figura 1. AAV6, AAV7, AAV8 y AAV9 son los serotipos más eficientes para transducir iBAT. Fig. 3D. Inmunotinción contra RFP (en café) en

secciones de iBAT tratadas con 10^{11} vg/ratón de AAV9-CMV-RFP. Aumento original x200 y x400 (inserciones). Los análisis se realizaron dos semanas después de la administración de AAV.

Figuras 4A-4F. Transducción específica de adipocitos cafés después de administración intra-iBAT de AAV por medio de la región reguladora mini/UCP1. Fig. 4A. Se evaluó la transducción de adipocitos cafés por inmunotinción contra GFP (en café) dos semanas después de la inyección de $2x10^{11}$ vg/ratón de los vectores AAV8 o AAV9-mini/UCP1-GFP. Aumento original x200 y x400 (inserciones). Fig. 4B. Captación *in vivo* de 2-[1-^{3}H]desoxi-D-glucosa por iBAT, eWAT y corazón a dos semanas después de la administración de los vectores AAV8-mini/UCP1-null y AAV8-mini/UCP1-mHKII ($7x10^{10}$ vg/ratón). n = 6 (AAV8-mini/UCP1-mHKII) y n =10 (AAV8-mini/UCP1-null) ratones por grupo. C-E. Niveles de expresión relativa de $mVEGF_{164}$ (Fig. 4C), mVEGF total (Fig. 4D), y mPECAM1 (Fig. 4E) en iBAT dos semanas después de la distribución por $2x10^{11}$ vg/ratón de los vectores AAV9-mini/UCP1-$mVEGF_{164}$ o AAV9-mini/UCP1-null. n = 5 ratones por grupo. Fig. 4F. Inmunotinción contra α-SMA (en café) en iBAT dos semanas después de la inyección de $2x10^{11}$ vg/ratón de vectores AAV9-mini/UCP1-$mVEGF_{164}$ o AAV9-mini/UCP1-null. Aumento original x400. Los valores mostrados son medias ± SEM. *$p<0.05$. Puntas de flecha roja indican estructuras capilares.

Figuras 5A-5H. Transducción de adipocitos blancos y cafés por distribución sistémica de vectores AAV a ratones delgados. Fig. 5A. Inmunotinción contra GFP (en verde) en secciones de eWAT. Azul, núcleos. Aumento original x100 (panel izquierdo) y x200 (panel derecho). Fig. 5B. Niveles de expresión relativa de GFP en eWAT. Fig. 5C. Contenido de GFP en eWAT. Fig. 5D. Inmunotinción contra GFP (en café) en secciones de iBAT. Aumento original x200 y x400 (inserciones). Fig. 5E. Niveles de expresión relativa de GFP en iBAT. Fig. 5F. Contenido de GFP en iBAT. Figs. 5G-5H. Niveles de expresión relativa de GFP en inguinal (iWAT), retroperitoneal (rWAT), mesentérico (mWAT), eWAT e iBAT después de la administración iv de vectores a ratones ICR (G) y ratones C57B16 (H) (ICR: n = 3 para AAV8 y n = 5 para AAV9; C57B16: n = 4). Todos los análisis se realizaron dos semanas después de la administración en la vena de la cola de $5x\ 10^{12}$ vg/ratón de los vectores AAV8 o AAV9-CAG-GFP. AU, unidades arbitrarias. RLU, unidades relativas de luz.

Figuras 6A-6G. Transducción específica de adipocitos cafés después de la administración sistémica de AAV por medio de la región reguladora mini/UCP1. Fig. 6A. Inmunotinción contra GFP (en café) en iBAT que recibe los vectores AAV8 o AAV9-mini/UCP1-GFP. Aumento original x200 y x400 (inserciones). Figs. 6B-6C. Niveles de expresión relativa de $MVEGF_{164}$ (Fig. 6B) y mVEGF total (Fig. 6C) en iBAT

tratado con $2x10^{12}$ vg/ratón de los vectores AAV9-mini/UCP1-$mVEGF_{164}$ o AAV9-mini/UCP1-null dos meses después de la inyección. Figs. 6D-6E. Niveles de expresión de VEGF164 (Fig. 6B) y PECAM1 (Fig. 6C) en iBAT un mes después de la administración iv de $8x10^{12}$ vg de los vectores AAV9-mini/UCP1-VEGF164 o AAV9-mini/UCP1-null (n = 5). Figuras 5F-5G. Inmunotinción contra CD105 (café) (Fig. 6D) y α-SMA (café) (Fig. 6E) en los mismos cohortes como en B-C. Las puntas de flechas rojas indican recipientes. Aumento original x400 y x1000 (inserciones). Valores mostrados son medias + SEM. n = 5 ratones por grupo *$p<0.05$.

Figuras 7A-7C. Transducción de adipocitos por medio de la región reguladora mini/aP2 y expresión transgénica restringida por adipocito después de la administración sistémica de AAV. Fig. 7A. Se valuó la transducción de adipocitos cafés por inmunotinción contra GFP (en café) en secciones de iBAT de animales que reciben los vectores AAV8 o AAV9-mini/aP2-GFP. Aumento original x200 y x400 (inserciones). Figs. 7B-7C. Se valuó la transducción de tejidos no adiposos por inmunotinción contra GFP (en café) dos semanas después de la inyección. La expresión de GFP fue mínima en el hígado y estuvo ausente en el corazón de animales tratados con AAV8 o AAV9-mini/aP2-GFP (Fig. 7B) y AAV8 o AAV9-mini/UCP1-GFP (Fig. 7C). Aumento original x100 y x400 (inserciones). Todos los análisis se realizaron dos

semanas después de la inyección sistémica de $2x10^{12}$ vg/ratón.

Figuras 8A-8C. Expresión transgénica fuera de diana después de la administración intra-eWAT de AAV. Fig. 8A. Inmunotinción contra GFP (en café) en iBAT de animales que reciben AAV9-CAG-GFP. Aumento original x200 y x400 (inserciones). Fig. 8B. Niveles de expresión relativa de GFP en iBAT y eWAT de animales tratados con AAV9-CAG-GFP. Los valores mostrados son medias ± SEM. n = 5 ratones por grupo. *P <0.05. Fig. 8C. Se evaluó la transducción de órganos no adiposos por inmunotinción contra GFP (en verde). La expresión de GFP fue aparente en el corazón e hígado de animales inyectados con AAV7, AAV8 o AAV9. Aumento original x100. Los análisis se realizaron dos semanas después de la administración intra-eWAT de vectores AAV-CAG-GFP ($4x10^{11}$ vg/ratón).

Figura 9. Expresión transgénica mediada por AAV restringida por tejido adiposo por medio de la región reguladora mini/aP2. No se detectó expresión de GFP por inmunotinción contra GFP en el hígado y corazón dos semanas después de la administración intra-eWAT local de 10^{12} vg de vectores AAV8 y AAV9-mini/aP2-GFP. Aumento original x100.

Figura 10. Transducción de órganos no adiposos por administración intra-iBAT de vectores AAV. La transducción de órganos no adiposos se evaluó por inmunotinción contra GFP (en café) dos semanas después de la inyección. La expresión

de GFP fue evidente en corazón e hígado de animales inyectados con intra-iBAT con $2x10^9$ vg/ratón de vectores AAV8 y AAV9-CAG-GFP. Aumento original x200.

Figuras 11A-11B. Transducción de adipocitos cafés por medio de la región reguladora mini/aP2 y expresión transgénica restringida por adiposo después de la administración intra-iBAT de AAV. Fig. 11A. La transducción de adipocitos cafés se evaluó por inmunotinción contra GFP (en café) dos semanas después de la distribución intra-iBAT de $2x10^{11}$ vg/ratón de vectores AAV9 mini/aP2-GFP. Aumento original x200 y x400 (inserciones). Fig. 11B. La transducción de órganos no adiposos se evaluó por inmunotinción contra GFP (en café) dos semanas después de la inyección de vectores AAV8 o AAV9-mini/UCP1-GFP ($2x10^{11}$ vg/ratón) localmente en iBAT. La expresión de GFP fue marginal en hígado. Aumento original x100 y x400 (inserciones).

Figura 12. Expresión transgénica extendida después de la distribución en vena de cola de AAV. Inmunotinción contra GFP (en verde) dos semanas después de la inyección de $5x10^{12}$ vg/ratón de vectores AAV9-CAG-GFP mediante transducción revelada en vena de cola de hígado, corazón, músculo esquelético, testículos y riñón. Azul, núcleos. Aumento original x200.

Figuras 13A-13D. Transducción de WAT y BAT después de la administración sistémica de vectores AAV a ratones

obesos-diabéticos Figs. 13A-13B. Inmunotinción contra GFP (café) en secciones de tejido adiposo blanco epididimal (eWAT), tejido adiposo blanco inguinal (iWAT) y tejido adiposo café interescapular (iBAT) después de la administración iv de $3x10^{12}$ vg de vectores AAV8 o AAV9-CAG-GFP a ratones ob/ob (Fig. 13A) y db/db (Fig. 13B). Aumento original x200. (ob/ob: n = 4; db/db: n = 4). Figs. 13C-13D. Expresión de GFP en depósitos inguinales (iWAT), retroperitoneales (rWAT), mesentéricos (mWAT), eWAT e iBAT de los mismos cohortes de ratones ob/ob (Fig. 13C) y db/db (Fig. 13D). AU, unidades arbitrarias. Todos los análisis se realizaron dos semanas después de la distribución del vector. Los valores mostrados son medias ± SEM. *p<0.05 vs. AAV9.

Figura 14. Transducción eficiente de adipocitos y des-selección como diana de expresión transgénica de hígado y corazón con secuencias mirT. Inmunotinción de GFP (café) en tejido adiposo blanco epididimal (eWAT), tejido adiposo blanco inguinal (iWAT), tejido adiposo café interescapular (iBAT), hígado y corazón dos semanas después de la administración iv 10^{12} vg de vectores AAV9-CAG-GFP, AAV9-CAG-GFP-miRT122, AAV9-CAG-GFP-miRT1 o AAV9-CAG-GFP-doublemiRT. Aumento original x100 (hígado y corazón), x200 (eWAT y iWAT) y x400 (iBAT e inserciones).

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención describe vectores basados en

los serotipos AAV6, AAV7, AAV8, y AAV9 del virus adeno-asociado capaz de mediar la transferencia génica de forma eficiente a WAT o BAT cuando se administra de manera local. Ver figuras 1B y 1C y 3A-3D. La administración sistémica de estos vectores también conduce a una distribución génica eficiente tanto en WAT como en BAT. Ver figuras 5A y 5D. Aunque la distribución génica mediada por los vectores AAV8 y AAV9 es eficiente, no se restringe a tejido adiposo. La presente invención describe que la combinación de vectores de AAV8 y AAV9 con regiones promotoras específicas de tejido adiposo permite la expresión específica de polinucleótidos de interés en tejido adiposo. En particular, la administración local de vectores AAV8 o AAV9 que comprenden un casete de expresión en donde un gen heterólogo (por ejemplo GFP) está bajo el control de la región reguladora mini/aP2 conduce a su expresión en WAT sin la expresión en el hígado ni corazón. Ver figuras 2A y 9. Además, la administración local de los vectores AAV8 o AAV9 que comprenden un casete de expresión en donde un gen heterólogo (por ejemplo, GFP) está bajo el control de la región reguladora mini/UCP1 conduce a su expresión en BAT sin expresión en corazón y solo expresión marginal en hígado. Ver figuras 4A y 11B. De esta manera, la administración local de las combinaciones formadas por los vectores y promotores de la invención proporciona un mecanismo seguro para tratar muchas enfermedades basadas en

la transducción de células adiposas *in vivo*.

Además, la administración sistémica de las combinaciones de la invención constituye un planteamiento alternativo para la transducción de células adiposas. A este respecto, la presente invención describe que la administración sistémica de las combinaciones de AAV8 o AAV9-mini/UCP1 y AAV8 o AAV9-mini/aP2 es efectiva para transducir BAT y WAT, respectivamente. Ver figuras 6A y 7A. A pesar de cuál de las dos regiones reguladoras se use, la administración sistémica de las combinaciones de la invención conduce a expresión altamente restringida de los polinucleótidos de interés en tejido adiposo, sin la expresión en corazón y solo expresión marginal en el hígado. Ver figuras 7B y 7C.

1. Definición de términos generales y expresiones generales

Los términos "virus adeno-asociado", "virus AAV", "virión AAV", "partícula viral AAV", y "partícula AAV", como se usa de manera indistinta en la presente, se refieren a una partícula viral compuesta de al menos una proteína de cápsida de AAV (preferentemente por todas las proteínas de cápsida de un serotipo AAV particular) y un genoma de AAV de polinucleótido encapsidado. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido diferente de un genoma AAV tipo silvestre tal como un transgen que se va a distribuir a una célula mamífera)

flanqueado por las repeticiones terminales invertidas de AAV, se refiere típicamente como una "partícula de vector AAV" o "vector AAV". AAV se refiere a virus que corresponden al género *Dependovirus* de la familia *Parvoviridae*. El genoma AAV es de aproximadamente 4.7 kilobases de largo y está compuesta de ácido desoxirribonucleico de hebra individual (ADNss) que puede ser ya sea de sentido positivo o negativo. El genoma comprende repeticiones terminales invertidas (ITR) en ambos extremos de la hebra de ADN, y dos cuadros de lectura abiertos (ORF): *rep y cap*. El cuadro rep está constituido de cuatro genes traslapados que codifican para proteínas Rep requeridas para el ciclo de vida de AAV. El cuadro cap contiene secuencias de nucleótidos traslapadas de las proteínas de cápsida: VP1, VP2 y VP3, que interactúan conjuntamente para formar una cápsida de un simetría icosaédrica. Ver Carter B, Adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors for gene delivery, Lassic D, *et al.*, Eds., "Gene Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies" (Marcel Dekker, Inc., New York, NY, US, 2000) y Gao G, *et al.*, J. Virol. 2004; 78(12):6381-6388.

El término "ITR de virus adeno-asociado" o "AAV ITR", como se usa en la presente, se refiere a las repeticiones terminales invertidas presentes en ambos extremos de la hebra de ADN del genoma de un virus adeno-asociado. Las secuencias de ITR se requieren para

multiplicación eficiente del genoma de AAV. Otra propiedad de estas secuencias es su capacidad para formar una horquilla. Esta característica contribuye a su auto-cebadura lo que permite la síntesis, independiente de primasa, de la segunda hebra de ADN. Las ITR también se muestra que se requieren tanto para la integración del ADN de AAV tipo silvestre en el genoma de la célula hospedadora (es decir, 19º cromosoma en humanos) y el rescate de este, así como para la encapsidación eficiente del ADN de AAV combinado con la generación de partículas de AAV resistentes a desoxirribonucleasa completamente montadas.

El término "AAV2", como se usa en la presente, se refiere a un serotipo de virus adeno-asociado con una secuencia de genoma como se define en el número de acceso a GenBank NC001401.

El término "vector AAV", como se usa en la presente, se refiere además a un vector que comprende uno o más polinucleótidos de interés (o transgenes) que están flanqueados por secuencias de repeticiones terminales (ITR) de AAV. Estos vectores AAV se pueden replicar y envasar en partículas virales infecciosas cuando están presentes en una célula hospedadora que ha sido transfectado con un vector que codifica y expresa los productos génicos *rep y cap* (es decir, las proteínas de AAV Rep y Cap), y en donde la célula hospedadora se ha transfectado con un vector que codifica y

expresa una proteína del cuadro de lectura abierto E4orf6 de adenovirus. Cuando un vector AAV se incorpora en un polinucleótido más grande (es decir, en un cromosoma o en otro vector tal como un plásmido usado para clonación o transfección), entonces el vector AAV se refiere típicamente como un "pro-vector". El pro-vector se puede "rescatar" por replicación y encapsidación en la presencia de funciones de envasado de AAV y funciones auxiliares necesarias proporcionadas por E4orf6.

El término "tejido adiposo", como se usa en la presente, se refiere a tejido compuesto de adipocitos maduros (es decir, células grasas) y una combinación de vasos sanguíneos pequeños, tejido nervioso, nódulos linfáticos y la fracción vascular estromal (SVF). La SVF está compuesta de células endoteliales, fibroblastos, células precursoras de adipocitos (es decir, preadipocitos), y células inmunitarias, tal como macrófagos y células T. En los mamíferos, dos tipos diferentes de tejidos adiposos son distinguidos de manera tradicional: el tejido adiposo blanco (WAT) y el tejido adiposo café (BAT). El tejido adiposo funciona principalmente para almacenar energía en la forma de grasa, para generar calor mediante termogénesis sin temblor, y para segregar adipocinas.

El término "célula de tejido adiposo" o "adipocito", como se usa en la presente, se refiere a los

tipos de células que componen el tejido adiposo y que se especializan en almacenar energía como grasa o generar calor mediante termogénesis sin temblor y segregar adipocinas. Las células del tejido adiposo incluyen adipocitos blancos y adipocitos cafés.

El término "región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo", como se usa en la presente, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que sirve como un promotor (es decir, regula la expresión de una secuencia de ácido nucleico seleccionada, operablemente enlazada al promotor), y que afecta la expresión de una secuencia seleccionada de ácido nucleico en células específicas de tejido, tal como adipocitos. La región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo puede ser constitutiva o inducible.

El término "fosfatasa alcalina" o "AP", como se usa en la presente, se refiere a una enzima (EC 3.1.3.1) que cataliza la hidrólisis de grupos fosfato de muchos tipos de moléculas, incluyendo nucleótidos, proteínas y alcaloides.

El término "angiogénesis", como se usa en la presente, se refiere al proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos de otros preexistentes, e incluye los procesos de vasculogénesis y arteriogénesis.

El término "arteriogénesis", como se usa en la presente, se refiere a la formación, crecimiento o desarrollo

de vasos sanguíneos con una capa media de músculo liso.

El término "célula de tejido adiposo café" o "adipocito café", como se usa en la presente, se refiere al tipo de adipocito que es poligonal y se caracteriza por la acumulación de lípidos en múltiples gotas "multiloculares" más pequeñas y por su alto contenido de mitocondrias grandes envasadas con crestas laminares dentro del citoplasma. Diferente de los adipocitos blancos, estas células tienen considerable citoplasma. El núcleo es redondo, y aunque está localizado de manera excéntrica, no está en la periferia de la célula. Las numerosas mitocondrias de los adipocitos cafés y la rica vascularidad de los depósitos de adipocitos cafés son las razones principales del color café del BAT. Los adipocitos cafés se localizan en los depósitos clásicos de BAT y son responsables de la generación de calor mediante termogénesis sin temblor. Ver Enerback S, N. Engl. J. Med. 2009; 360: 2021-2023.

El término "región reguladora CAG", como se usa en la presente, se refiere a la combinación formada por el elemento intensificador temprano de citomegalovirus y el promotor de β-actina de pollo. Ver Alexopoulou A, et al., BMC Cell Biology 2008; 9 (2): 1-11.

El término "gen *cap*" o "gen *cap* de AAV", como se usa en la presente, se refiere a un gen que codifica para una proteína Cap. El término "proteína Cap", como se usa en la

presente, se refiere a un polipéptido que tiene al menos una actividad funcional de una proteína Cap nativa de AAV (por ejemplo, VP1, VP2, VP3). Los ejemplos de actividades funcionales de proteínas Cap (por ejemplo, VP1, VP2, VP3) incluyen la capacidad para inducir la formación de una cápsida, facilitar la acumulación de ADN de hebra individual, facilitar el envasado de ADN de AAV en cápsidas (es decir, encapsidación), unión a receptores celulares, y facilitar la entrada del virión en el hospedador.

El término "cápsida", como se usa en la presente, se refiere a la estructura en la cual se envasa el genoma viral. Una cápsida consiste de varias subunidades estructurales oligoméricas constituidas de proteínas. Por ejemplo, el AAV tiene una cápsida icosaédrica formada por la interacción de tres proteínas de cápsida: VP1, VP2 y VP3.

El término "composición celular", como se usa en la presente, se refiere a un material compuesto que comprende los adipocitos de la invención y al menos otro componente. La composición se puede formular como una formulación individual o puede presentarse como formulaciones separadas de cada uno de los componentes, que se pueden combinar para el uso conjunto como una preparación combinada. La composición puede ser un equipo de partes en donde cada uno de los componentes se formula y envasa de manera individual.

El término "promotor constitutivo", como se usa en

la presente, se refiere a un promotor cuya actividad se mantiene a un nivel relativamente constante en todas las células de un organismo, o durante la mayoría de las etapas de desarrollo, con poca o sin consideración a las condiciones ambientales celulares.

El término "intensificador", como se usa en la presente, se refiere a un elemento de secuencia de ADN al cual se unen los factores de transcripción para incrementar la transcripción génica.

El término "casete de expresión", como se usa en la presente, se refiere a una construcción de ácido nucleico, generada de manera recombinante o de forma sintética, con una serie de elementos específicos de ácido nucleico que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana.

El término "genes que proporcionan funciones auxiliares", como se usa en la presente, se refiere a genes que codifican para polipéptidos que realizan funciones en las cuales el AAV es dependiente para replicación (es decir, "funciones auxiliares"). Las funciones auxiliares incluyen aquellas funciones requeridas para la replicación de AAV que incluyen, sin limitación, aquellas porciones comprendidas en la activación de la transcripción génica de AAV, empalme de ARNm de AAV específico de la etapa, replicación de ADN de AAV, síntesis de productos de expresión cap, y montaje de

cápsida de AAV. Las funciones auxiliares de base viral se pueden derivar de cualquiera de los virus auxiliares conocidos tal como adenovirus, virus de herpes (diferente del virus de herpes simplex tipo I), y virus de vaccinia. Las funciones auxiliares incluyen, sin limitación, adenovirus E1, E2a, VA, y E4 o herpesvirus UL5, UL8, UL52 y UL29, y polimerasa de herpesvirus.

El término "hexoquinasa" o "HK", como se usa en la presente, se refiere a una enzima que cataliza la fosforilación de hexosas para formar fosfato de hexosa. En la mayoría de los organismos, la glucosa es el sustrato principal de HK, y el glucosa-6-fosfato es el producto más importante.

El término "alta presión sanguínea" o "hipertensión arterial", como se usa en la presente, se refiere a una condición médica en la cual está elevada la presión sanguínea de las arterias. La presión sanguínea comprende dos mediciones, sistólica y diastólica, que dependen de si se está contrayendo el músculo del corazón (sístole) o relajado entre los latidos (diástole). La presión sanguínea normal en reposo está dentro del intervalo de 100-140 mmHg sistólica (lectura superior) y 60-90 mmHg diastólica (lectura de fondo). La alta presión sanguínea se dice que está presente si es persistente en o por arriba de 140/90 mmHg. La hipertensión se clasifica como ya sea hipertensión primaria

(esencial) o hipertensión secundaria; aproximadamente 90-95% de los casos se categorizan como "hipertensión primaria", que significa alta presión sanguínea sin causa médica subyacente obvia. Los restantes 5-10% de los casos (es decir, hipertensión secundaria) se provoca por otras condiciones que afectan los riñones, arterias, corazón o sistema endocrino. La resistencia a insulina, que es común en la obesidad, también se piensa que contribuye a la hipertensión. La hipertensión es un factor de riesgo principal para ataque, infarto al miocardio (es decir, ataque al corazón), falla cardíaca, aneurismas de las arterias (por ejemplo, aneurisma aórtica), enfermedad arterial periférica y es una causa de falla crónica del riñón. La elevación aún moderada de la presión sanguínea arterial está asociada con una expectativa de vida acortada.

El término "hiperglicemia", como se usa en la presente, se refiere a un estado donde aparecen niveles anormalmente altos de glucosa en sangre con relación a los niveles de línea base en ayuno. En particular, se entiende que la hiperglicemia toma lugar cuando los niveles de glucosa en sangre en ayuno están consistentemente por arriba de 126 mg/dL, los niveles postprandiales de glucosa son mayores de 140 mg/dL, o los niveles de glucosa en plasma venoso 2 horas después de la administración de una dosis de glucosa de 1.75 gramos por cada kilogramo de peso corporal es más de 200

mg/dL.

El término "resistencia a insulina", como se usa en la presente, se refiere a un trastorno en donde las células no responden correctamente a insulina. Como resultado, el cuerpo produce más insulina en respuesta a los altos niveles de glucosa en sangre. Los pacientes con resistencia a insulina exhiben frecuentemente altos niveles de glucosa y altos niveles de circulación de insulina. La resistencia a insulina está enlazada frecuentemente a obesidad, hipertensión e hiperlipidemia. Adicionalmente, la resistencia a insulina aparece frecuentemente en pacientes con diabetes tipo 2.

El término "localmente administrado", como se usa en la presente, significa que los polinucleótidos, vectores, polipéptidos, o composiciones farmacéuticas de la invención se administran a un sujeto en o cerca de un sitio específico.

El término "obesidad", como se usa en la presente invención, se refiere a la definición de obesidad proporcionada por la WHO en base al índice de masa corporal (BMI), que consiste de la relación entre el peso de una persona (en kg) y el cuadrado de su altura en metros. De acuerdo a este criterio, un BMI menor de 18.5 kg/m^2 se considera como peso insuficiente o delgadez, un BMI de 18.5-24.9 kg/m^2 se considera un peso normal, un BMI de 25.0-29.9 kg/m^2 se considera grado 1 de sobrepeso, un BMI de 30.0-39.0

kg/m^2 se considera un grado 2 de sobrepeso y un BMI mayor de o igual a 40.0 kg/m^2 se considera obesidad mórbida. De manera alternativa, hay otros métodos para definir el grado de obesidad de un sujeto, tal como el diámetro de la cintura medido en el punto medio entre el límite inferior de las costillas y el límite superior de la pelvis (en cm), el espesor de los pliegues de la piel, y bioimpedancia, en base al principio que una masa delgada transmite mejor electricidad mejor que una masa gorda.

El término "operablemente enlazado", como se usa en la presente, se refiere a la relación funcional y la ubicación de una secuencia promotora con respecto a un polinucleótido de interés (por ejemplo, un promotor o intensificador está operablemente enlazado a una secuencia codificadora si afecta la transcripción de la secuencia). En general, un promotor operablemente enlazado es contiguo a la secuencia de interés. Sin embargo, un intensificador no tiene que estar contiguo a la secuencia de interés para controlar su expresión.

Los términos "portador farmacéuticamente aceptable", "diluyente farmacéuticamente aceptable", "excipiente farmacéuticamente aceptable" o "vehículo farmacéuticamente aceptable", usados de manera indistinta en la presente, se refieren a un agente de relleno, diluyente, material encapsulante o formulación, sólidos, semisólidos o

líquidos, no tóxica auxiliar de cualquier tipo convencional. Un portador farmacéuticamente aceptable esencialmente no es tóxico a los receptores a las dosis empleadas y concentraciones empleadas y es compatible con los otros ingredientes de la formulación. El número y la naturaleza de los portadores farmacéuticamente aceptables dependen de la forma deseada de administración. Los portadores farmacéuticamente aceptables se conocen y se pueden preparar por métodos bien conocidos en la técnica. Ver Faulí i Trillo C, "Tratado de Farmacia Galénica" (Ed. Luzán 5, S.A., Madrid, ES, 1993) y Gennaro A, Ed., "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" 20ª edición (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, US, 2003).

El término "promotor", como se usa en la presente, se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de uno o más polinucleótidos, localizados en la dirección 5' de las secuencias de polinucleótido, y que se identifican de manera estructural por la presencia de un sitio de unión para la ARN-polimerasa dependiente de ADN, sitios de inicio de transcripción, y cualquier otra secuencia de ADN incluyendo, pero no limitado a, sitios de unión a factor de transcripción, represores, y sitios de unión a proteína activadora, y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocida en la técnica que actúe directamente o de forma indirecta para regular la cantidad de

transcripción del promotor. Un promotor "específico de tejido" solo es activo en tipos específicos de tejidos o células diferenciadas.

El término "polinucleótido", como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico, ya sea ADN o ARN, que contiene desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos. El ácido nucleico puede ser de doble hebra, de hebra individual o contener porciones tanto de una secuencia de doble hebra como de hebra individual. El término "polinucleótido" incluye, pero no se limita a, secuencias de ácidos nucleico con la capacidad para codificar para un polipéptido y secuencias de ácido nucleico parcialmente o totalmente complementaria a un polinucleótido endógeno de la célula o sujeto tratado con esto de modo que después de la transcripción de este, genera una molécula de ARN (por ejemplo, microARN, ARNsh, ARNsi) capaz de hibridarse e inhibir la expresión del polinucleótido endógeno.

El término "región reguladora post-transcripcional", como se usa en la presente, se refiere a cualquier polinucleótido que facilite la expresión, estabilización o ubicación de las secuencias contenidas en el casete o el producto génico resultante.

Los términos "prevenir", "que previene" y "prevención", como se usa en la presente, se refieren a la inhibición del inicio o la disminución de la ocurrencia de

una enfermedad en un sujeto. La prevención puede ser completa (por ejemplo, la ausencia total de células patológicas en un sujeto) o parcial. La prevención también se refiere a una susceptibilidad reducida a una condición clínica.

El término "genoma viral recombinante", como se usa en la presente, se refiere a un genoma de AAV en el cual se inserta al menos un polinucleótido de casete de expresión extraño en el genoma de AAV que se presenta de forma natural.

El término "gen rep" o "gen rep de AAV", como se usa en la presente, se refiere a un gen que codifica para una proteína Rep. El término "proteína Rep", como se usa en la presente, se refiere a un polipéptido que tiene al menos una actividad funcional de una proteína Rep de AAV nativa (por ejemplo, Rep 40, 52, 68, 78). Una "actividad funcional" de una proteína Rep (por ejemplo, Rep 40, 52, 68, 78) es cualquier actividad asociada con la función fisiológica de la proteína, incluyendo la facilitación de la replicación de ADN a través del reconocimiento, unión y mellado del origen de AAV de replicación de ADN así como la actividad de ADN-helicasa. Las funciones adicionales incluyen modulación de la transcripción de promotores de AAV (u otros heterólogos) y la integración específica del sitio del ADN de AAV en un cromosoma hospedador.

El término "sujeto", como se usa en la presente, se refiere a un individuo, planta o animal, tal como seres

humanos, un primate no humano (por ejemplo chimpancés y otras especies de monos y changos), un animal de granja (por ejemplo, aves, peces, ganado, ovejas, cerdos, cabras y caballos), un mamífero doméstico (por ejemplo, perros y gatos), o un animal de laboratorio (por ejemplo, roedores, tal como ratones, ratas y cobayos). El término no denota ninguna edad ni género particular. El término "sujeto" abarca un embrión y un feto.

El término "sistémicamente administrado" y "administración sistémica", como se usa en la presente, significa que los polinucleótidos, vectores, polipéptidos, o composiciones farmacéuticas de la invención se administran a un sujeto de una manera no localizada. La administración sistémica de los polinucleótidos, vectores, polipéptidos, o composiciones farmacéuticas de la invención puede alcanzar varios órganos o tejidos a todo lo largo del cuerpo del sujeto, o puede alcanzar órganos o tejidos específicos del sujeto. Por ejemplo, la administración intravenosa de una composición farmacéutica de la invención puede dar por resultado la transducción de más de un tejido u órgano en un sujeto.

El término "región reguladora transcripcional", como se usa en la presente, se refiere a un fragmento de ácido nucleico capaz de regular la expresión de uno o más genes. Las regiones reguladoras de los polinucleótidos de la

invención incluyen un promotor y un intensificador.

El término "transducir" o "transducción", como se usa en la presente, se refiere a un proceso por el que se introduce una secuencia de nucleótidos extraña en una célula mediante un vector viral.

El término "transfección", como se usa en la presente, se refiere a la introducción de ADN en una célula eucariótica receptora.

El término "tratar" o "tratamiento", como se usa en la presente, se refiere a la administración de un compuesto o composición de la invención para controlar el progreso de una enfermedad después de han aparecido sus signos clínicos. El control del progreso de la enfermedad, se entiende que significa los resultados clínicos benéficos o deseados que incluyen, pero no se limitan a, reducción de los síntomas, reducción de la duración de la enfermedad, estabilización de estados patológicos (específicamente para evitar deterioro adicional), retraso del progreso de la enfermedad, mejora del estado patológico, y remisión (tanto parcial como total). El control del progreso de la enfermedad también comprende una extensión de la supervivencia, en comparación con la supervivencia esperada si no se aplica el tratamiento.

El término "diabetes tipo 2", como se usa en la presente, se refiere a una enfermedad caracterizada por un incremento inapropiado en los niveles de glucosa en sangre.

La hiperglicemia crónica de diabetes está asociada con daño, disfunción y falla a largo plazo de diferentes órganos, lo que conduce a una variedad de complicaciones tal como retinopatía, nefropatía, y neuropatía periférica. La diabetes tipo 2 se provoca por resistencia a insulina en tejidos periféricos (principalmente músculo esquelético, tejido adiposo, e hígado) y respuesta inapropiada de secreción compensatoria de insulina, debido a la combinación de función y masa disminuida de células β. Además de incrementar la concentración de glucosa, la acción fallida de la insulina se traduce frecuentemente en un incremento en los niveles de colesterol o triglicéridos.

El término "vasculogénesis", como se usa en la presente, se refiere a la formación, desarrollo, crecimiento o proliferación de vasos sanguíneos derivado de células no diferenciadas o subdiferenciadas.

El término "vector", como se usa en la presente, se refiere a una construcción capaz de distribuir, y opcionalmente expresar, uno o más polinucleótidos de interés en una célula hospedadora. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ARN o ADN desnudo, plásmido, vectores de cósmido o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes condensadores catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas, y ciertas células

eucarióticas, tal como células productoras. Los vectores pueden ser estables y pueden ser auto-replicantes. No hay limitaciones con respecto al tipo de vector que se puede usar. El vector puede ser un vector de clonación, adecuado para la propagación y para obtener polinucleótidos, construcciones génicas o vectores de expresión incorporados a varios organismos heterólogos. Los vectores adecuados incluyen vectores procarióticos de expresión (por ejemplo pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados), mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIE1, pCR1, RP4, fagos y vectores de trasposición (por ejemplo pSA3 y pAT28), y vectores eucarióticos de expresión basados en vectores virales (por ejemplo, adenovirus, virus adeno-asociados así como retrovirus y lentivirus), así como vectores no virales tal como pSilencer 4.1-CMV (Ambion^{MR}, Life Technologies Corp., Carslbad, CA, US), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAXI, pZeoSV2, pCI, pSVL y pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1.

El término "VEGF", como se usa en la presente, significa factor de crecimiento endotelial vascular. "VEGF" incluye, pero no se limita a, las variantes A, B, C, D, E, y F de VEGF. Ver Hamawy A, *et al.*, Curr. Opin. Cardiol. 1999; 14:515-522, Neufeld G, *et al.*, Prog. Growth Factor Res. 1994; 5:89-97, Olofsson B. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 1996;

93:2576-2581, Chilov D, *et al.*, J. Biol. Chem. 1997; 272:25176-25183, y Olfsson B, *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 1999; 10:528-535. La variante A de VEGF, incluye, pero no se limita a, las isoformas $VEGF_{164}$, $VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$, $VEGF_{167}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{189}$, y $VEGF_{206}$. Ver Tischer E, *et al.*, J. Biol. Chem. 1991; 266:11947-11954 y Poltorak Z, *et al.*, J. Biol. Chem. 1997; 272:7151-7158. El término "VEGF" también incluye el factor de permeabilidad vascular o vasculotropina (VPF). Ver Keck P. *et al.*, Science 1989; 246:1309-1312 y Senger D, *et al.*, Science 1983; 219: 983-985. Actualmente el VPF se conoce en la técnica como VEGF A. También se pueden usar otros miembros de la familia de VEGF, incluyendo factores de crecimiento placentario PIGF I y II. Las secuencias de VEGF adecuados están fácilmente disponibles (por ejemplo National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ junio 2012). Por ejemplo, los locus para los miembros de la familia de VEGF humanos incluyen VEGF-A-P15692 y NP003367; VEGF-B-NP003368, P49765, AAL79001, AAL79000, AAC50721, AAB06274, y AAH08818; VEGF-C-NP005420, P49767, S69207, AAB36425, y CAA63907; VEGF-D-NP004460, AAH27948, O43915, CAA03942, y BAA24264; VEGF-E-AAQ88857; VEGF-F-2VPFF; PIGF-1-NP002623, AAH07789, AAH07255, AAH01422, P49763, CAA38698, y CAA70463; construcciones sintéticas de cadena A-1FZVA y cadena B-1FZVB de PIGF-1; y PGF-2-AAB25832 y AAB30462. De manera preferente, VEGF es de

origen humano. Sin embargo, también se pueden usar VEGF de otras especies, tal como ratón, de acuerdo a la invención.

El término "célula de tejido adiposo blanco" o "adipocito blanco" como se usa en la presente, se refiere al tipo de adipocito que es poliédrico a esférico y que contiene una gran gota de lípida "unilocular" circundada por una capa delgada de citoplasma. El núcleo de estas células está aplanado y se localiza en la periferia. El diámetro de los adipocitos blancos es variable, variando entre 30 y 70 µm de acuerdo al sitio de depósito. La grasa almacenada está en un estado semi-líquido, y se compone principalmente de triglicéridos y éster de colesterilo. Los adipocitos blancos segregan muchos péptidos y proteínas colectivamente conocidos como adipocinas, tal como resistina, adiponectina y leptina.

El término "elemento regulador post-transcripcional de virus de hepatitis de la marmota" o "WPRE", como se usa en la presente, se refiere a una secuencia de ADN que, cuando se transcribe, crea una estructura terciaria capaz de mejorar la expresión de un gen. Ver Lee Y, *et al.*, Exp. Physiol. 2005; 90(1):33-37 y Donello J, *et al.*, J. Virol, 1998; 72(6):5085-5092.

El término "micro ARN" o "miARN", como se usa en la presente, son ARN reguladores, evolutivamente conservados, pequeños (~22-nt), comprendidos en la lentificación génica mediada por ARN al nivel post-transcripcional. Ver Bartel

DP. Cell 2004; 116: 281-297. A través del apareamiento de bases con regiones complementarias (más frecuentemente en la región 3'-no traducida (3'UTR) de ARN mensajero celular (ARNm)), los miARN pueden actuar para suprimir la traducción de ARNm, o en la homología de alta secuencia, provocan la degradación catalítica de ARNm. Debido a la expresión de tejido altamente diferencial de muchos miARN, los miARN celulares se pueden aprovechar para mediar la dirección a diana específica de tejido de los vectores de terapia génica. Al manejar en tándem copias de elementos diana perfectamente complementarios a los miARN específicos de tejido (miRT) dentro de vectores lineales, se puede inhibir de manera eficiente la expresión transgénica en tejidos indeseados.

2. Vectores virales adeno-asociados que proporcionan expresión específica de tejido adiposo

En un primer aspecto, la invención se refiere a un vector viral adeno-asociado (AAV) que comprende un genoma viral recombinante en donde el genoma viral recombinante comprende un casete de expresión que comprende una región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo operativamente enlazada a un polinucleótido de interés.

El AAV de acuerdo a la presente invención incluye cualquier serotipo de los 42 serotipos de AAV conocidos. En general, los serotipos de AAV tienen secuencias genómicas con una homología significativa a nivel de aminoácidos y ácidos

nucleicos, proporcionan una serie idéntica de funciones genéticas, producen viriones que son esencialmente equivalentes en términos físicos y funcionales, y se replican y montan a través de mecanismos prácticamente idénticos. En particular, el AAV de la presente invención puede corresponder al serotipo 1 de AAV (AAV1), AAV2, AAV3 (incluyendo tipos 3A y 3B), AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV aviar, AAV bobino, AAV canino, AAV equino, AAV ovino, y cualquier otro AAV. Los ejemplos de las secuencias del genoma de los diferentes serotipos de AAV se pueden encontrar en la literatura o en bases de datos públicas tal como GenBank. Ver los números de acceso de GenBank AF028704.1 (AVV6), NC006260 (AAV7), NC006261 (AAV8), y AX753250.1 (AAV9). En una modalidad preferida, el vector viral adeno-asociado de la invención es de un serotipo seleccionado del grupo que consiste de los serotipos AAV6, AAV7, AAV8, y AAV9.

El genoma del AAV de acuerdo a la invención comprende típicamente las secuencias de repetición terminales invertidas 5' y 3' cis-actuantes y un casete de expresión. Ver Tijsser P, Ed., "Handbook of Parvoviruses" (CRC Press, Boca Raton, FL, US, 1990, pp. 155-168). Las secuencias de ITR son de aproximadamente 145 bp de longitud. De manera preferente, sustancialmente las secuencias completas que codifican para las ITR se usan en la molécula, aunque es

permisible algún grado de modificación menor de estas secuencias. Los procedimientos para modificar estas secuencias de ITR se conocen en la técnica. Ver Brown T, "Gene Cloning" (Chapman & Hall, Londres, GB, 1995), Watson R, *et al.*, "Recombinant DNA", 2a. Ed. (Scientific American Books, Nueva York, NY, US, 1992), Alberts B, *et al.*, "Molecular Biology of the Cell" (Garland Publishing Inc., Nueva York, NY, US, 2008), Innis M, *et al.*, Eds., "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications" (Academic Press Inc., San Diego, CA, EUA, 1990), Erlich H, Ed., "PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification" (Stockton Press, Nueva York, NY, US, 1989), Sambook J, *et al.*, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold, Spring Harbor, NY, US, 1989), Bishop T, *et al.*, "Nucleic Acid and Protein Sequence. A Practical Approach" (IRL Press, Oxford, GB, 1987), Reznikoff W, Ed., "Maximizing Gene Expression" (Butterworths Publishers, Stoneham, MA, US, 1987), Davis L, *et al.*, "Basic Methods in Molecular Biology" (Elsevier Science Publishing Co., Nueva York, NY, US, 1986), y Schleef M. Ed., "Plasmid for Therapy and Vaccination" (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, DE, 2001). En una modalidad preferida, el genoma recombinante de AAV comprende las ITR de AAV 5' y 3'. En otra modalidad, las ITR de doble AAV 5' y 3' se derivan de AAV2. En aún una modalidad más preferida, el

genoma recombinante de AAV carece del cuadro de lectura abierto *rep* o el cuadro de lectura abierto *cap*. En una modalidad, las ITR de AAV2 se seleccionan para generar un AAV pseudotipificado (es decir, un AAV que tiene una cápsida y las ITR derivadas de diferentes serotipos).

El polinucleótido de la invención puede comprender las ITR derivadas de cualquiera de los serotipos de AAV. En una modalidad preferida, las ITR se derivan del serotipo AAV2.

El AAV de la invención comprende una cápsida de cualquier serotipo. En una modalidad particular, la cápsida se deriva del AAV del grupo que consiste de AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 y AAV9. En una modalidad preferida, el AAV de la invención comprende una cápsida derivada de los serotipos AAV8 o AAV9. En una modalidad adicional preferida, la secuencia VP1 de la cápsida de AAV tiene SEQ ID NO: 18. Ver número de acceso de GenBank AY530579.

En algunas modalidades, un Cap de AAV para el uso en el método de la invención se puede generar por mutagénesis (es decir por inserciones, supresiones o sustituciones) de uno de los Cap de AAV mencionados anteriormente o su ácido nucleico codificador. En algunas modalidades, el Cap de AAV es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% o más similar a uno o más de los Cap de AAV mencionados anteriormente.

En algunas modalidades, el Cap de AAV es quimérico, que comprende dominios de dos, tres, cuatro o más de los Cap de AAV mencionados anteriormente. En algunas modalidades, el Cap de AAV es un mosaico de monómeros VP1, VP2, y VP3 que se originan de dos o tres diferentes AAV o un AAV recombinante. En algunas modalidades, una composición de rAAV comprende más de uno de los Cap mencionados anteriormente.

En algunas modalidades, un Cap de AAV para el uso en una composición de rAAV se maneja para contener una secuencia heteróloga u otra modificación. Por ejemplo, una secuencia peptídica o proteínica que confiere selección selectiva de diana o evasión inmunitaria se puede manejar en una proteína Cap. De manera alternativa o adicionalmente, el Cap se puede modificar químicamente de modo que la superficie del rAAV se polietilen-glicolise (es decir, pegilado), que puede facilitar la evasión inmunitaria. La proteína Cap también se puede mutagenizar (por ejemplo, para remover su unión al receptor natural o para enmascarar un epítopo inmunogénico).

En otra modalidad particular, el vector AAV es un vector AAV pseudotipificado (es decir, el vector comprende secuencias o componentes que se originan de al menos dos distintos serotipos de AAV). En una modalidad particular, el vector de AAV pseudotipificado comprende un genoma de AAV derivado de un serotipo de AAV (por ejemplo, AAV2), y una

cápsida derivada al menos en parte de un distinto serotipo de AAV. Los ejemplos específicos de estos vectores AAV pseudotipificados incluyen, sin limitación, vectores que comprenden un genoma derivado de cualquier serotipo de AAV (por ejemplo, de AAV1 a AAV11), en una cápsida derivada de AAV6, AAV7, AAV8, o AAV9.

En una modalidad, el vector de AAV contiene un promotor con la adición de al menos una secuencia diana de al menos un miARN que se puede seleccionar de la siguiente lista: miR122 (número de acceso a base de datos miRBase MI0000442), miR152 (MI0000462), miR199 (MI0000242), miR215 (MI0000291), miR192 (MI0000234), miR148a (MI0000253), miR194 (MI0000488), miR1 (MI0000651), miRT133 (MI0000450), miR1206 (MI0000490), miR208 (MI0000251), miR124 (MI0000443), miR125 (MI0000469), miR216 (MI0000292), miR130 (MI0000448). Las referencias de secuencias se han obtenido de miRBase (http://www.mirbase.org/, de acuerdo a la versión de 31/07/2013).

En una modalidad, el vector de AAV contiene un promotor con la adición de al menos una secuencia diana de miARN que se puede seleccionar de la siguiente lista:

Lista 1

miRT122a(5'CAAACACCATTGTCACACTCCA3'),

miRT152(5'AGTCACGTACTGTCTTGAACC3'),

miR199a-5p(5'GGGTCACAAGTCTGATGGACAAG3'),

miR99a-3p(5'TGTCATCAGACGTGTAACCAAT3'),

miRT215(5' TACTGGATACTTAACTGTCTG3'),

miRT192(5'GGCTGTCAATTCATAGGTCAG3'),

miRT194(5'ACATTGTCGTTGAGGTACACCT3'),

miRT1(5'TTACATACTTCTTTACATTCCA3'),

mirT148(5'AGTCACGTGATGTCTTGAAACA3'),

miRT133a(5'AAACCAGGGGAAGTTGGTCGAC3'),

miRT206(5'ACCTTACATTCCTTCACACACC3'),

miRT124(5'ATTCCGTGCGCCACTTACGG3'),

miRT125(5'AGGGACTCTGGGAAATTGGACACT3'),

miRT216(5'ATTAGAGTCGACCGTTGACACT3'),

miRT130(5'GTCACGTTACAATTTTCCCGTA3').

En una modalidad, el vector de AAV contiene un promotor con la adición de al menos una secuencia diana de miARN que tiene una homología de 85% con una secuencia diana de miARN seleccionada de la lista 1 mencionada anteriormente.

En una modalidad, el vector de AAV contiene un promotor con la adición de al menos una secuencia diana de miARN que tiene una homología de 70% con una secuencia diana de miARN seleccionada de la lista 1 mencionada anteriormente.

En una modalidad, el vector de AAV contiene un promotor con la adición de al menos una secuencia diana de miARN que es un equivalente funcional con una secuencia diana de miARN seleccionada de la lista 1 mencionada anteriormente. En este caso, el término equivalente funcional significa

cualquier secuencia de nucleótidos capaz de unirse a los mismos miARN que se une a la secuencia original. Por ejemplo, un equivalente funcional de miRT122a es cualquier secuencia que híbrida con los mismos miARN que hibridizarán con miRT122a.

La secuencia de nucleótidos del equivalente funcional retiene la actividad biológica pertinente de una secuencia mirT de referencia. Esto significa que un equivalente funcional de un mirT tendrá la capacidad para inhibir la expresión transgénica en tejidos indeseados, de la misma manera como lo hace la secuencia mirT de referencia.

En otra modalidad particular, la secuencia diana de miARN se puede seleccionar de mirT122a (5'CAAACACCATTGTCACACTCCA3') referida como SEQ ID NO: 19 o mirT1 (5'TTACATACTTCTTTACATTCCA3') referida como SEQ ID NO: 20.

La región reguladora transcripcional puede comprender un promotor, y opcionalmente, una región intensificadora. De manera preferente, el promotor es específico para tejido adiposo. El intensificador no necesita ser específico para tejido adiposo. De manera alternativa, la región reguladora transcripcional puede comprender un promotor específico de tejido adiposo y un intensificador específico de tejido adiposo.

En una modalidad, el promotor específico de tejido

es un promotor específico de adipocitos tal como por ejemplo, la proteína 2 de adipocito (aP2, también conocida como proteína 4 de unión a ácido graso (FABP4)), el promotor PPARγ, el promotor de adiponectina, el promotor de fosfoenolpiruvato-carboxicinasa (PEPCK), el promotor derivado de citocromo p450 de aromatasa de humano (p450arom), o el promotor Foxa-2. Ver Graves R, *et al.*, Genes Dev. 1991; 5:428-437, Ross S, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 1990; 87:9590-9594, Simpson E, *et al.*, US 5,446,143, Mahendroo M, *et al.*, J. Biol. Chem. 1993; 268:19463-19470, Simpson E, *et al.*, Clin. Chem. 1993; 39:317-324, y Sasaki H, *et al.*, Cell 1994; 76: 103-115. En una modalidad preferida, la región intensificadora se selecciona del grupo que consiste del intensificador aP2 específico de adipocito y el intensificador UCP1 de adipocito.

En una modalidad preferida, la región reguladora específica de tejido adiposo del AAV de acuerdo a la invención comprende el intensificador aP2 específico de adipocito y el intensificador aP2 basal. Ver Rival Y, *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 2004: 311(2):467-475. La región que comprende el intensificador aP2 específico de adipocito y el promotor aP2 basal también se conoce como "región reguladora mini/aP2" y se forma por el promotor basal del gen aP2 y el intensificador específico del adipocito del gen aP2. De manera preferente, el promotor aP2 es murino.

Ver Grave R, *et al.*, Mol. Cell Biol. 1992; 12(3):1202-1208 y Ross S, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 1990; 87:9590-9594. En una modalidad particular, la región reguladora mini/aP2 tiene la secuencia SEQ ID NO: 2.

En otra modalidad preferida, la región reguladora específica de tejido adiposo del AAV de acuerdo a la invención comprende el intensificador UCP1 específico de adipocito y el promotor UCP1 basal. Ver del Mar González-Barroso M, *et al.*, J. Biol. Chem. 2000; 275(41): 31722-31732 y Rim J, *et al.*, J. Biol. Chem. 2002; 277(37):34589-34600. La región que comprende el intensificador UCP1 específico de adipocito y el promotor UCP1 basal también se conoce como "región reguladora mini/UCP" y se refiere a una combinación del promotor basal del gen UCP1 y el intensificador específico de adipocito de gen UCP1. De manera preferente, se usa un promotor UCP1 de rata. Ver Larose M, *et al.*, J. Biol. Chem. 1996; 271(49):31533-31542 y Cassard-Doulcier A, *et al.*, Biochem. J. 1998; 333:243-246. En otra modalidad particular, la región reguladora mini/UCP1 tiene la secuencia SEQ ID NO: 3.

En otra modalidad, el casete de expresión que forma parte del AAV de la invención comprende además secuencias de control de expresión que incluyen, pero no se limitan a, secuencias apropiadas de transcripción (es decir, inicio, terminación, promotor e intensificador), y señales eficientes

de procesamiento de ARN (por ejemplo, señales de empalme y poliadenilación (poliA)), secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico, secuencias que mejoran la eficiencia de traducción (es decir secuencia de consenso Kozak), secuencias que mejoran la estabilidad de proteína y cuando se desea, secuencias que mejoran la secreción del producto codificado. Un gran número de secuencias de control de expresión, incluyendo promotores que son nativos, constitutivos, inducibles o específicos de tejido se conocen en la técnica y se pueden utilizar de acuerdo a la presente invención.

En otra modalidad, el casete de expresión que forma parte del AAV de la invención comprende además una región reguladora post-transcripcional. En una modalidad preferida, la región reguladora post-transcripcional es la región post-transcripcional del virus de hepatitis de la marmota (WPRE) o variantes funcionales y fragmentos de esto y el PPT-CTS o variantes funcionales y fragmentos de esto. Ver Zufferey R, *et al.*, J. Virol. 1999; 73:2886-2892 y Kappes J, *et al.*, WO 2001/04481. En una modalidad particular, la región reguladora post-transcripcional es WPRE.

El casete de expresión que forma parte del AAV de la invención comprende un "polinucleótido de interés". En una modalidad preferida, el polinucleótido de interés codifica para una proteína que actúa de manera sistémica. En otra modalidad, el polinucleótido de interés codifica para

una proteína que actúa en o en la vecindad de un adipocito. En una modalidad preferida, la proteína que actúa en o en la vecindad del adipocito es hexocinasa (HK), incluyendo cualquiera de las cuatro isozimas HK mamíferas (EC 2.7.1.1) que varían en ubicaciones sub-celulares y cinética con respecto a diferentes sustratos. A manera de ejemplo, HK incluye HK1 (números de acceso al GenBank NP000179, NP277031, NP277032, NP277033, NP277035), HK2 (número de acceso al GenBank NP000180), HK3 (número de acceso al GenBank NP002106) y HK4 o glucosinasa (números de acceso al GenBank NP000153, NP277042, NP277043). En otra modalidad preferida, la HK es glucocinasa que se usa en la presente de manera indistinta con hexocinasa 4 o HK4 y se refiere a una isoforma de hexocinasa con una Km para glucosa 100 veces mayor que HK1, HK2, o HK3.

En una modalidad, la proteína que actúa sobre o en la vecindad del adipocito es una fosfatasa alcalina (AP), incluyendo pero no limitado a, el tipo intestinal o IAP (número de acceso al GenBank NP001622), el tipo placentario o PLAP (número de acceso al GenBank NP001623), y la isozima no específica de tejido o ALPL (números de acceso al GenBank NP000469, NP001120973.2. y NP001170991.1). En otra modalidad, la proteína que actúa sobre o en la vecindad del adipocito es VEGF que incluye, pero no se limita a, las variantes A, B, C, D, E y F de VEGF.

En otra modalidad, el polinucleótido de interés codifica para un polipéptido que normalmente se produce y se segrega por los adipocitos. En otra modalidad, el polipéptido que se produce y segrega por los adipocitos es una adipsina (por ejemplo especialmente una adipsina que es un homólogo de serina-proteasa), adiponectina, leptina, resistina, o un producto de proteína del gen ob.

Aún otros polinucleótidos útiles de interés incluyen aquellos que codifican para hormonas y factores de crecimiento y diferenciación que incluyen, sin limitación, insulina, glucagón, hormona de crecimiento (GH), hormona paratiroides (PTH), factor liberador de hormona de crecimiento (GRF), hormona estimuladora de folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriótica humana (hCG), angiopoyetinas, angiostatina, factor simulador de colonia de granulocitos (GCSF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácidos (aFGF), factor de crecimiento hepidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores I y II de crecimiento de insulina (IGF-1 y TGF-II), cualquiera de la superfamilia de factores de crecimiento transformante, incluyendo TGFa, activinas, inhibinas, o cualquiera de las proteínas morfogénicas oseas (BMP) BMP 1-15, cualquiera de la familia

de factores de diferenciación heregluina/neuregulina/ARIA/neu (NDF) de factores de crecimiento, factor de crecimiento de nervios (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de línea de células gliales (GDNF), neurturina, agrina, cualquiera de la familia de semaforinas/colapsinas, netrina-1 y netrina-2, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), efrinas, noggina, hedgehog sónico y tirosina-hidroxilasa.

Otros polinucleótidos útiles de interés incluyen aquellos que codifican para proteínas que regulan el sistema inmunitario incluyendo, sin limitación, citosinas y linfocinas tal como trombopoyetina (TPO), interleucinas (IL), IL-1 hasta IL-2 (por ejemplo IL-2, IL-4, IL-12 e IL-18), proteína quimioatrayente de monocitos, factor inhibidor de leucemia, factor estimulador de colonia de granulocitos-macrófagos, ligando Fas, factores α y β de necrosis tumoral, interferones α, β y γ, factor de células madre, ligando flk-2/flt3. Los productos génicos producidos por el sistema inmunitario también son útiles en la invención. Estos incluyen, sin limitación, inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena individual, receptores de células T, receptores quiméricos de células T, receptores de células T de cadena individual, moléculas MHC y HLA de clase I y clase

II, así como inmunoglobulinas manejadas y moléculas MHC y HLA. Los productos génicos útiles también incluyen proteínas reguladoras de complemento tal como proteínas reguladoras de complemento, proteína de co-factor de membrana (MCP), factor acelerador de descomposición (DAF), CR1, CF2, y CD59.

Aún otros polinucleótidos útiles de interés incluyen aquellos que codifican para cualquiera de los receptores para las hormonas, factores de crecimiento, citosinas, linfocinas, proteínas reguladoras y proteínas del sistema inmunitario. La invención abarca receptores para la regulación de colesterol o la modulación de lípidos, incluyendo el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL), receptor de lipoproteína de alta densidad (HDL), el receptor de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y receptores de eliminadores. La invención también abarca productos génicos tal como miembros de la superfamilia de receptores de hormonas esteroides incluyendo receptores del grupo corticoides y receptores de estrógeno, receptores de vitamina D, y otros receptores nucleares. Además, los productos génicos útiles incluyen factores de transcripción tal como jun, fos, max, mad, factor de respuesta sérica (SRF), AP1, AP2, myb, MyoD y miogenina, proteínas que contienen la secuencia ETS, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, proteínas que se unen a la secuencia CCAAT, factor de regulación de interferón

(IRF-1), proteína tumoral de Wilms, proteína que se une a ETS, STAT, proteínas que se unen a la secuencia GATA (por ejemplo, GATA-3), y la familia Forkhead de proteínas hélice con aletas.

Otros polinucleótidos útiles de interés incluyen aquellos que codifican para enzimas tal como carbamoil-sintetasa I, ornitina-transcarbamilasa, arginosuccinato-sintetasa, arginosuccinato-liasa, arginasa, fumarilacetacetato-hidrolasa, fenilalanina-hidroxilasa, antitripsina α-1, glucosa-6-fosfatasa, porfobilinogeno-desaminasa, cistationa-β-sintasa, descarboxilasa de cetoácido de cadena ramificada, albúmina, isovaleril-coA-deshidrogenasa, propionil-CoA-carboxilasa, metil-malonil-CoA-mutasa, glutaril-CoA-deshidrogenasa, insulina, β-glucosidasa, piruvato-carboxilaza, fosforilasa hepática, fosforilasa-cinasa, glicina-descarboxilasa, H-proteína, T-proteína o secuencia de regulador transmembrana de fibrosis quística (CFTR), y el producto génico de distrofina (por ejemplo una mini- o micro-distrofina). Aún otros productos génicos útiles incluyen enzimas útiles en la terapia de reemplazo tal como por ejemplo, enzimas que contienen mannosa-6-fosfato para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal (por ejemplo, un gen adecuado que codifica para β-glucuronidasa (GUSB)).

El límite del tamaño de envasado de los vectores de

AAV se limita al tamaño del genoma de AAV tipo silvestre de origen, que varía en tamaño en base al serotipo de AAV (es decir de 4,087 a 4,767). Ver Wu Z, et al., Mol. Ther. 2010; 7(1):80-86. Por ejemplo, el AAV-2 tipo silvestre tiene un tamaño de genoma de 4,679 y el AAV-6 tipo silvestre tiene un tamaño de genoma de 4,683. En algunas modalidades, la capacidad de clonación del vector de ARN recombinante se puede limitar y una secuencia codificadora deseada puede comprender el reemplazo completo del genoma de 4.8 kilobases del virus. Por lo tanto, los genes grandes pueden no ser adecuados para el uso en un vector de AAV recombinante normal, en algunos casos. El experto en la técnica apreciará que están disponibles opciones en la técnica para superar una capacidad codificadora limitada. Por ejemplo, las ITR del AAV de dos genomas pueden fijarse para formar concatémeros de cabeza a extremo, duplicando casi la capacidad del vector. La inserción de sitios de empalme permite la remoción de las ITR del transcripto. Otras opciones para superar una capacidad clonadora limitada serán evidentes para el experto en la técnica.

3. Métodos terapéuticos basados en el tropismo de AAV6, AAV7, AAV8 y AAV9 para el tejido adiposo

En un segundo aspecto, la presente invención describe vectores virales adeno-asociados de los serotipos AAV6, AAV7, AAV8 y AAV9 capaces de transducir de manera

eficiente células del tejido adiposo. Esta característica hace posible el desarrollo de métodos para el tratamiento de enfermedades que requieren o pueden beneficiarse de la expresión de un polinucleótido de interés en los adipocitos. En particular, este hallazgo facilita la administración de polipéptidos de interés a un sujeto en necesidad de lo mismo al administrar los vectores de AAV de la invención al paciente, generando de este modo adipocitos capaces de expresar el polinucleótido de interés y su polipéptido codificado in vivo. Si el polipéptido codificado es un polipéptido segregado, se puede segregar por los adipocitos, permitiendo la administración sistémica del polipéptido de esta manera.

De esta manera, en otra modalidad, la invención proporciona un vector viral adeno-asociado que comprende un genoma viral recombinante en donde el genoma viral recombinante comprende un casete de expresión que comprende una región reguladora transcripcional operativamente enlazada a un polinucleótido de interés en donde el serotipo de AAV se selecciona del grupo que consiste de AAV6, AAV7, AAV8 y AAV9 para el uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad que requiere la expresión del polinucleótido de interés.

En otra modalidad, la invención proporciona un vector viral adeno-asociado que comprende un genoma viral recombinante en donde el genoma viral recombinante comprende

un casete de expresión que comprende una región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo operativamente enlazada a un polinucleótido de interés para el uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad que requiere la expresión del polinucleótido de interés.

En otra modalidad, la invención proporciona un método para el tratamiento o prevención de una enfermedad que requiere la expresión del polinucleótido de interés en un sujeto que comprende la administración al sujeto de un vector viral adeno-asociado que comprende un genoma viral recombinante en donde el genoma viral recombinante comprende un casete de expresión que comprende la región reguladora transcripcional operativamente enlazada a un polinucleótido de interés en donde el serotipo de AAV se selecciona del grupo que consiste de AAV6, AAV7, AAV8 y AAV9.

En otra modalidad, la invención proporciona un método para el tratamiento o prevención de una enfermedad que requiere la expresión de un polinucleótido de interés en un sujeto que comprende la administración al sujeto de un vector viral adeno-asociado que comprende un genoma viral recombinante en donde el genoma viral recombinante comprende un casete de expresión que comprende una región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo operativamente enlazada a un polinucleótido de interés.

El AAV para el uso en el método terapéutico de la

invención comprende un casete de expresión que comprende un polinucleótido de interés y una región reguladora transcripcional. La región reguladora transcripcional puede comprender un promotor, y opcionalmente, una región intensificadora.

En una modalidad, la región reguladora transcripcional permite la expresión constitutiva del polinucleótido de interés. Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen, sin limitación, el promotor LTR del virus de sarcoma de Rous (RSV), retroviral (opcionalmente con el intensificador de RSV), el promotor de citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el intensificador de CMV), el promotor SV40, el promotor de dihidrofoliato-reductasa, el promotor de β-actina, el promotor de fosfoglicerol-cinasa (PGK) y el promotor EF1a. Ver Boshart M, et al., Cell 1985; 41:521-530.

En otra modalidad, la región reguladora transcripcional comprende el promotor de β-actina. El promotor de β-actina se puede derivar de cualquier mamífero, incluyendo humano y roedor, o ave, incluyendo pollos. De manera preferente, se usa β-actina de pollo.

En aún otra modalidad, la región reguladora transcripcional comprende además una región intensificadora. De manera preferente, la región intensificadora es la región intensificadora de CMV.

En una modalidad particular, la región reguladora es una región reguladora de CAG. En una modalidad preferida, la región reguladora transcripcional de CAG tiene la SEQ ID NO: 1.

En otra modalidad, la región reguladora transcripcional es una región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo.

Si el promotor es específico para tejido adiposo, entonces el intensificador no necesita ser específico tampoco para el tejido adiposo. De manera alternativa, la región reguladora transcripcional puede comprender un promotor específico de tejido adiposo y un intensificador específico de tejido adiposo.

En una modalidad, el promotor específico de tejido es un promotor específico de adipocitos tal como por ejemplo, la proteína 2 de adipocito (aP2, también conocida como el promotor de proteína 4 de unión a ácido graso (FABP4)), el promotor PPARγ, el promotor de adiponectina, el promotor de fosfoenolpiruvato-carboxicinasa (PEPCK), el promotor derivado de citocromo p450 de aromatasa de humano (p450arom), y el promotor Foxa-2. Ver Graves (1991), Ross (1990), Simpson (US 5,446,143), Mahendroo (1993), Simpson (1993), y Sasaki (1994), *supra*.

En una modalidad, la región intensificadora se selecciona del grupo que consiste del promotor aP2 específico

de adipocito y el intensificador UCP1 específico de adipocito.

En una modalidad preferida, la región reguladora específica de tejido adiposo del AAV de acuerdo a la invención comprende el intensificador aP2 específico de adipocito y el promotor aP2 murino basal. En una modalidad particular, la región reguladora mini/aP2 tiene la secuencia SEQ ID NO: 2.

En otra modalidad preferida, la región reguladora específica del tejido adiposo del AAV de acuerdo a la invención comprende el intensificador UCP1 específico de adipocito y el promotor UCP1 de rata, basal. En una modalidad particular, la región reguladora mini/UCP1 tiene la secuencia SEQ ID NO: 3.

En otra modalidad, el casete de expresión comprende adicionalmente una región reguladora post-transcripcional. En una modalidad preferida, la región reguladora post-transcripcional es WPRE o variantes y fragmentos funcionales de esto y el PPT-CTS o variantes funcionales y fragmentos de esto.

Otros polinucleótidos de interés adecuados se pueden vectorizar con el AAV de la invención y usar para el tratamiento o prevención de enfermedades. Ver Tabla 1.

Tabla 1

Polinucleótidos de interés

Enfermedades	Gen	Administración	Referencia
Artritis	Agonista de receptor de IL-1, proteína de fusión TNFR:Fc (etanercept), TGFβ1,	Sistemáticamente	Evans C, *et al.*, Arthritis Res. Ther. 2008, 10(110):515-526
Diabetes tipo 1	IL-2	Localmente	Goudy K, *et al.*, J. Immunol. 2011; 186(6):3779-3786
Diabetes tipo 2	Leptina, CNTF, LIF	Localmente o sistemáticamente	Zolotukhin S, *et al.*, WO 2001/094605
Diabetes tipo 2	Enzima 2 convertidora de angiotensina (ACE)	Sistemáticamente	Acton L, *et al.*, WO 2000/018899
Diabetes tipo 2	Proteína reguladora de glucocinasa (GKRP)	Sistemáticamente	Caplan S, *et al.*, US 20020065239
Alta presión sanguínea	Péptido natriurético atrial (ANP)	Sistemáticamente	Therrien J, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 2010; 107(3): 1178-1183
Alta presión sanguínea	Enzima convertidora de angiotensina antisentido de receptor tipo 1 de angiotensina, antisentido receptor β1-adrenérgico, antisentido	Sistemáticamente	Lu D, *et al.*, Hypertension 1997; 30:363-370 Phillips M, *et al.*, Braz. J. Med. Biol. Res. 2000; 33(6):715-721
Obesidad	Compuestos anti-angiogénicos (endostatina, angiostatina, bloqueo de VEGFR, bloqueo de PLGF	Localmente	Cao D, Nature Rev. 2010; 9:107-115
Diabetes tipo 2	Insulina	Localmente	Mudaliar S, et al., Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 2001; 30(4):935-982

Enfermedades	Gen	Administración	Referencia
Obesidad	BDNF	Sistemáticamente	During M, *et al.*, WO 2009/120978
Obesidad	BMP7	Localmente o Sistemáticamente	Tseng Y, *et al.*, Nature 2008;54(7207):1000-1004
Obesidad	FGF21	Localmente o Sistemáticamente	Xu J, *et al.*, Diabetes 2009; 58(I):250-259
Obesidad	Péptidos natriuréticos cardiacos (NP)	Localmente o Sistemáticamente	Bordicchia M, *et al.*, J. Clin. Invest. 2012; 122(3):1022-1036
Diabetes tipo 2	Hexocinasa o glucocinasa	Localmente	Otaegui P, *et al.*, FASEB J. 2003;17(14):2097-2099
Diabetes tipo 2	Hexocinasa o glucocinasa	Localmente	Muñoz S, *et al.*, Diabetologia 2010; 53(11):2417-2430
Diabetes tipo 2	GLP-1	Localmente	Di Pasquale G, *et al.*, PLoS One 2012; 7(7):e40074
Diabetes tipo 2	PRDM16	Localmente	Seale P, *et al.*, J. Clin. Invest. 2011; 121(1):96-105

El término "enfermedad que requiere la expresión de un polinucleótido de interés", como se usa en la presente, se refiere a cualquier enfermedad en la cual se desee la expresión del polinucleótido de interés. El polinucleótido de interés, como se describe en la presente, puede ser un gen que codifique para un polipéptido interés, o de manera alternativa, una secuencia de ácido nucleico que, cuando se transcribe, genera una molécula capaz de modular la expresión de un polinucleótido endógeno en una célula. De esta manera, la enfermedad que requiere la expresión del polinucleótido de interés puede ser una enfermedad en donde es deseable incrementar o disminuir los niveles de expresión de un gen.

Además, el polinucleótido de interés puede codificar para una proteína que se segrega y actúa de manera sistémica, o una proteína que actúa sobre o en la vecindad del adipocito. En una modalidad particular, la enfermedad que requiere la expresión de un polinucleótido de interés es una enfermedad que requiere la expresión de un polinucleótido de interés en tejido adiposo. De manera más preferente, en tejido adiposo blanco o en tejido adiposo café.

Los ejemplos de enfermedades que requieren la expresión de un polinucleótido de interés incluyen, pero no se limitan a, obesidad, hiperglicemia, resistencia a insulina, diabetes tipo 2, alta presión sanguínea, cáncer, enfermedades del corazón, enfermedades inmunitarias, artritis, enfermedades del sistema nervioso central y enfermedades relacionadas al envejecimiento.

El AAV de la invención se ha probado útil para la terapia génica de enfermedades asociadas a tejido adiposo, tal como la distribución de hexocinasa mediada por el AAV de la invención tanto en WAT como BAT para incrementar la captación de glucosa basal. Ver Figuras 2D y 4B. De esta manera, en una modalidad particular, la enfermedad que requiere la regulación de la expresión de un polinucleótido de interés es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste de obesidad, hiperglicemia, resistencia a insulina, diabetes tipo 2, y alta presión sanguínea.

Los genes de ejemplo y estados asociados de enfermedad incluyen, pero no se limitan a, insulina para el tratamiento de diabetes, CFTR para el tratamiento de fibrosis quística, factor IX para el tratamiento de hemofilia B, factor VIII para el tratamiento de hemofilia A, glucosa-6-fosfatasa, asociada con deficiencia tipo 1A de almacenamiento de glicógeno; fosfoenolpiruvato-carboxicinasa, asociada con deficiencia de Pepck; galactosa-1-fosfato-uridil-transferasa, asociada con galactosemia; fenilalanina-hidroxilasa, asociada con fenilcetonuria; α-cetoácido-deshidrogenasa de cadena ramificada, asociada con enfermedad urinaria de jarabe de arse; fumarilacetoacetato-hidrolasa, asociada con tirosinemia tipo 1, metilmalonil-CoA-mutasa, asociada con acidemia metilmalónica; acil-CoA-deshidrogenasa de cadena media, asociada con deficiencia de acetil-CoA de cadena media; ortinina-transcarbamilasa, asociada con deficiencia de ornitina-transcarbamilasa; sintetasa de ácido argininosuccínico, asociada con citrulinemia; proteína de receptor de lipoproteína de baja densidad, asociada con hipercolesterolemia familiar; UDP-glucouronosiltransferasa, asociada con la enfermedad de Crigler-Najjar; adenosina-desaminasa, asociada con enfermedad de inmunodeficiencia severa combinada; hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa, asociada con síndrome de Gout y Lesch-Nyan; biotimidasa, asociada con deficiencia de biotimidasa; β-

glucocerebrosidasa, asociada con enfermedad de Gaucher; β-glucuronidasa, asociada con síndrome Sly; proteína de membrana de peroxisoma 70 kDa, asociada con síndrome de Zellweger; porfobilinogeno-desaminasa, asociada con porfiria intermitente aguda; antripsina alfa-1 para el tratamiento de deficiencia de antitripsina alfa-1 (enfisema); eritropoyetina para el tratamiento de anemia debido a talasemia o a falla renal; factor de crecimiento endotelial vascular, angiopoyetina-1, y factor de crecimiento de fibroblastos para el tratamiento de enfermedades isquémicas; trombomodulina e inhibidor de ruta de factor de tejido para el tratamiento de vasos sanguíneos ocluidos como se ve, por ejemplo, en aterosclerosis, trombosis o embolias; descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC), y tirosina-hidroxilasa (TH) para el tratamiento de enfermedad de Parkinson; el receptor β-adrenérgico, anti-sentido a, o una forma mutante de, fosfolamban, la adenosina-trifosfatasa-2 de retículo sarco(endo)plásmico (SERCA2), y la adenilil-ciclasa cardiaca para el tratamiento de falla cardiaca congestiva; un gen supresor tumoral tal como p53 para el tratamiento de varios canceres; una citosina tal como una de las varias interleucinas para el tratamiento de trastornos inflamatorios inmunitarios y cáncer; distrofina o minidistrofina y utrofina o miniutrofina para el tratamiento de distrofias musculares; adenosina-desaminasa (ADA) para el tratamiento de deficiencia

de adenosida-desaminasa (ADA); huntingina (HTT) para el tratamiento de la enfermedad de Huntington; receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) o apolipoproteína B (APOB) para el tratamiento de hipercolesterolemia familiar; fenialanina-hidroxilasa (PAH), para el tratamiento de fenilcetonuria; enfermedad 1 de riñón poliquístico (PKD1) y enfermedad 2 de riñón poliquístico (PKD2) para el tratamiento de enfermedad de riñón poliquístico; TNFR:Fc para el tratamiento de artritis; AAT para el tratamiento de enfisema hereditario; Sarcoglicano para el tratamiento de distrofia muscular; GAD65 o GAD67 para el tratamiento de enfermedad de Parkinson, AAC para el tratamiento de la enfermedad de Canavan, CLN2 para el tratamiento de la enfermedad de Batten, NGF para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer; un antagonista de VEGF para el tratamiento de degeneración macular; IGF/HGF para el tratamiento de falla cardiaca congestiva, NGF para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central; y un anticuerpo neutralizante contra VIH para tratar VIH, infección por VIH o SIDA.

Los ejemplos de polinucleótidos de interés que se pueden distribuir por el AAV de la invención incluyen, pero no se limitan a, hexocinasa, glucocinasa, UCP2, UCP3, PPAR-α, leptina, receptor de leptina OB-Rb, y GLP-1. En una modalidad particular, el gen de interés se selecciona del grupo que consiste de hexocinasa (HK), glucocinasa (GK),

fosfatasa alcalina (AP), y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En una modalidad adicional, el AAV de la invención que comprende polinucleótidos que expresan hexocinasa o glucocinasa se administran en un sujeto en necesidad del mismo para el tratamiento o prevención de diabetes tipo 2. En otra modalidad adicional, el AAV de la invención que comprende polinucleótidos que expresan el factor de crecimiento endotelial vascular se administran a un sujeto en necesidad de esto para el tratamiento o prevención de obesidad.

Los ejemplos ilustrativos pero no limitantes de las enfermedades que se pueden tratar con el método de la invención incluyen obesidad, hiperglicemia, resistencia a insulina, diabetes tipo 2, alta presión sanguínea e hipertensión arterial. De manera preferente, la diabetes tipo 2 se puede tratar al expresar leptina ya sea en la vecindad de los adipocitos, o de manera sistémica, de modo que alcance el hipotálamo.

Adicionalmente, el AAV de la invención ha probado ser útil para el manejo genético de BAT, puesto que la administración intra-iBAT de $VEGF_{164}$ por AAV9-mini/UCP1 conduce a un incremento en los niveles de expresión de VEGF total y a un número incrementado de vasos en iBAT. Ver Figuras 4C-4F. Por lo tanto, en una modalidad particular, la invención se refiere a un AAV o una composición farmacéutica

de la invención para el uso del tratamiento o prevención de una enfermedad que requiere la expresión de VEGF tal como por ejemplo, una enfermedad cuyo manejo pueda beneficiarse de inducir la angiogénesis, arteriogénesis o vasculogénesis. Los ejemplos de enfermedades que requieren la expresión de VEGF incluyen, pero no se limitan a, heridas traumáticas y quirúrgicas agudas, quemaduras, escaldaduras, úlceras venosas, úlceras arteriales, yagas de presión (ulceras aka decubitus), úlceras diabéticas, heridas post-radiación, injertos de piel, úlceras de etiología mezclada y otras heridas crónicas o necróticas.

Adicionalmente, la administración intra-eWAT del gen hSeAP (es decir, fosfatasa alcalina segregada, derivada de placenta humana) con el vector viral AAV9-mini/aP2 conduce a un incremento sostenido en los niveles de circulación de hSeAP. Por lo tanto, en una modalidad particular, la invención se refiere a un AAV o una composición farmacéutica de la invención para el uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad que requiere la expresión de AP tal como por ejemplo, una enfermedad exacerbada o mediada por LPS (es decir, lipopolisacárido). Los ejemplos de enfermedades que requieren la expresión de AP incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de intestino inflamatorio, sepsis, o choque séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), meningococcemia, choque hemorrágico traumático, lesiones por

zumbidos, cirugía cardiovascular o derivación cardiopulmonar, cirugía de hígado o trasplante de hígado, enfermedad de hígado, pancreatitis, enterocolitis necrotizante, enfermedad periodontal, pneumonía, fibrosis quística, asma, enfermedad cardiaca coronaria, falla cardiaca congestiva, enfermedad renal, síndrome urémico hemolítico, diálisis de riñón, cáncer, enfermedades de Alzheimer y enfermedades auto inmunitarias tal como artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.

4. Métodos para transducir células in vitro

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para transducir células *in vitro* al usar los vectores de AAV de la invención. De esta manera, la presente invención se refiere también a un método para transducir células *in vitro* que comprende poner en contacto estas células con un AAV que comprende un genoma viral recombinante en donde el genoma viral recombinante comprende un casete de expresión que comprende una región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo operativamente enlazada a un polinucleótido de interés.

En una modalidad preferida, el vector viral adeno-asociado, usado en el método para transducir células *in vitro* tiene un serotipo seleccionado del grupo que consiste de AAV6, AAV7, AAV8, y AAV9. En otra modalidad, las ITR del virus adeno-asociado son AAV2 ITR.

En otra modalidad, el vector viral adeno-asociado comprende una región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo. En aún otra modalidad, la región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo comprende una región promotora seleccionada del grupo que consiste del promotor aP2 murino basal y el promotor UCP1 de rata, basal. En aún en otra modalidad, la región reguladora transcripcional específica de tejido comprende una región intensificadora operativamente enlazada a la región promotora. En aún otra modalidad, la región intensificadora se selecciona del grupo que consiste del intensificador aP2 específico de adipocitos y el intensificador UCP1 específico de adipocitos. En aún una modalidad más preferida, la región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo se selecciona del grupo que consiste de:

i) un polinucleótido que comprende el intensificador aP2 específico de tejido y el promotor aP2 murino basal, y

ii) un polinucleótido que comprende el intensificador UCP1 específico de adipocito y el promotor UCP1 de rata basal.

En otra modalidad, el casete de expresión comprende además una región reguladora post-transcripcional. En aún otra modalidad, la región reguladora post-transcripcional es WPRE.

En otra modalidad, el polinucleótido de interés codifica para una proteína que se selecciona del grupo que consiste de una proteína segregada que actúa de manera sistémica y una proteína que actúa sobre o en la vecindad del adipocito. En una modalidad aún más preferida, el polinucleótido de interés codifica para una proteína seleccionada del grupo que consiste de hexocinasa, glucocinasa, fosfatasa alcalina y factor de crecimiento endotelial vascular.

En otra modalidad, la invención se refiere a un método para transducir células *in vitro* con AAV que comprende un genoma viral recombinante en donde el genoma viral recombinante comprende un casete de expresión que comprende la región reguladora transcripcional operativamente enlazada a un polinucleótido de interés en donde el serotipo del AAV se selecciona del grupo que consiste de AAV6, AAV7, AAV8, y AAV9.

En una modalidad, las ITR del virus adeno-asociado son AAV2 ITR.

En otra modalidad, el vector viral adeno-asociado comprende un genoma recombinante que contiene una región reguladora transcripcional. En una modalidad, la región reguladora transcripcional es un promotor constitutivo. En una modalidad preferida, la región reguladora transcripcional constitutiva comprende el promotor de actina. En aún otra

modalidad, la región reguladora transcripcional constitutiva comprende adicionalmente una región intensificadora operativamente enlazada a la región promotora. En una modalidad aún más preferida, la región intensificadora es el intensificador de citomegalovirus.

En una modalidad, la región reguladora transcripcional es una región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo. En aún otra modalidad, la región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo comprende una región promotora seleccionada del grupo que consiste del promotor aP2 murino basal y el promotor UCP1 de rata, basal. En aún otra modalidad, la región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo comprende adicionalmente una región intensificadora operativamente enlazada a la región promotora. En aún otra modalidad, la región intensificadora se selecciona del grupo que consiste del intensificador aP2 específico de adipocito y el intensificador UCP1 específico de adipocito. En una modalidad aún más preferida, la región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo se selecciona del grupo que consiste de:

i) un polinucleótido que comprende el intensificador aP2 específico de adipocito y el promotor aP2 murino basal, y

ii) un polinucleótido que comprende el

intensificador UCP1 específico de adipocito y el promotor UCP1 de rata, basal.

En otra modalidad, el casete de expresión comprende además una región reguladora pos-transcripcional. En otra modalidad, la región reguladora pos-transcripcional es WPRE.

En otra modalidad, el polinucleótido de interés codifica para una proteína que se selecciona del grupo que consiste de una proteína segregada que actúa de manera sistémica y una proteína que actúa sobre o en la vecindad del adipocito. En una modalidad aún más preferida, el polinucleótido de interés codifica para una proteína seleccionada del grupo que consiste de hexocinasa, glucocinasa, fosfatasa alcalina, y factor de crecimiento endotelial vascular.

Se pueden transducir cualesquiera de las células usando el método *in vitro* de la invención. En una modalidad particular, el AAV se usa para transducir una célula de tejido adiposo. En una modalidad aún más preferida, la célula de tejido adiposo es un adipocito café o un adipocito blanco.

Cuando los métodos *in vitro* para transducir células de acuerdo a la invención se llevan a cabo para transducir un adipocito blanco, entonces la región reguladora transcripcional dentro del AAV comprende preferentemente una región reguladora mini/aP2. En otra modalidad, cuando los métodos *in vitro* para transducir una célula de acuerdo a la

invención se lleva a cabo para transducir un adipocito café, entonces la región reguladora transcripcional dentro del AAV comprende preferentemente un casete de expresión que comprende una región reguladora mini/UCP1.

En otro aspecto de la invención, para mejorar la expresión transgénica lograda por los promotores mini/aP2 y mini/UCP1, se usa el promotor CAG en unión con secuencias diana de miARN específicas de tejido en un intento para obtener altos niveles de expresión en tejido adiposo y des-seleccionar como diana la expresión transgénica de órganos fuera de diana. Esto da por resultado un refuerzo adicional del potencial de los vectores AAV para modificar genéticamente tejido adiposo cuando se administran de manera local o de forma sistémica.

En una modalidad adicional, la invención se refiere a un método para aislar las células transducidas *in vivo* al usar los vectores AAV de la invención y al cultivarlos *in vitro*. En otra modalidad, la invención se refiere a las células transducidas aisladas y la célula y composiciones farmacéuticas que los comprenden.

5. Adipocitos transducidos, y composiciones de células de adipocitos, método terapéutico ex-vivo

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a los adipocitos obtenidos por el método *in vitro* de la invención. En otra modalidad, la invención se refiere a una composición

celular que comprende adipocitos obtenidos de acuerdo al método de la invención. Además, la invención también se refiere a adipocitos o composiciones de células de adipocitos que comprenden el genoma de un AAV de acuerdo a la invención. De manera preferente, al menos 50% de la composición celular está comprendida por adipocitos de acuerdo a la invención. De manera más preferente, al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, y 100% de la composición celular está comprendida por adipocitos de acuerdo a la invención.

Como se menciona anteriormente, el AAV de la invención se puede usar para transducir células *in vitro* a fin de introducir un polinucleótido de interés a las células. De manera subsiguiente, las células transducidas se pueden implantar en el cuerpo humano o animal para obtener el efecto terapéutico deseado.

De esta manera, en otra modalidad, la invención se refiere a adipocitos o a una composición celular que comprende adipocitos obtenidos de acuerdo al método de la invención para el uso en medicina.

En otra modalidad, la invención se refiere a adipocitos o a una composición celular que comprende adipocitos obtenidos de acuerdo al método de la invención para el uso en el tratamiento de una enfermedad que requiere la expresión del polinucleótido de interés.

En otra modalidad, la invención se refiere a un

método para el tratamiento o prevención de una enfermedad que comprende administrar a un sujeto en necesidad de esto los adipocitos o composiciones celulares obtenidas de acuerdo al método de la invención. Los ejemplos de enfermedades que se pueden afrontar con este planteamiento se han definido anteriormente en el contexto del AAV de la invención.

6. Polinucleótidos, vectores y plásmidos

En un quinto aspecto, la invención se refiere a polinucleótidos que son útiles para producir el AAV de acuerdo a la invención. De esta manera, en otra modalidad, la invención se refiere a un polinucleótido ("polinucleótido de la invención") que comprende un casete de expresión flanqueado por ITR de virus adeno-asociado, en donde el casete de expresión comprende una región reguladora específica de tejido adiposo operativamente enlazada a un polinucleótido de interés.

En una modalidad preferida, la región reguladora específica de tejido adiposo comprende una región promotora seleccionada del grupo que consiste del promotor aP2 murino basal y el promotor UCP1 de rata, basal.

En otra modalidad, la región reguladora específica de tejido adiposo comprende además una región intensificadora operativamente enlazada a la región promotora. En aún una modalidad más preferida, la región intensificadora se selecciona del grupo que consiste del intensificador aP2

específico de adipocito y el intensificador UCP1 específico de adipocito.

En otra modalidad, la región reguladora se selecciona del grupo que consiste de:

i) un polinucleótido que comprende el intensificador aP2 específico de tejido y el promotor aP2 murino basal, y

ii) un polinucleótido que comprende el intensificador UCP1 específico de adipocito y el promotor UCP1 de rata, basal.

En otra modalidad, el casete de expresión del polinucleótido de la invención comprende además un elemento regulador pos-transcripcional. En aún otra modalidad, la región reguladora pos-transcripcional es WPRE.

En otra modalidad, el polinucleótido de interés comprendido en el polinucleótido de la invención codifica para una proteína seleccionada del grupo que consiste de hexocinasa, glucocinasa, fosfatasa alcalina, y factor de crecimiento endotelial vascular.

El polinucleótido de la invención se puede incorporar en un vector, tal como por ejemplo, un plásmido. De esta manera, en una modalidad adicional, la invención se refiere a un vector o plásmido que comprende el polinucleótido de la invención. De acuerdo a la presente invención, son indistintos los términos "vector" y

"plásmido".

En una modalidad particular, el polinucleótido de la invención se incorpora en un plásmido o vector viral adeno-asociado. De manera preferente, todas las otras secuencias codificadoras estructurales y no estructurales necesarias para la producción del virus adeno-asociado no están presentes en el vector viral puesto que se pueden proporcionar in *trans* por otro vector tal como un plásmido, o al integrar de manera estable las secuencias en una línea celular de envasado.

Los polinucleótidos de la invención se pueden obtener usando técnicas de biología molecular bien conocidas en la técnica. Ver Brown (1995), Watson (1992), Alberts (2008), Innis (1990), Erlich (1989), Sambrook (1989), Bishop (1987), Reznikoff (1987), Davis (1986), y Schleef (2001), *supra*. En otra modalidad, la invención se refiere a un vector AAV en donde el genoma comprende un polinucleótido de la invención.

7. Métodos para obtener AAV

En un sexto aspecto, la invención se refiere a un método para obtener el AAV de la invención. Este AAV se puede obtener al introducir los polinucleótidos de la invención en células que expresan constitutivamente *rep* y *cap*. De esta manera, en otra modalidad, la invención se refiere a un método para obtener un vector viral adeno-asociado que

comprende los pasos de:

i) proporcionar una célula que comprende un polinucleótido de la invención flanqueado por las ITR de AAV, proteínas cap de AAV, proteínas rep de AAV y proteínas virales o celulares en las cuales el AAV es dependiente para la replicación,

ii) mantener la célula bajo condiciones adecuadas para el montaje del AAV, y

iii) purificar los vectores virales adeno-asociados producidos por la célula.

En una modalidad preferida, la región reguladora específica de tejido adiposo que forma parte del polinucleótido de la invención comprende una región promotora seleccionada del grupo que consiste del promotor aP2 murino basal y el promotor UCP1 de rata, basal.

En otra modalidad, la región reguladora específica de tejido adiposo comprende además una región intensificadora operativamente enlazada con la región promotora. En una modalidad aún más preferida, la región intensificadora se selecciona del grupo que consiste del intensificador aP2 específico de adipocito y el intensificador UCP1 específico de adipocito.

En otra modalidad, la región reguladora se selecciona del grupo que consiste de:

i) un polinucleótido que comprende el

intensificador aP2 específico de adipocito y el promotor aP2 murino basal, y

ii) un polinucleótido que comprende el intensificador UCP1 específico de adipocito y el promotor UCP1 de rata, basal.

En otra modalidad, el casete de expresión del polinucleótido de la invención comprende además un elemento regulador pos-transcripcional. En aún otra modalidad, la región reguladora pos-transcripcional es WPRE.

En otra modalidad, el polinucleótido de interés comprendido en el polinucleótido de la invención codifica para una proteína seleccionada del grupo que consiste de hexocinasa, glucocinasa, fosfatasa alcalina, y factor de crecimiento endotelial vascular.

La producción de AAV recombinante (rAAV) para vectorizar transgenes se ha descrito previamente. *Ver* Ayuso E, *et al.*, Curr. Gene Ther. 2010; 10:423-436, Okada T, *et al.*, Hum. Gene Ther. 2009; 20:1013-1021, Zhang H, *et al.*, Hum. Gene Ther. 2009; 20:922-929, y Virag T, *et al.*, Hum. Gene Ther. 2009; 20:807-817. Estos protocolos se pueden usar o adaptar para generar el AAV de la invención. En una modalidad, la línea de células productoras se transfecta de manera transiente con el polinucleótido de la invención (que comprende el casete de expresión flanqueado por ITR) y con construcciones que codifican para las proteínas rep y cap y

proporciona funciones auxiliares. En otra modalidad, la línea celular suministra de manera estable las funciones auxiliares y se transfecta de manea transiente con el polinucleótido de la invención (que comprende el casete de expresión flanqueado por ITR) y con construcciones que codifican para las proteínas rep y cap. En otra modalidad, la línea celular suministra establemente las proteínas rep y cap y las funciones auxiliares y se transfecta de manera transiente con el polinucleótido de la invención. En otra modalidad, la línea celular suministra de manera estable las proteínas rep y cap y se transfecta de manera transiente con el polinucleótido de la invención y un polinucleótido que codifica para las funciones auxiliares. En aún otra modalidad, la línea celular suministra de manera estable el polinucleótido de la invención, las proteínas rep y cap y las funciones auxiliares. En la técnica se han descrito métodos para hacer y usar estos y otros sistemas de producción de AAV. *Ver* Muzyczka N, *et al.*, US 5,139,941, Zhou X, *et al.*, US 5,741,683, Samulski R, *et al.*, US 6,057,152, Samulski R, *et al.*, US 6,204,059, Samulski R, *et al.*, US 6,268,213, Rabinowitz J, *et al.*, US 6,491,907, Zolotukhin S, *et al.*, US 6,660,514, Shenk T, *et al.*, US 6,951,753, Snyder R, *et al.*, US 7,094,604, Rabinowitz J, *et al.*, US 7,172,893, Monahan P, *et al.*, US 7,201,898, Samulski R, *et al.*, US 7,229,823, y Ferrari F, *et al.*, US 7,439,065.

En otra modalidad, la capacidad de distribución transgénica de AAV se puede incrementar al proporcionar las ITR de AAV de dos genomas que pueden fijarse para formar concatémeros de cabeza a cola. En general, en la entrada del AAV en la célula hospedadora, el ADN de hebra individual que contiene el transgen se convierte por los complejos de ADN-polimerasa de la célula hospedadora en ADN de doble hebra, después de lo cual las ITR ayudan en la formación del concatémero en el núcleo. Como una alternativa, el AAV se puede manejar para ser un AAV auto-complementario (sc), lo que permite que el vector viral derive el paso de la síntesis de segunda hebra en la entrada en una célula diana, proporcionando un vector viral de scAAV con expresión transgénica más rápida y potencialmente más alta (por ejemplo hasta 100 veces). Por ejemplo, el AAV se puede manejar para tener un genoma que comprende dos ADN conectados de hebra individual que codifican, respectivamente, para una unidad transgénica y su complemento, que pueden sujetarse conjuntamente después de la distribución en una célula diana, produciendo un ADN de doble hebra que codifica para la unidad transgénica de interés. El AAV auto-complementario se ha descrito en la técnica. *Ver* Carter B, US 6,596,535, Carter B, US 7,125,717, y Takano H, *et al.*, US 7,456,683.

Se ha reportado que las proteínas Cap tienen efectos en el tropismo del hospedador, célula, tejido o

especificidad de órgano, uso de receptores, eficiencia de infección e inmunogenicidad de los virus AAV. Por consiguiente, una Cap de AAV para el uso en un rAAV se puede seleccionar tomando en consideración, por ejemplo, la especie del sujeto (por ejemplo humana o no humana), el estado inmunológico del sujeto, la adecuabilidad del sujeto para tratamiento a largo o corto plazo, o una aplicación terapéutica particular (por ejemplo, tratamiento de un trastorno o enfermedad particular, o distribución a células, tejidos u órganos particulares). En otra modalidad, la Cap de rAAV se basa en las Cap de dos o tres o más serotipos de AAV. En una modalidad particular, los genes de *cap* de AAV se derivan de los serotipos AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, o AAV9. En una modalidad preferida, los genes *cap* de AAV se derivan de los serotipos AAV6, AAV7, AAV8, y AAV9.

En algunas modalidades, una Cap de AAV para el uso en el método de la invención se puede genera por mutagénesis (es decir, por inserciones, supresiones o sustituciones) de una de las Cap de AAV mencionadas anteriormente o su ácido nucleico codificador. En algunas modalidades, la Cap de AAV es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% o más similar a una o más de las Cap de AAV mencionadas anteriormente.

En algunas modalidades, la Cap de AAV es quimérica, que comprende dominios de al menos dos de las Cap de AAV

mencionadas anteriormente. En algunas modalidades, la Cap de AAV es un mosaico de monómeros VP1, VP2, y VP3 de dos o tres diferentes AAV o el AAV recombinante. En algunas modalidades, una composición de rAAV comprende más de una de las Cap mencionadas anteriormente.

En algunas modalidades, una Cap de AAV para el uso en una composición de rAAV se maneja para contener una secuencia heteróloga u otra modificación. Por ejemplo, una secuencia peptídica o proteínica que confiere selección selectiva de diana o evasión inmunitaria se puede manejar en una proteína Cap. De manera alternativa o adicionalmente, la Cap se puede modificar químicamente de modo que la superficie del rAAV se polietilen-glicolice (es decir pegile), lo que puede facilitar la evasión inmunitaria. La proteína Cap también se puede mutageneizar (por ejemplo, para remover su unión a receptores naturales, o para enmascarar un epítopo inmunogénico).

En una modalidad particular, los genes *rep* de AAV se derivan de los serotipos AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, o AAV9. En una modalidad preferida, los genes *rep* y *cap* de AAV se derivan de los serotipos AAV6, AAV7, AAV8, y AAV9.

Los genes *rep* de AAV, *cap* de AAV y los genes que proporcionan funciones auxiliares se pueden introducir en la célula al incorporar los genes en un vector tal como por

ejemplo, un plásmido y al introducir el vector en la célula. Los genes se pueden incorporar en el mismo plásmido o en diferentes plásmidos. En una modalidad preferida, los genes *rep* y *cap* de AAV se incorporan en un plásmido y los genes que proporcionan funciones auxiliares se incorporan en otro plásmido. Los ejemplos de plásmidos que comprenden los genes *rep* y *cap* de AAV adecuados para el uso con los métodos de la invención incluyen los vectores pHLP19 y pRep6cap6. *Ver* Colisi P, US 6,001,650 y Russell D, *et al.*, US 6,156,303. En una modalidad preferida, los genes que proporcionan funciones auxiliares se derivan de adenovirus.

El polinucleótido de la invención y los polinucleótidos que comprenden los genes *rep* y *cap* de AAV o los genes que proporcionan funciones auxiliares se pueden introducir en la célula al usar cualquier método adecuado bien conocido en la técnica. *Ver* Ausubel F, *et al.*, Eds., "Short Protocols in Molecular Biology", 4a Ed. (John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, US, 1997), Brown (1995), Watson (1992), Alberts (2008), Innis (1990), Erlich (1989), Sambrook (1989), Bishop (1987), Reznikoff (1987), Davis (1986), y Schleef (2001), *supra*. Los ejemplos de métodos de transfección incluyen, pero no se limitan a, co-precipitación con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, polibreno, electroporación, microinjección, fusión mediada por liposoma, lipofección, infección por retrovirus y transfección

biolística. En una modalidad particular, la transfección se lleva a cabo por medio de co-precipitación con fosfato de calcio. Cuando la célula carece de la expresión de cualquiera de los genes *rep* y *cap* de AAV y los genes que proporcionan funciones auxiliares adenovirales, estos genes se pueden introducir en la célula simultáneamente con el polinucleótido del primer aspecto de la invención. De manera alternativa, estos genes se pueden introducir en la célula antes o después de la introducción del polinucleótido del primer aspecto de la invención. En una modalidad particular, las células se transfectan de manera simultánea con tres plásmidos:

1) un plásmido que comprende el polinucleótido de la invención

2) un plásmido que comprende los genes *rep* y *cap* de AAV

3) un plásmido que comprende los genes que proporcionan las funciones auxiliares.

Los métodos para cultivar las células de envasado y las condiciones de ejemplo que promueven la liberación de las partículas de vector de AAV, tal como la producción de un lisado celular, se pueden llevar a cabo como se describe en los ejemplos de la presente. Las células productoras se cultivan durante un período adecuado de tiempo a fin de promover la liberación de vectores virales en el medio. En general, las células se pueden cultivar durante

aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, hasta aproximadamente 10 días. Después de aproximadamente 10 días (o más pronto, dependiendo de las condiciones de cultivo y de la célula productora particular usada), el nivel de producción disminuye en general de forma significativa. En general, el tiempo de cultivo se mide desde el punto de producción viral. Por ejemplo, en el caso de AAV, la producción viral empieza en general al suministrar la función del virus auxiliar en una célula productora apropiada como se describe en la presente. En general, las células se recolectan de aproximadamente 48 a aproximadamente 100, de manera preferente de aproximadamente 48 a aproximadamente 96, de manera preferente de aproximadamente 72 a aproximadamente 96, de manera preferente de aproximadamente 68 a aproximadamente 72 horas después de la infección con el virus auxiliar (o después de que empieza la producción viral).

El AAV de la invención se puede obtener tanto de: i) las células transfectadas con los polinucleótidos de la invención y ii) el medio de cultivo de las células después de un período de tiempo post-transfección, de manera preferente 72 horas. Se puede usar cualquier método para la purificación

del AAV de las células o del medio de cultivo para obtener el AAV de la invención. En una modalidad particular, el AAV de la invención se purifica siguiendo un método optimizado en base a un método de precipitación con polietilenglicol y dos gradientes consecutivos de cloruro de cesio (CsCl). *Ver* Ayuso, 2010, *supra*. El AAV purificado de la invención se puede dializar contra PBS, filtrar y almacenar a -80°C. Los títulos de genomas virales se pueden determinar por PCR cuantitativa siguiendo el protocolo descrito para el material normal de referencia de AAV2 usando ADN de plásmido linealizado como curva estándar. *Ver* Lock M, *et al.*, Hum. Gene Ther. 2010; 21:1273-1285.

En algunas modalidades, los métodos comprenden además pasos de purificación, tal como el tratamiento de lisado celular con benzonasa, purificación de lisado celular sobre un gradiente de CsCl, o purificación de lisado celular con el uso de cromatografía con sulfato de heparina. Ver Halbert C, *et al.*, Methods Mol. Biol. 2004; 246:201-212.

Varios AAV que se presentan de forma natural y recombinante, sus ácidos nucleicos codificadores, proteínas Cap y Rep de AAV y sus secuencias, así como métodos para aislar o generar, propagar y purificar este AAV, y en particular, sus cápsidas, adecuado para el uso en la producción de AAV, se conocen en la técnica. *Ver* Gao, 2004, *supra*, Russell D, *et al.*, US 6,156,303, Hildinger M, *et al.*,

US 7,056,502, Gao G, *et al.*, US 7,198,951, Zolotukhin S, US 7,220,577, Gao G, *et al.*, US 7,235,393, Gao G, *et al.*, US 7,282,199, Wilson J, *et al.*, US 7,319,002, Gao G, *et al.*, US 7,790,449, Gao G, *et al.*, US 20030138772, Gao G, *et al.*, US 20080075740, Hildinger M, *et al.*, WO 2001/083692, Wilson J, *et al.*, WO 2003/014367, Gao G, *et al.*, WO 2003/042397, Gao G, *et al.*, WO 2003/052052, Wilson J, *et al.*, WO 2005/033321, Vandenberghe L, *et al.*, WO 2006/110689, Vandenberghe L, *et al.*, WO 2007/127264, y Vandenberghe L, *et al.*, WO 2008/027084.

8. Composiciones farmacéuticas

El AAV de la invención se puede administrar al cuerpo humano o animal por métodos convencionales, que requieren la formulación de los vectores en una composición farmacéutica. De esta manera, en un séptimo aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica (referida más adelante en la presente como "composición farmacéutica de la invención") que comprende un AAV, en donde el AAV comprende un genoma viral recombinante en donde el genoma viral recombinante comprende un casete de expresión que comprende una región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo operativamente enlazada a un polinucleótido de interés. De manera alternativa, la composición farmacéutica de la invención puede comprender los polinucleótidos o polipéptidos de la invención.

La composición farmacéutica puede incluir una cantidad terapéuticamente efectiva del AAV de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de la invención se pueden formular para la distribución a animales para propósitos veterinarios (por ejemplo, ganado (vacas, cerdos, otros)), y otros sujetos mamíferos no humanos, así como a sujetos humanos. El AAV se puede formular con un portador fisiológicamente aceptable para el uso en aplicaciones de terapia génica y transferencia génica. La dosis de la formulación se puede medir o calcular como partículas virales o como copias de genoma ("GC")/genomas virales ("vg").

Se puede usar cualquier método conocido en la técnica para determinar el número de copia de genoma (GC) de las composiciones virales de la invención. Un método para realizar la titulación del número GC de AAV es como sigue: primero se tratan muestras purificadas del vector de AAV con DNasa para eliminar el ADN de genoma de AAV no encapsidado o el ADN de plásmido contaminante del proceso de producción. Las partículas resistentes a DNasa entonces se someten a tratamiento térmico para liberar el genoma de la cápsida. Los genomas liberados entonces se cuantifican por PCR de tiempo real usando conjuntos de cebadores/sondas que tienen como diana la región específica del genoma viral.

También, las composiciones virales se pueden

formular en unidades de dosis que contienen una cantidad de vectores virales que están en el intervalo de aproximadamente 1.0 x 10^9 GC a aproximadamente 1.0 x 10^{15} GC (para tratar a un sujeto promedio de 70 kg de peso corporal), y de manera preferente 1.0 x 10^{12} GC a 1.0 x 10^{14} GC para un paciente humano. De manera preferente, la dosis del virus en la formulación es 1.0 x 10^9 GC, 5.0 X 10^9 GC, 1.0 X 10^{10} GC, 5.0 X 10^{10} GC, 1.0 X 10^{11} GC, 5.0 X 10^{11} GC, 1.0 X 10^{12} GC, 5.0 X 10^{12} GC, o 1.0 x 10^{13} GC, 5.0 X 10^{13} GC, 1.0 X 10^{14} GC, 5.0 X 10^{14}GC, o 1.0 x 10^{15} GC.

Los vectores virales se pueden formular de una manera convencional usando uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables. El AAV se puede formular para administración parenteral por inyección (por ejemplo por inyección de bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria (por ejemplo en ampolletas o en recipientes multidosis) con un conservador adicionado. Las composiciones virales pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tal como agentes de suspensión, estabilización o dispersión. Se pueden preparar preparaciones líquidas de las formulaciones de AAV por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tal como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de

celulosa o grasas comestibles o hidrogenadas), agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia), vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres aceitosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados), y conservadores (por ejemplo metil- o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales amortiguadoras. De manera alternativa, las composiciones pueden estar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril libre de pirogenos) antes del uso.

También se abarca el uso de adyuvantes en combinación con o en mezcla con el AAV de la invención. Los adyuvantes contemplados incluyen, pero no se limitan a, adyuvantes de sales minerales o adyuvantes en gel de sales minerales, adyuvantes en partículas, adyuvantes en micropartículas, adyuvantes mucosos y adyuvantes inmunoestimuladores.

Los adyuvantes se pueden administrar a un sujeto con una mezcla con el AAV de la invención, o usar en combinación con el AAV.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar de manera local o de forma sistémica. En una modalidad preferida, la composición farmacéutica se administra cerca del tejido u órgano cuyas células se van a transducir. En una modalidad particular, la composición

farmacéutica de la invención se administra de manera local en el tejido adiposo blanco (WAT) o en el tejido adiposo café (BAT) por inyección intra-WAT o intra-BAT. En otra modalidad preferida, la composición farmacéutica de la invención se administra de manera sistémica.

La composición farmacéutica se puede formular de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa, subcutánea o intramuscular a seres humanos. Los productos inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección o como emulsiones. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de inyección. Cuando la composición se va a administrar por infiltración, se puede dispensar con una botella de infiltración que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar un frasco de agua para inyección o solución salina estéril, de modo que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de los polinucleótidos, vectores, polipéptidos, o composiciones farmacéuticas de la invención

calculada para producir el efecto deseado y en general se determinará, entre otras razones, por las propias características de los polinucleótidos, vectores, polipéptidos y composiciones farmacéuticas de la invención y el efecto terapéutico que se va a obtener. La cantidad de los polinucleótidos, vectores, polipéptidos o composiciones farmacéuticas de la invención que será efectiva en el tratamiento una enfermedad se puede determinar por técnicas clínicas normales descritas en la presente o conocidas de otro modo en la técnica. Además, también se pueden usar opcionalmente pruebas *in vitro* para ayudar a identificar intervalos óptimos de dosis. La dosis precisa a usar en la formulación dependerá de la ruta de administración y de la severidad de la condición y se debe decidir a juicio del doctor y dependiendo de las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas se pueden extrapolar de un par de curvas de respuesta a dosis derivadas de los sistemas de ensayo *in vitro* modelos o en animales. Para administración sistémica, se puede estimar inicialmente una dosis terapéuticamente efectiva de ensayos in vitro. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en circulación que incluye la IC50 que se ha determinado en cultivo celular. Esta información se puede usar para determinar de manera precisa las dosis útiles en humanos. Las dosis iniciales también se pueden estimar de

datos *in vivo* (por ejemplo modelos animales) usando técnicas bien conocidas en el estado de la materia. Algunos con experiencia normal en el estado de la técnica pueden optimizar fácilmente la administración a humanos en base a los datos en animales.

Esta administración sistémica incluye, sin limitación, cualquier ruta de administración que no implique inyección directa en el tejido adiposo. De manera más particular, la administración sistémica incluye una inyección sistémica de los polinucleótidos, vectores, polipéptidos, y composiciones farmacéuticas de la invención, tal como inyecciones intramuscular (im), intravascular (ie), intraarterial (ia), intravenosa (iv), intraperitoneal (ip), sub-cutánea o transdérmica. La administración periférica también incluye la administración oral de los polinucleótidos, vectores, polipéptidos, y composiciones farmacéuticas de la invención, distribución usando implantes, o administración por instilación a través del sistema respiratorio (por ejemplo intranasal) usando aspersiones, aerosoles o cualquier otra formulación apropiada. De manera preferente, la administración sistémica es mediante inyección im, ip, ia o iv. De manera más preferente, los polinucleótidos, vectores, polipéptidos, y composiciones farmacéuticas de la invención se administran mediante inyección iv. *Ver* During M, WO 1996/040954 y Monahan P, *et*

al., WO 2001/091803.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en una dosis simple o en modalidades particulares de la invención, en múltiples dosis (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más administraciones) se pueden emplear para lograr un efecto terapéutico. De manera preferente, el AAV comprendido en la composición farmacéutica de la invención es de serotipos diferentes cuando se requieren múltiples dosis.

Todas las publicaciones mencionadas anteriormente en la presente se incorporan de este modo en su totalidad como referencia.

En tanto que la invención anterior se ha descrito en algún detalle para propósitos de claridad y entendimiento, se apreciará por un experto en la técnica de una lectura de esta descripción que se pueden hacer varios cambios en la forma y detalle sin apartarse del alcance verdadero de la invención y reivindicaciones anexas.

Procedimientos Generales

1. Características del sujeto

Se usaron ratones ICR machos de 8-12 semanas de edad, ratones C57B1/6J de 9-13 semanas de edad, y ratones B6.V- Lep^{ob}/OlaHsd (ob/ob) y BKS.Cg-+ *Lepr*^{db}/+ *Lepr*^{db}/OlaHsd (db/db) de 8 semanas de edad. Los ratones se alimentaron *ad libitum* con dieta estándar (Teklad Global Diets^{MR}, Harlan

Labs., Inc., Madison, WI, US) y se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h (luces se encienden a las 8:00 a.m.). Para el muestreo del tejido, los ratones se anesteciaron por medio de anestésico inhalado isofluorano (IsoFlo^{MR}, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, US) y se decapitaron. Los tejidos de interés se cortaron y mantuvieron a -80°C o con formalina, hasta análisis.

2. Vectores de AAV recombinantes

Se generaron vectores por transfección triple de células HEK293 de acuerdo a métodos estándar. *Ver* Ayuso, 2010, *supra*. Las células se cultivaron en 10 botellas roller (850 cm^2, planas; Corning^{MR}, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, US) en DMEM 10% FBS a 80% de confluencia y se co-transfectaron por el método de fosfato de calcio con un plásmido que tiene el casete de expresión flanqueado por las ITR de AAV2, un plásmido auxiliar que tiene el gen *rep* de AAV2 y el gen *cap* de AAV de los serotipos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, y el plásmido que tiene las funciones auxiliares de adenovirus. Los transgenes usados fueron: a) eGFP accionado por: a1) el intensificador de citomegalovirus híbrido/promotor constitutivo de β-actina de pollo (CAG) y el elemento regulador WPRE, a2) la región reguladora mini/aP2 de ratón o a3) la región reguladora mini/UCP1 de rata; b) ADNc de hexocinasa II murina (*mHk1l*) accionado por: b1) el promotor ubicuo de CMV y WPRE, b2) la región reguladora

mini/aP2 de ratón o b3) la región reguladora mini/UCP1 de rata, c) fosfatasa alcalina segregada, derivada de placenta humana (hSeAP) accionada por la región reguladora mini/aP2 de ratón y WPRE, d) VEGF164 murino accionado por la región reguladora mini/UCP1 de rata, y e) RFP accionado por el promotor ubicuo de CMV. *Ver* Ross, 1990, Graves, 1992, y Cassard-Doulcier, 1998, *supra*. Un plásmido no codificador que tiene el promotor CMV (pAAV-MCS, Stratagene^{MR}, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, US), la región regualdora mini/aP2 o la región reguladora mini/UCP1 y un sitio de multi-clonación se usaron para producir partículas nulas. Los AAV se purificaron con un método optimizado basado en un método de precipitación con polietilenglicol y dos gradientes consecutivos de cloruro de cesio (CsCl). Este protocolo basado en CsCl de segunda generación redujo las cápsidas vacías de AAV y las impurezas de ADN y proteína, de forma dramática. Ver Ayuso, 2010, *supra*. Los vectores de AAV purificados se dializaron contra PBS, se filtraron y almacenaron a -80°C. Los títulos de los genomas virales se determinaron por PCR cuantitativa siguiendo el protocolo descrito para el material de norma de referencia de AAV2 usando ADN de plásmido linealizado como curva estándar. Ver Lock M, *et al.*, Hum. Gene Ther. 2010; 21:1273-1285. Los vectores se construyeron de acuerdo a técnicas de biología molecular bien conocidas en la técnica. Ver Brown (1995),

Watson (1992), Alberts (2008), Innis (1990), Erlich (1989), Sambrook (1989), Bishop (1987), Reznikoff (1987), Davis (1986), y Schleef (2001), *supra*.

3. Administración intra-eWAT in vivo de los vectores de AAV

Se anestesiaron ratones con una inyección intraperitoneal de quetamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). Se realizó una laparotomía a fin de exponer el tejido adiposo blanco epididimal. Los vectores AAV se re-suspendieron en solución salina con o sin 2% Pluronics F88 (BASF Corp., Florham Park, NJ, US) y se inyectaron directamente en la almohadilla grasa epididimal. Cada almohadilla grasa epididimal se inyectó dos veces con 50 µL de solución de AAV (una inyección ceca al testículo y la otra en la parte media de la almohadilla grasa). El abdomen se enjuagó con solución salina estéril y se cerró con un planteamiento de dos capas.

4. Administración intra-iBAT e intra-iWAT in vivo de los vectores AAV

Los ratones se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de cetamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). Se realizó una incisión longitudinal de 1.5-2 cm de largo en el área interscapular o inginal a fin de exponer iBAT o iWAT, respectivamente. Para distribuir el vector en el depósito completo, cada iBAT o iWAT recibió 4 inyecciones de 10 µl de solución de AAV usando una jeringa Hamilton. La piel

se cerró usando un planteamiento de una capa.

5. Administración sistémica de vectores de AAV

La cantidad apropiada de la solución de AAV se diluyó en 200 µL de solución salina y se inyectó manualmente en la vena de cola lateral sin ejercer presión en el momento de la distribución. Antes de la inyección, los animales se pusieron bajo una lámpara térmica infrarroja de 250 W (Philips NV, Amsterdam, NL) durante unos pocos minutos para dilatar los vasos sanguíneos y facilitar la visión y fácil acceso a la vena de la cola. Se usó un restrictor de plástico (Harvard Apparatus, Holliston, MA, US) para asegurar el animal para inyección. No se usó anestesia puesto que se empleó un dispositivo restrictor apropiado. Se utilizó una aguja calibre 30 para inyectar los animales.

6. Inmunohistoquímica

Para la detección de GFP, RFP, y α-SMA, los tejidos se fijaron durante 12 a 24 horas en formalina al 10%, se incrustaron en parafina y se seccionaron. Las secciones se incubaron durante la noche a 4°C con un anticuerpo anti-GFP de cabra (Abcam pic, Cambridge, MA, US) diluido 1:300, con un anticuerpo anti-RFP de conejo (Abcam pic, Cambridge, MA, US) diluido 1/400 o con un anticuerpo anti-a-SMA de ratón (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, US) diluido 1/300. Un anticuerpo anti-cabra de asno biotinilado (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, US) diluido 1:300, o un

anticuerpo anti-conejo de cabra biotinilado (Pierce Antibodies, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, US) diluido 1/300 o un anticuerpo anti-ratón de caballo biotinilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA, US) diluido 1/300 se usaron como anticuerpos secundario. Se usó estreptavidina Alexa Fluor 488 (Molecular Probes^{MR}, Life Technologies Corp., Carslbad, CA, US) diluida 1:300 como fluorocromo y se usó bisbenzimida de Hoescht (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, US) para contratinción uclear. De manera alternativa, se usó un equipo de peroxidasa ABC (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, US) diluido 1:50 y las secciones se contratiñeron en hematoxilina de Mayer.

7. Análisis de expresión de β-galactosidasa en muestras de eWAT

Para detectar la presencia de β-galactosidasa en eWAT *in toto,* las muestras de tejido se fijaron durante 1 h en paraformaldehído al 4%, se lavaron dos veces en solución de PBS, y luego se incubaron en X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-β-D-galactopiranosido) en $K_3Fe(CN)_5$ 5 mM, $K_4Fe(CN)_6$ 5 mM, y $MgCl_2$ 1 mM en PBS durante 6-8 h en la oscuridad a 37°C.

8. Contenido de GFP

Para determinar el contenido de GFP, los tejidos se rompieron mecánicamente en 1 mL de amortiguador de lisis (Tris 50 mM/L, Nonidet P40 al 1%, desoxicolato de sodio al

0.25%, NaCl 150 mM/L, EDTA 1 mM/L, en PBS, pH 7.4, filtrado estéril) con un homogeneizador de tejido tipo Polytron^{MR} y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se midió el contenido de GFP en 100 µL de esta solución con un espectrómetro de luminiscencia Flx800 (Bio-Tek Instruments, Inc, Winooski, VT, US) con longitud de onda de excitación de 488 nm y longitud de onda de emisión de 512 nm. Los valores del contenido total de GFP se corrigieron por el contendio de proteína de la muestra.

9. Aislamiento de adipocitos a partir de almohadilla grasa epididimal

Se aislaron adipocitos transducidos con AAV usando una modificación del método de Rodbell. Ver Rodbell M, J. Biol. Chem. 1964; 239: 375-380. Se aniquilaron ratones anestesiados con isofluorano mediante decapitación y el WAT epididimal se picó y digirió a 37°C en amortiguador de bicarbonato-HEPES de Krebs-Ringer (KRBH) que contiene BSA al 4% (libre de ácido graso), 0.5 mM/L de glucosa y 0.5 mg/mL de colagenasa tipo II (C6885; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, US) durante 35-45 minutos. Las células grasas se aislaron por centrifugación suave y se lavaron tres veces con KRBH libre de colagenasa, fresco sin glucosa. Los adipocitos se re-suspendieron en KRBH fresco sin glucosa y se estimó el

número de celular como se describe previamente. Ver DiGirolamo M, et al., Am. J. Physiol 1971; 221: 850-858.

10. Análisis de ARN

Se obtuvo el ARN total de adipocitos aislados y depósitos adiposos o hígado al usar el reactivo de lisis QIAzol (Qiagen NV, Venlo, NL) o reactivo de aislamiento tripuro (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, US), respectivamente, y el miniequipo de tejido de lípido RNeasy (Qiagen NV, Venlo, NL). A fin de eliminar los genomas virales residuales, el ARN total se trató con DNAsel (Qiagen NV, Venlo, NL). Para la RT-PCR, se trascribió de forma inversa 1 µg de las muestras de ARN usando el equipo de síntesis de ADNc Superscrip VILO (Invitrogen^{MR}, Life Technologies Corp., Carslbad, CA, US). Se realizó la PCR cuantitativa en tiempo real en un SmartCyclerll^{MR} (Cepheid, Sunnyvale, EUA), usando la supermezcla EXPRESS SYBRGreen qPCR supermix (Invitrogen^{MR}, Life Technologies Corp., Carslbad, CA, US). Las secuencias de los cebadores de oligonucleótido de homosentido y antisentido son:

Cebadores	Secuencia	SEQ ID NO:
homosentido RFP	GCGGCCACTACACCTGCGAC	4
RFP Antisentido	TCGGCGTGCTCGTACTGCTC	5
homosentido mHkII	GAAGGGGCTAGGAGCTACCA	6
antisentido mHkII	CTCGGAGCACACGGAAGTT	7
homosentido hSEAP	CGGCTGTTGGGCACTGA	8

hSEAP antisentido	GGAAGGTCCGCTGGATTGA	9
homosentido $mVEGF_{164}$	AGACAGAACAAAGCCAGAAATCAC	10
antisentido $mVEGF_{164}$	CACGTCTGCGGATCTTGGAC	11
homosentido total mVEGF	AAAAACGAAAGCGCAAGAAA	12
antisentido total de mVEGF	TTTCTCCGCTCTGAACAAGG	13
homosentido mPECAM1	CTGGTGCTCTATGCAAGCCTC	14
antisentido mPECAM1	CGGTGCTGAGACCTGCTTT	15
homoentido GFP	AAGTTCATCTGCACCACCG	16
Antisentido GFP	TCCTTGAAGAAGATGGTGCGC	17

Los datos se normalizaron con valores 36B4 y se analizaron como se describe previamente. Ver Pfaffl M, Nucleic Acids Res. 2001; 29 (9):e45.

11. Captación de glucosa *ex vivo* en adipocitos aislados

Para los adipocitos aislados de ratones, se midió la captación de 2-[1-^{3}H]desoxi-D-glucosa (2-DG; Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, US) a diferentes concentraciones de insulina como se describe previamente. Ver Traxinger R, et al., J. Biol. Chem. 1989; 264: 8156-8163. De forma breve, los adipocitos aislados se obtuvieron por digestión con colagenasa de WAT epididimal a ratones alimentados como se describe anteriormente. 250 µL de la suspensión de adipocitos se incubaron con KRBH+4% BSA (libre de ácido graso), 10 mM/L de desoxi-glucosa, 0.4 µCi de 2-[L-^{3}H]desoxi-D-glucosa y diferente de insulina durante 5 minutos. Finalmente último, los adipocitos y medio de

incubación se separaron a través de aceite de sílicio (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, US) en tubos de polipropileno y se valoró la radioactividad en las muestras de adipocitos mediante conteo por escintilación líquida. Los resultados se expresaron como pmol de 2-[^{3}H]-DG por 10^6 células por minuto.

12. Captación de glucosa *in vivo*

El índice de uso de glucosa basal *in vivo* se determinó como se describe previamente. Ver Franckhauser S, et al., Diabetes 2002; 51:624-630. De forma breve, se mezclaron 148 GBq (4 µCi) del análogo de glucosa no metabolizable desoxi-D-[1,2-^{3}H]glucosa (2-DG; PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, US) con amortiguador de BSA-citrato. Una inyección rápida de la mezcla radiomarcada se administró en la vena yugular de ratones alimentados, anestesiados (ketamina + xilazina) en el tiempo cero. La depuración 2-DG sanguínea específica se determinó como se describe previamente con muestras de sangre de 25 µL (vena de la cola) obtenidas 1, 15, y 30 minutos después de la inyección. Ver Somogyi M, J. Biol. Chem. 1945; 160:69-73. Las muestras de tejido se removieron 30 minutos después de la inyección. El índice de uso de glucosa se determinó al medir la acumulación de compuestos radiomarcados. Ver Ferré P, et al., Biochem. J. 1985; 228:103-110. La cantidad de 2-DG-6 fosfato por miligramo de proteína se dividió por la integral de la relación de concentración de 2-DG a glucosa no marcada,

medida. Debido a que los valores no se corrigieron por una "constante de discriminación" para 2-DG en las rutas metabólicas de glucosa, los resultados se expresan como el índice de uso de glucosa, en picomoles por miligramo de proteína por minuto.

13. Medición de niveles sanguíneos de hSeAP

Se terminaron los niveles en circulación de hSeAP a partir 5 µL de suero usando el sistema Tropix^{MR} Phospha-Light^{MR} (Applied Biosystems^{MR}, Life Technologies Corp., Carslbad, CA, US).

14. Análisis estadístico

Todos los valores se expresan como media ± SEM. Las diferencias entre grupos se compararon por prueba t de Student. Las diferencias se consideraron significativas a $p<0.05$.

Ejemplo 1

Transducción *in vivo* de adipocitos blancos por administración local de AAV

Para valorar la eficiencia de transducción *in vivo* de tejido adiposo blanco (WAT) con vectores de AAV, se inyectaron bilateralmente $4x10^{11}$ genomas virales (vg)/ratón de AAV de los serotipos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, y 9 que codifican para la proteína marcadora GFP bajo el control del promotor ubicuo CAG (AAV-CAG-GFP) en el tejido adiposo blanco

epididimal (eWAT) de ratones con o sin el agente tensioactivo no iónico Pluronics F88. Ver Croyle M, et al., Mol. Ther. 2001; 4: 22-28, Gebhart C, et al., J. Control Release 2001; 73:401-416, Mizukami H, et al., Hum. Gene Ther. 2006; 17:921-928, y Sommer J, et al., Mol. Ther. 2003; 7: 122-128. La administración de AAV1, AAV2, AAV4 y AAV5 sin Pluronics F88 dio por resultado un porcentaje muy bajo de adipocitos blancos transducidos dos semanas después de la inyección como se valora por inmunotinción contra GFP en eWAT. Adicionalmente, no se logró mejora de la eficiencia de transducción de adipositos mediada por cualquiera de los serotipos de AAV por medio de la adición de Pluronics F88. Ver figura 1A. Por lo tanto, el uso de este agente tensioactivo no iónico se descartó para experimentos subsiguientes. Independientemente de la adición de Pluronics F88, el AAV1 fue más eficiente que AAV2, AAV4, y AAV5 al transducir eWAT *in vivo*. Ver Mizukami, 2006, *supra*. En contraste con los pocos adipocitos dispersados y los pocos grupos de adipocitos que se transdujeron por AAV1, los animales inyectados con AAV6 y AAV7 presentaron múltiples grupos grandes de adipocitos blancos GFP^+. Adicionalmente, los animales tratados con AAV8 y AAV9 mostraron mucha mayor transducción de eWAT, y la vasta mayoría de adipocitos por área de eWAT se transdujeron. Ver figura 1B. La cuantificación mediante análisis fluorométrico del contenido

de GFP en eWAT dos semanas después de la administración confirmó adicionalmente que el AAV de los serotipos 6, 7, 8 y 9 fueron más eficientes que AAV1 al transducir eWAT *in vivo*. Ver figura 1C. De manera notable, las almohadillas grasas epididimales inyectados con AAV8 y AAV9 presentaron el contenido más alto de GFP sin diferencias estadísticamente significativas entre los mismos. Ver figura 1C. La tinción con el sustrato LacZ 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido (X-gal) reveló distribución extendida de adipocitos transducidos a través de eWAT dos semanas después de la administración unilateralmente intra-eWAT de $2x10^11$ vg/ratón de doble AAV8 que codifica para el gen LacZ bajo el control del promotor CMV ubicuo (AAV8-CMV-LacZ). Ver figura 1D. La administración local de los vectores AAV8 y AAV9-CAG-GFP en el WAT inguinal (iWAT) medió la transducción extensa de adipocitos blancos y cafés en el depósito. Ver figuras 1G y 1H. En conjunto, estos resultados indican que AAV8 y AAV9 son los vectores más adecuados para manejar genéticamente *in vivo* al WAT.

Además, el administración intra-eWAT de los vectores AAV dio por resultado la transducción eventualmente restringida a eWAT. Dos semanas después de la inyección, los animales tratados con AAV1, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9-CAG-GFP no mostraron transducción de los depósitos mesentérico, retroperitoneal e inguinal, en tanto que estuvieron presentes

pocos adipocitos cafés GFP^+ en el iBAT de ratones inyectados intra-eWAT con AAV9. Ver figura 8A. Sin embargo, la expresión transgénica en BAT fue mínima en comparación a aquella detectada en eWAT. Ver figura 8B. Con respecto a la transducción de tejidos no adiposos, la administración intra-eWAT de AAV7, AAV8 y AAV9-CAG-GFP también dio por resultado transferencia génica significativa al hígado y corazón y a un número marginal de células exocrinas del páncreas. Ver figura 8C.

Como prueba del concepto para evaluar si los adipocitos transducidos por AAV *in vivo* puede ser un modelo viable para estudiar la función adiposa, se inyectaron bilateralmente $4x10^{11}$ vg/ratón de vectores AAV9 que codifican para la enzima murina hexocinasa II (mHKII) bajo el control del promotor ubicuo CMV (AAV9-CM-mHKII) o una dosis igual de vectores AAV9-CMV-null en el eWAT de ratones saludables. Dos semanas después de la inyección, los adipocitos aislados de animales tratados con AAV9-CMV-mHKII presentaron un incremento de 3 veces en la expresión de mHKII en comparación con los adipocitos de ratones inyectados con AAV9-CMV-null. Ver figura 1E. Para analizar los efectos de la sobreexpresión mediada por AAV de mHKII en adipocitos, se determinó la captación de 2-[1-^{3}H]desoxi-D-glucosa estimulada con insulina basa *ex vivo* de adipocitos aislados. En los adipocitos transducidos con AAV9-CMV-mHKII, la captación basal de 2-[1-

^{3}H]desoxi-D-glucosa se incrementó ligeramente en comparación a los adipocitos tranducidos con AAV9-CMV-null. En contraste, la estimulación con insulina condujo a un mayor incremento en la captación de 2-[1-^{3}H]desoxi-D-glucosa por adipocitos transducidos con AAV9-CMV-mHKII adipocitos en comparación a los adipocitos de animales tratados con los vectores AAV9-CMV-null. Ver figura 1F.

Ejemplo 2

Manejo genético específico mediado por AAV *in vivo* de adipocitos blancos

El uso de una versión corta del promotor de proteína 2 de adipocito murino (mini/aP2) compuesto principalmente del intensificador específico de adipocito en unión con el promotor basal aP2 se evaluó. Ver Ross, 1990 y Graves, 1,992, *supra*. El propósito de este ensayo fue restringir la expresión transgénica mediada por AAV hacia adipocitos. La administración intra-eWAT unilateral de 10^{12} VG/ratón de AAV8 y AAV9 que codifica para GFP bajo el control de la transducción confinada medida por región reguladora min/aP2 de adipocitos blancos, sin expresión detectable de GFP en el hígado y corazón dos semanas después de la inyección. Ver figuras 2A y 9.

Para evaluar el transcurso de tiempo de la expresión transgénica mediada por la región reguladora mini/aP2 en ratones, se inyectó bilateralmente una dosis de

$4x10^{12}$ vg/ratón de vectores de AAV9 que codifican para el ADNc de fosfatasa alcalina segregada, derivada de placenta humana (hSeAP) bajo el control de la región reguladora mini/aP2 (AAV9-mini/aP2-SeaP) o solución salina, en eWAT, y se midieron los niveles en circulación de hSeAP en diferentes puntos de tiempo después de la administración de AAV. Se detectaron altos niveles de hSeAP en sangre tan pronto como dos semanas después de la distribución de AAV y se incrementó progresivamente hasta el día 40. Posteriormente, los niveles en circulación de hSeAP persistieron durante la duración del seguimiento, al menos un año después de la inyección. La cuantificación de los niveles de expresión de hSeAP en el hígado y eWAT por qPCR confirmaron que eWAT fue el tejido responsable de la mayor producción de hSeAP. Ver figuras 2B-2C.

Para valorar si el manejo genético específico mediado por AAV de adipocitos blancos puede constituir una nueva herramienta para estudiar la función de los adipocitos, la diferenciación y el metabolismo *in vivo* en ratones, se administraron $1.4x10^{12}$ vg/ratón de vectores de AAV9 que codifican para mHKII bajo el control de la región reguladora mini/aP2 (AAV9-mini/aP2-mHKII) o una dosis igual de vectores AAV9-mini/aP2-null al eWAT. Dos semanas después de la inyección, se determinó la captación basal *in vivo* de 2-[1-^{3}H]desoxi-D-glucosa. Los animales que reciben los vectores

AAV9-mini/aP2-mHKII mostraron captación basal incrementada de 2-[1-^{3}H]desoxi-D-glucosa por eWAT en comparación con animales tratados con los vectores AAV9-mini/aP2-null. No se encontró diferencia en la captación de 2-[1-^{3}H]desoxi-D-glucosa bajo condiciones basales entre grupos en iBAT y en tejidos tal como el corazón donde el uso de la región reguladora mini/aP2 impide la expresión transgénica. Ver figura 2D.

Ejemplo 3

Manejo genético *in vivo* de adipocitos café por distribución local de vectores de AAV

En vista que AAV8 y AAV9 fueron los vectores más eficientes que median el manejo genético de adipocitos blancos, se valoró la transducción de adipocitos cafés por los mismos serotipos. Dos semanas después de la administración de $2x10^9$ vg/ratón de los vectores AAV8 y AAV9-CAG-GFP al tejido adiposo café interescapular (iBAT), se detectaron numerosos adipocitos cafés GFP$^+$. Ver figura 3A. La valoración de los niveles de expresión de GFP mediante qPCR reveló mayor eficiencia de transducción de iBAT por AAV8 en comparación con AAV9 a una dosis de $2x10^9$ vg/ratón. Ver figura 3B. Una vez que se demostró la transducción de adipocitos cafés usando los vectores AAV8 y AAV9, se caracterizó la eficiencia de transducción *in vivo* de tejido adiposo café (BAT) con AAV de los serotipos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 9. Para este fin, se inyectó una dosis de $1.2x10^{10}$

vg/ratón de AAV de los serotipos 4 y 8 o una dosis de 10^{11} vg/ratón de AAV de los serotipos 1, 2, 5, 6, 7, 8, y 9 que codifican para la proteína marcadora RFP bajo el control del promotor ubicuo CMV (AAV-CMV-RFP) en el iBAT de ratones. Dos semanas después de la administración intra-iBAT, la cuantificación de los niveles de expresión de RFP mediante qPCR reveló mayor eficiencia de transducción de iBAT por AAV7, AAV8, y AAV9 en comparación con AAV1, 2, 4, 5 y 6. Ver figura 3C. De conformidad, se detectó distribución generalizada de adipocitos café RFP^+ en el iBAT de animales que reciben vectores de AAV9. Ver figura 3D.

Además, la administración intra-iBAT de AAV dio por resultado transducción restringida de este depósito con expresión transgénica indetectable en los depósitos epididimales, mesentéricos, retroperitoneales e inguinales. Con respecto a la transducción de tejidos no adiposos, los animales tratados intra-iBAT con los vectores de AAV7, AAV8, y AAV9 mostraron transducción del corazón e hígado, en tanto que no fue detectable la expresión de GFP en páncreas, intestino, bazo, pulmón, riñón, músculo esquelético, testículos, epidídimos, y cerebro. Ver figura 10.

Ejemplo 4

Manejo genético específico mediado por AAV *in vivo* de adipocitos café

Una región reguladora mini UCP1 (mini/UCP1)

compuesta del intensificador que confiere expresión específica de adipocitos café y el promotor basal del gen UCP1 de rata se utilizó para mediar la expresión de genes de interés en el tejido adiposo café, de forma específica. Ver Boyer B, et al., Mol. Cell Biol. 1991; 11:4147-4156, Kozak U, et al., Mol. Cell Biol. 1994; 14:59-67, Cassard-Doulcier, 1998, y Larose, 1996, supra. Dos semanas después de la administración intra-iBAT de $2x10^{11}$ vg/ratón de los vectores AAV8 o AAV9-mini/UCP1-GFP, se logró la transducción eficiente de adipocitos cafés. Ver figura 4A. De manera similar, la distribución intra-iBAT de $2x10^{11}$ vg/ratón de AAV8 y AAV9-mini/aP2-GFP también transdujo adipocitos cafés. Ver figura 11A. Además, la región reguladora mini/UCP1 logró expresión de GFP altamente específica de adipocitos, anulando completamente la expresión transgénica mediada por AAV en el corazón y mediando solo la transducción marginal de hígado. Ver figura 11B.

Para examinar si la transducción mediada por AAV de iBAT puede ser un nuevo modelo para estudiar la función de adipocitos cafés, se administraron $7x10^{10}$ vg/ratón de vectores AAV8-mini/UCP1-mHKII a iBAT. Los animales que reciben los vectores AAV8-mini/UCP1-mHKII mostraron captación basal incrementada de 2-[1-^{3}H]desoxi-D-glucosa por iBAT en comparación con animales tratados con vectores AAV8-mini/UCP1-null y no se encontró diferencia en la captación de

2-[1-^{3}H]desoxi-D-glucosa bajo condiciones basales entre grupos en eWAT y corazón. Ver figura 4B. Entonces, se distribuyeron intra-iBAT $2x10^{11}$ vg/ratón de vectores AAV9-mini/UCP1-$VEGF_{164}$ o de vectores AAV9-mini/UCP1-null. Dos semanas después de la inyección, los animales que reciben los vectores AAV9-mini/UCP1-$VEGF_{164}$ mostraron sobreexpresión de $VEGF_{164}$ y niveles incrementados de VEGF total en iBAT en comparación a animales tratados con los vectores AAV9-mini/UCP1-null. Además, se obtuvo la sobreexpresión PECAM1 (un marcador de células endoteliales comúnmente usado) en animales que sobreexpresan $VEGF_{164}$. Los animales tratados con los vectores AAV9-mini/UCP1-$VEGF_{164}$ mostraron números incrementados de vasos en comparación a los animales que reciben los vectores AAV9-mini/UCP1-null como se demuestra por inmunotinción contra α-SMA en iBAT. Ver figuras 4C-4F.

Ejemplo 5

Manejo genético *in vivo* de adipocitos blancos y cafés por administración sistémica de AAV8 y AAV9

Se administró una dosis de $5x10^{12}$ vg/ ratón de los vectores AAV8 o AAV9-CAG-GFP mediante la vena de la cola a ratones delgados. La transducción de los depósitos adiposos se evaluó dos semanas después de la inyección. La inmunotinción contra GFP de secciones de eWAT mostró la transducción mediada por AAV8 y AAV9 de adipocitos blancos. Además, la medición de los niveles de expresión de GFP y el

contenido de GFP demostró eficiencias similares de transducción tanto para AAV8 como para AAV9. Además, la distribución sistémica de $5x10^{12}$ vg/ratón de los vectores AAV8 o AAV9 medió la transducción de adipocitos café de iBAT de forma eficiente. La medición de los niveles de expresión de GFP por qPCR y contenido de GFP por análisis fluorométrico sugirió que AAV8 presentó una tendencia hacia exhibir eficiencia superior de transducción de iBAT que el AAV9. Además, la medición de los niveles de expresión de GFP mediante qPCR demostró transferencia génica a los depósitos inguinales, retroperitoneales y mesentéricos. Sin embargo, se observaron diferencias notables en las deficiencias de transducción entre los depósitos. Ver figuras 5A-5H. De manera importante, la administración iv de los vectores AAV8 o AAV9 a ratones ob/ob diabéticos-obesos o ratones db/db también dio por resultado el manejo genético de WAT y BAT, con eficiencias similares a aquellas logradas en ratones delgados. Ver figura 13. La administración sistémica de los vectores AAV8 o AAV9-CAG-GFP transdujo una diversidad de tejidos no adiposos. Ver figura 12.

Ejemplo 6

Manejo genético específico *in vivo* de adipocitos blancos y cafés con vectores AAV-mini/aP2 y AAV-mini/UCP1

La distribución genética de $2x10^{12}$ vg/ratón de AAV8 o AAV9-mini/aP2-GFP dio por resultado la transducción de

adipocitos blancos y cafés aunque se permitieron niveles bajos de expresión transgénica. Ver figura 7A. En contraste, la administración sistémica de $2x10^{12}$ vg/ratón de vectores AAV8 o AAV9-mini/UCP1-GFP medió transducción significativa de adipocitos café. Ver figura 6A. Además, los vectores AAV-mini/aP2-GFP y AAV-mini/UCP1-GFP distribuidos intravenosamente lograron expresión de GFP altamente específica de adipocitos, sin expresión transgénica detectable en el corazón y transducción marginal del hígado, que solo presentó unos pocos hepatocitos GFP^+ dispersados. Ver figuras 7B-7C.

Para demostrar adicionalmente el manejo genético de adipocitos mediante la administración sistémica de AAV, en la vena de cola se administraron $2x10^{12}$ vg de los vectores AAV9-mini/UCP1-$VEGF_{164}$ o AAV9-mini/UCP1-null. Dos meses después de la inyección, los animales que reciben los vectores AAV9-mini/UCP1-$VEGF_{164}$ mostraron expresión incrementada de $VEGF_{164}$ y VEGF total en comparación a los animales tratados con los vectores AAV9-mini/UCP1-null. Ver figuras 6B-6C. Además, en la vena de cola también se administró una dosis de $8x10^{12}$ vg de los vectores AAV9-mini/UCP1-$VEGF_{164}$ o AAV9-mini/UCP1-null. Un mes después de la inyección, los animales que reciben $8x10^{12}$ vg de los vectores AAV9-mini/UCP1-$VEGF_{164}$ mostraron expresión incrementada de $VEGF_{164}$ y PECAM1 y densidad incrementada de vasos. Ver figuras 6D-6G.

Ejemplo 7

Manejo genético específico *in vivo* de adipocitos cafés con AAV-mini/aP2-GK

Una dosis de $2X10^{11}$ vg/ratón de ya sea los vectores de AAV9 que codifican para la enzima glucocinasa de rata bajo el control de la región reguladora mini/aP2 (AAV9-mini/ aP2-RGK) o una dosis igual de vectores AAV9-mini/aP2-null se administrará localmente al iBAT de ratones. Dos semanas/Un mes después de la inyección, se determinará la captación basal *in vivo* y estimulada por insulina de 2-[1-^{3}H]desoxi-D-glucosa a fin de evaluar si los animales que reciben los vectores AAV9-mini/aP2-rGK mostraron captación basal incrementada de 2-[1-^{3}H]desoxi-D-glucosa específicamente por iBAT en comparación con animales tratados con los vectores AAV9-mini/aP2-null.

Ejemplo 8

Transducción eficiente de adipocitos y des-selección como diana de expresión transgénica de hígado y corazón con secuencias mirT después de la administración sistémica de vectores de AAV.

Una dosis de 10^{12} vg/ratón de vectores de AAV9 que codifican par la proteína marcadora GFP bajo el control del promotor CAG ubicuo (AAV9-CAG-GFP) o el promotor CAG con la adición de cuatro sitios diana en tándem del miR122a específico de hígado (AAV9-CAG-GFP-miRT122), el miR1

específico de corazón (AAV9-CAG-GFP-miRT1) o ambos (AAV9-CAG-GFP-doblemiRT), clonado en el 3'UTR del casete de expresión, se administró de manera sistémica. Dos semanas después de la inyección, se observaron altos niveles de expresión de GFP en adipocitos blancos y cafés de ratones que reciben los vectores AAV9-CAG-GFP, AAV9-CAG-GFP-miRT122, AAV9-CAG-GFP-miRT1 o AAV9-CAG-GFP-doblemiRT. En contraste, la producción de GFP en el hígado o corazón se anuló casi completamente en ratones tratados con los vectores AAV9-CAG-GFP-miRT122 o AAV9-CAG-GFP-miRT1, respectivamente. De forma notable, la producción de GFP se inhibió en su mayor parte tanto en el hígado como en el corazón de ratones tratados con AAV9-CAG-GFP-doblemiRT. Ver figura 14.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la presente invención, es el que resulta claro a partir de la presente descripción de la invención.

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

1. Un vector viral adeno-asociado que comprende un genoma viral recombinante, caracterizado porque el genoma viral recombinante comprende un casete de expresión que comprende una región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo operativamente enlazado a un polinucleótido de interés.

2. El vector viral adeno-asociado de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el serotipo del AAV se selecciona del grupo que consiste de AAV6, AAV7, AAV8, y AAV9.

3. El vector viral adeno-asociado de conformidad con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo comprende una región promotora seleccionada del grupo que consiste del promotor aP2 basal y el promotor UCP1 basal.

4. El vector viral adeno-asociado, de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque la región reguladora transcripcional específica de tejido adiposo comprende además una región intensificadora operativamente enlazada a la región promotora.

5. El vector viral adeno-asociado de conformidad

con la reivindicación 4, caracterizado porque la región intensificadora se selecciona del grupo que consiste del intensificador aP2 específico de adipocitos y el intensificador UCP1 específico de adipocitos.

6. El vector viral adeno-asociado de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque la región reguladora transcripcional se selecciona del grupo consiste de:

(i) un polinucleótido que comprende el intensificador aP2 específico de tejido y promotor aP2 murino, basal, y

(ii) un polinucleótido que comprende el intensificador UCP1 específico de adipocito y el promotor UCP1 de rata, basal.

7. El vector viral adeno-asociado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el casete de expresión comprende además, una región reguladora post-transcripcional.

8. El vector viral adeno-asociado de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque la región reguladora post-transcripcional es el elemento regulador post-transcripcional de virus de hepatitis de la marmota (WPRE).

9. El vector viral adeno-asociado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado

porque el polinucleótido de interés codifica para una proteína que se selecciona del grupo que consiste de una proteína segregada que actúa de manera sistémica y una proteína que actúa sobre o en la vencida del adipocito.

10. El vector viral adeno-asociado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el polinucleótido de interés codifica para una proteína seleccionada del grupo que consiste de hexocinasa, glucocinasa, fosfatasa alcalina, y factor de crecimiento endotelial vascular.

11. El vector viral adeno-asociado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque las ITR del virus adeno-asociado son AAV2 ITR.

12. El vector viral adeno-asociado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque comprende además al menos una secuencia diana miARN.

13. El vector viral adeno-asociado de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque la por lo menos una secuencia diana de miARN es mirT122a.

14. El vector viral adeno-asociado de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque la por lo menos una secuencia diana de miARN es mirT1.

15. El vector viral adeno-asociado, de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque comprende al menos una copia de mirT1 y una copia de mirT122a.

16. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende un vector viral adeno-asociado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

17. El uso del vector viral adeno-asociado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, o la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 16 en medicina.

18. El uso del vector viral adeno-asociado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, o la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 16 en el tratamiento o prevención de una enfermedad que requiere una expresión del polinucleótido de interés en el tejido adiposo.

19. El uso del vector viral adeno-asociado de conformidad con la reivindicación 17, en donde el tejido adiposo comprende tejido adiposo blanco.

20. El uso del vector viral adeno-asociado de conformidad con la reivindicación 17, en donde el tejido adiposo comprende tejido adiposo café.

21. El uso del vector viral adeno-asociado de conformidad con la reivindicación 17, en donde el vector viral adeno-asociado, o la composición farmacéutica se administra de manera sistémica o de forma local.

22. Un método *in vitro* para transducir una célula, caracterizado porque comprende poner en contacto la célula

con un vector viral adeno-asociado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

23. Un método *in vitro* de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque la célula es un adipocito.

24. Un método *in vitro* de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado porque el adipocito es un adipocito blanco o un adipocito café.

25. Un adipocito, caracterizado porque se ha obtenido por el método de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24.

26. Un polinucleótido que comprende un casete de expresión flanqueado por ITR de virus adeno-asociado, caracterizado porque el casete de expresión comprende una región reguladora específica de tejido adiposo operativamente enlazado a un polinucleótido de interés.

27. El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque la región reguladora específica de tejido adiposo comprende una región promotora seleccionada del grupo que consiste del promotor aP2 basal y del promotor UCP1 basal.

28. El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque la región reguladora específica de tejido adiposo comprende además una región intensificadora operativamente enlazada con la región

promotora.

29. El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque que la región intensificadora se selecciona del grupo que consiste del promotor aP2 específico de adipocito y el intensificador UCP1 específico de adipocito.

30. El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque la región reguladora se selecciona del grupo que consiste de:

(i) un polinucleótido que comprende el intensificador aP2 específico de adipocito y el promotor aP2 murino basal y

(ii) un polinucleótido que comprende el intensificador UCP1 específico de adipocito y el promotor UCP1 de rata, basal.

31. El polinucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30, caracterizado porque el casete de expresión comprende además, un elemento regulador pos-transcripcional.

32. El polinucleótido de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque la región reguladora post-transcripcional es elemento regulador pos-transcripcional de virus de hepatitis de la marmota (WPRE).

33. El polinucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, caracterizado porque el

polinucleótido de interés codifica para una proteína seleccionada del grupo que consiste de hexocinasa, glucocinasa, fosfatasa alcalina, y factor de crecimiento endotelial vascular.

34. Un vector o un plásmido, caracterizado porque comprende un polinucleótido que codifica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 33.

35. Un vector viral adeno-asociado, caracterizado porque comprende un genoma viral que comprende un polinucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 33.

36. Un método para obtener un vector viral adeno-asociado, caracterizado porque comprende los pasos de:

(i) proporcionar una célula que comprende un polinucleótido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 33, proteínas cap de AAV, proteínas rep de AAV y proteínas virales de las cuales es dependiente el AAV para la replicación,

(ii) mantener la célula bajo condiciones adecuadas para el montaje del AAV y

(iii) purificar el vector viral adeno-asociado producido por la célula.

37. El método de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado porque las proteínas en las cuales es dependiente el AAV para replicación se derivan de adenovirus.

38. El método de conformidad con las reivindicaciones 36 o 34, caracterizado porque las proteínas rep o cap del virus adeno-asociado se derivan de un serotipo de AAV seleccionado del grupo que consiste de los serotipos AAV6, AAV7, AAV8, y AAV9.

39. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38, caracterizado porque el paso (iii) se lleva a cabo adicionalmente por un paso de precipitación con polietilenglicol o un fraccionamiento gradiente con cloruro de cesio.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a vectores virales adeno-asociados útiles para transducir tejido adiposo. La invención también se refiere a polinucleótidos, plásmidos, vectores y métodos para la producción de estos vectores virales adeno-asociados. La invención también se refiere a métodos de terapia génica útiles para el tratamiento de una enfermedad que requiere la regulación de los niveles de expresión de un gen.

FIG. 1A

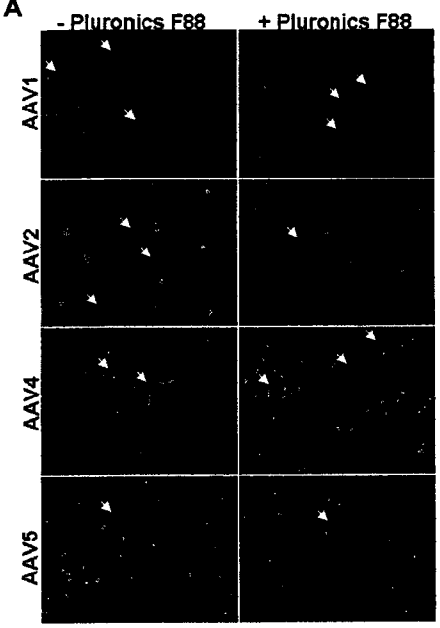


FIG. 1B

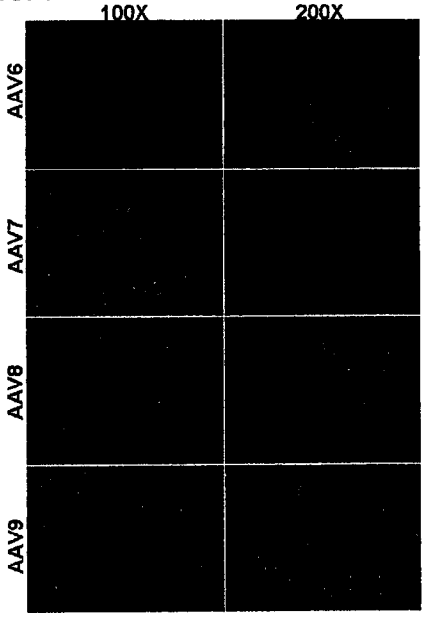


FIG. 1C

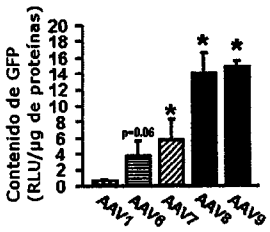


FIG. 1D

FIG. 1E

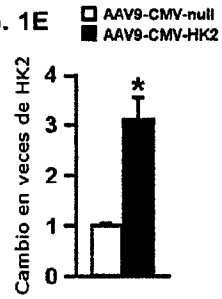


FIG. 1F

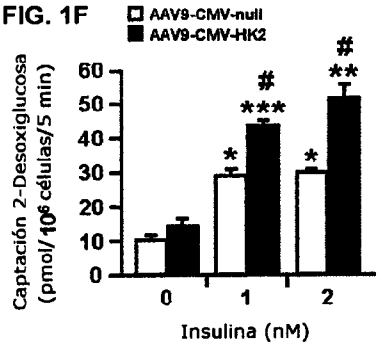


FIG. 1G

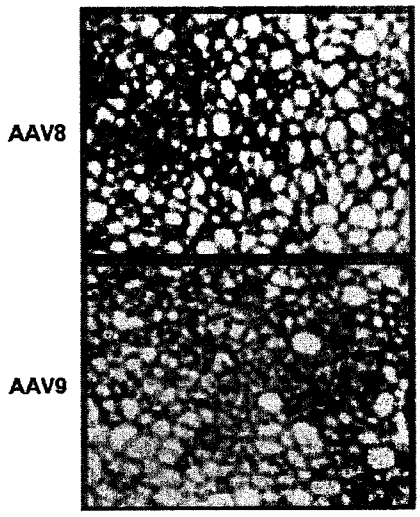


FIG. 1H

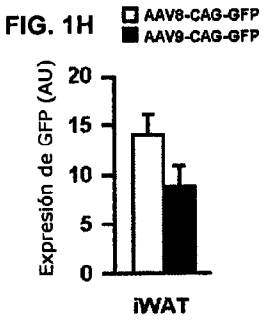


FIG. 2A

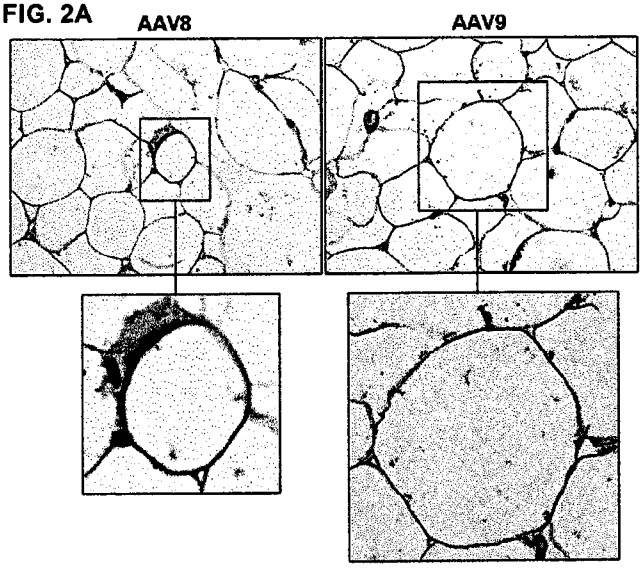

AAV8
AAV9

FIG. 2B

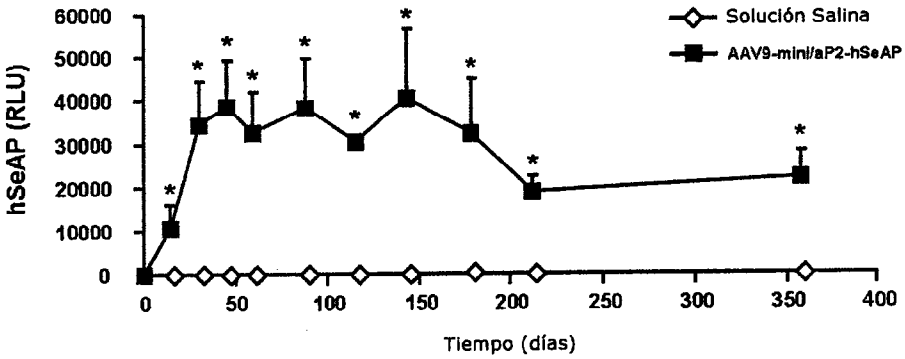

Solución Salina
AAV9-mini/aP2-hSeAP
hSeAP (RLU)
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
50
100
150
200
250
300
350
400
Tiempo (días)

FIG. 2C

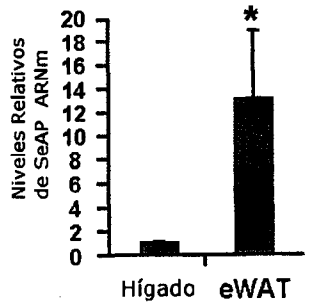

Niveles Relativos de SeAP ARNm
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
*
Hígado
eWAT

FIG. 2D

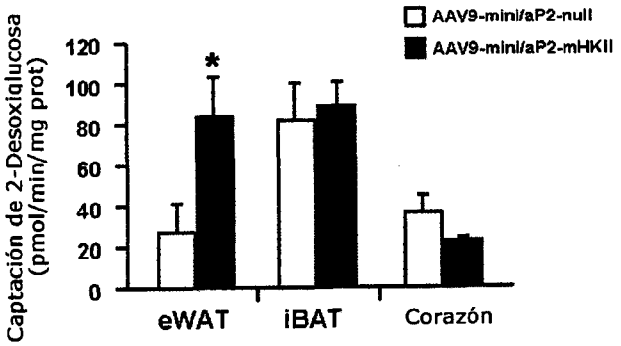

AAV9-mini/aP2-null
AAV9-mini/aP2-mHKII
Captación de 2-Desoxiglucosa (pmol/min/mg prot)
120
100
80
60
40
20
0
*
eWAT
iBAT
Corazón

FIG. 3A

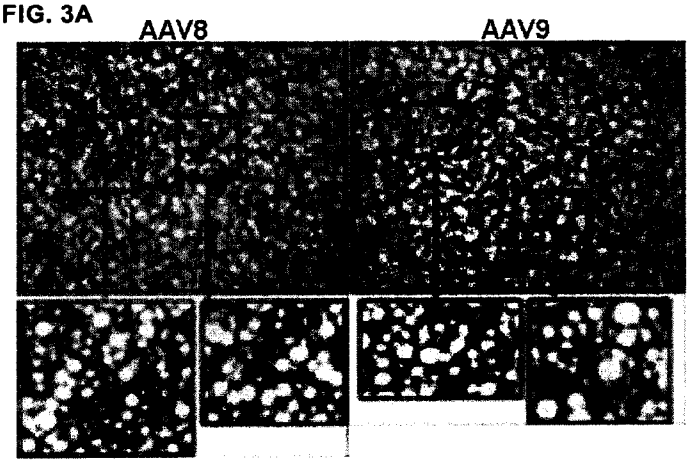


FIG. 3B

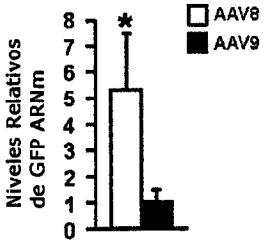


FIG. 3C

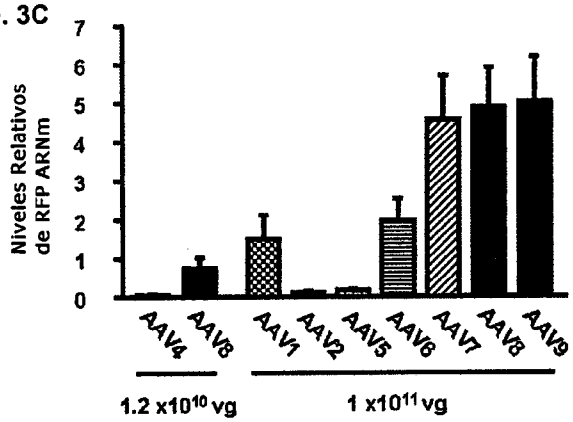


FIG. 3D

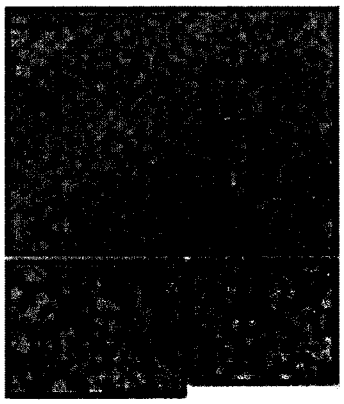


FIG. 4A

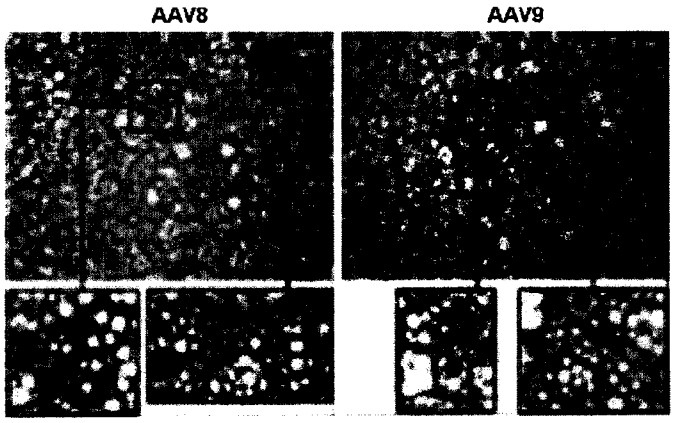

AAV8
AAV9

FIG. 4B

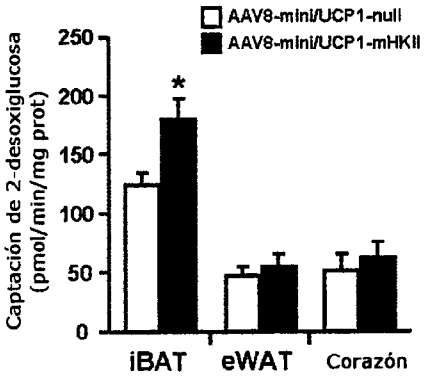

AAV8-mini/UCP1-null
AAV8-mini/UCP1-mHKII
Captación de 2-desoxiglucosa (pmol/min/mg prot)
250
200
150
100
50
0
*
iBAT
eWAT
Corazón

FIG. 4C

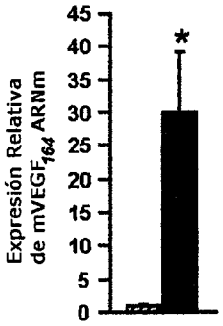


FIG. 4D

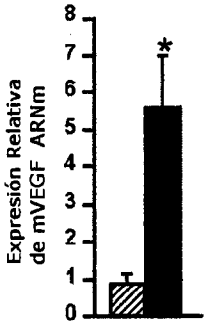


FIG. 4E

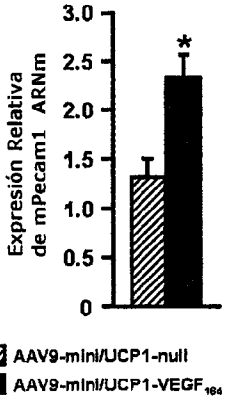


FIG. 4F

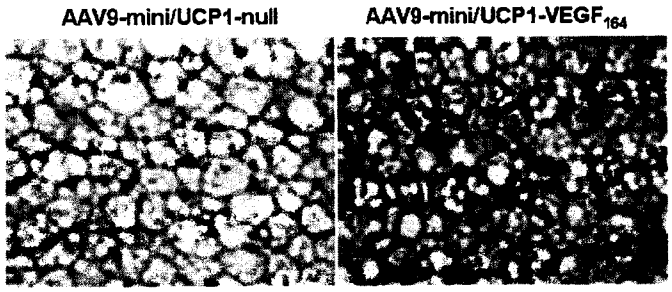


FIG. 5A

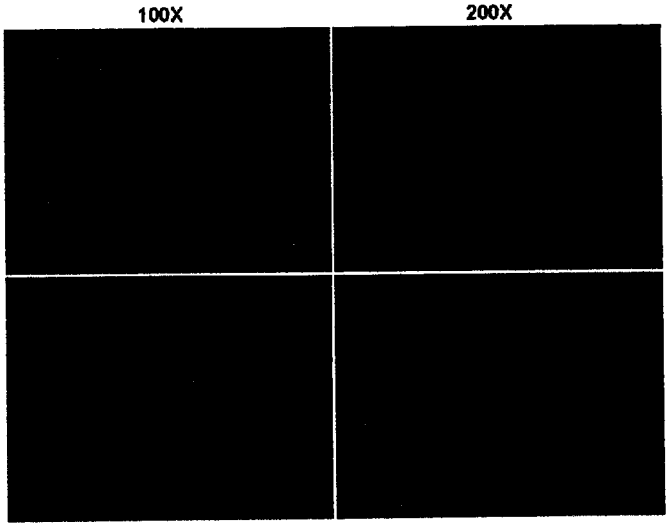


FIG. 5B

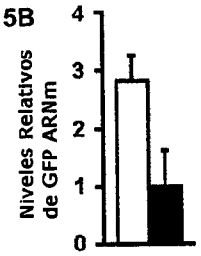


FIG. 5C

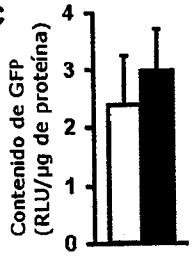


FIG. 5E

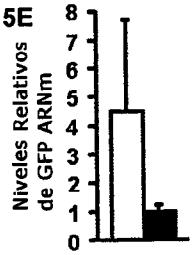


FIG. 5F

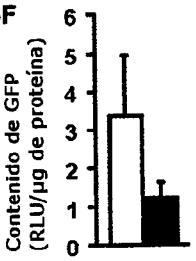


FIG. 5D

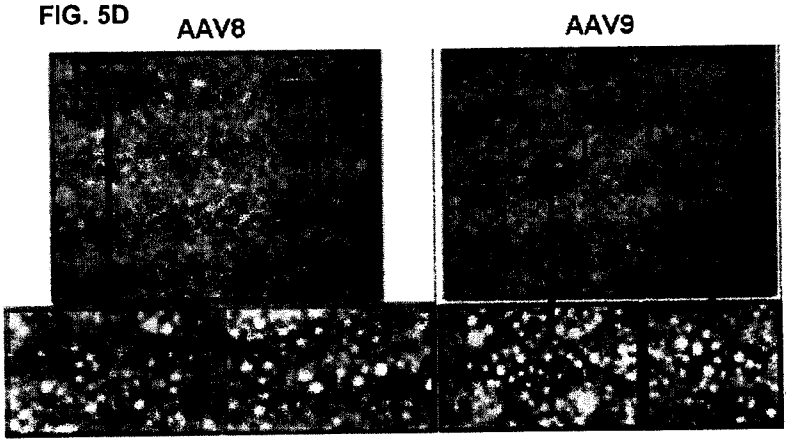


FIG. 5G

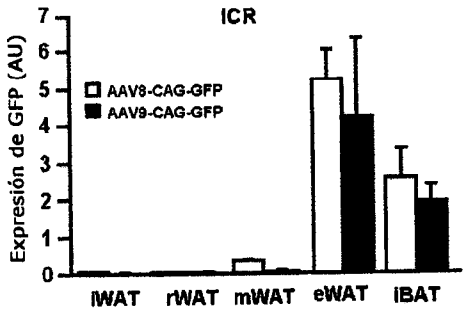


FIG. 5H

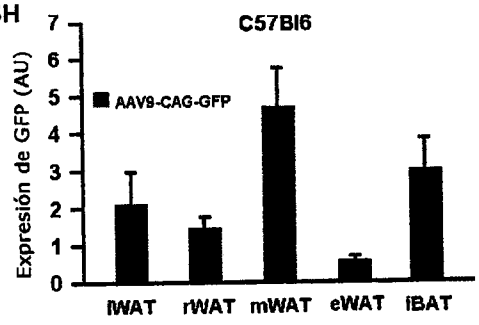


FIG. 6A

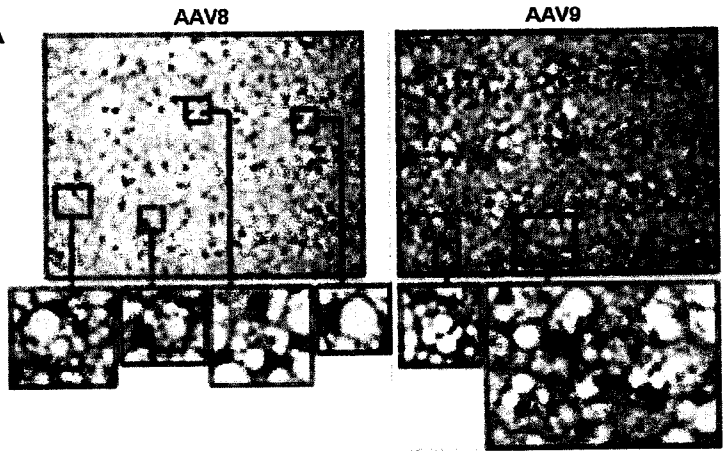


FIG. 6B

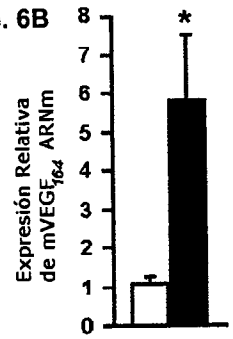


FIG. 6C

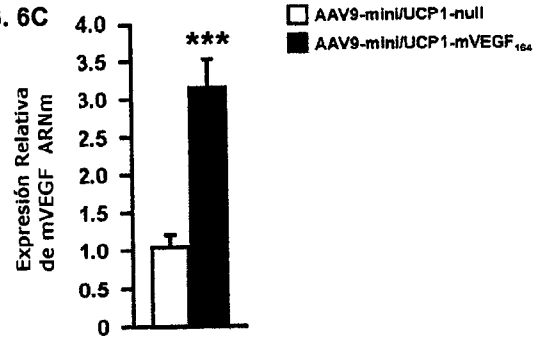


FIG. 6D

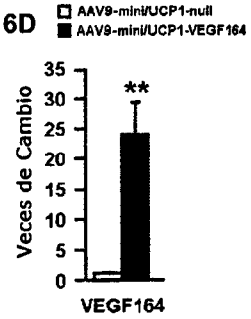


FIG. 6F

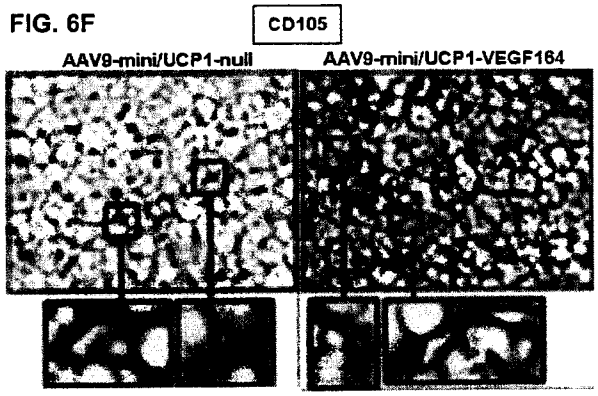


FIG. 6E

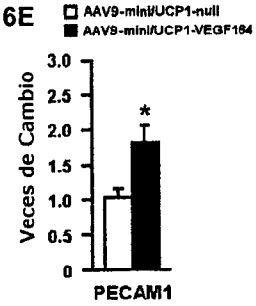


FIG. 6G

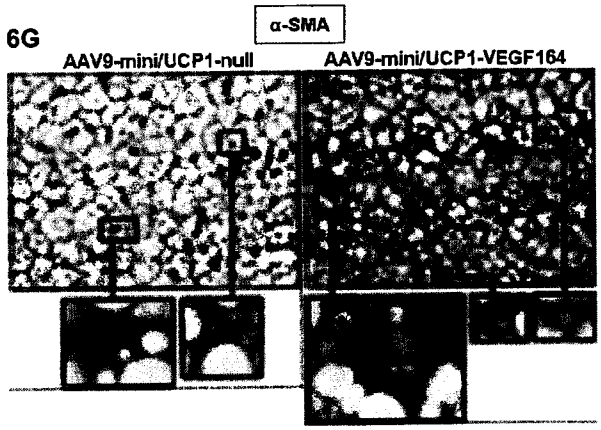


FIG. 7A

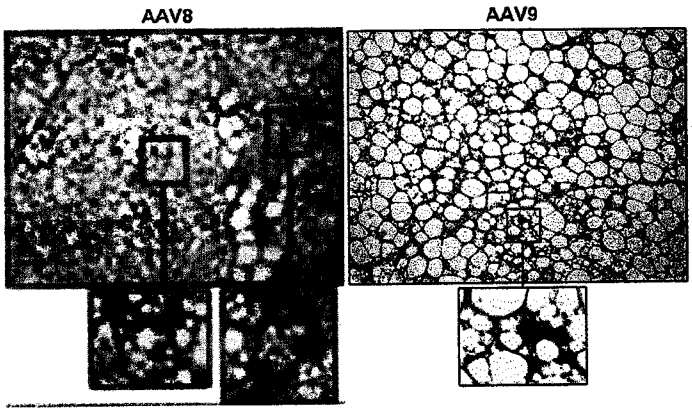


FIG. 7B

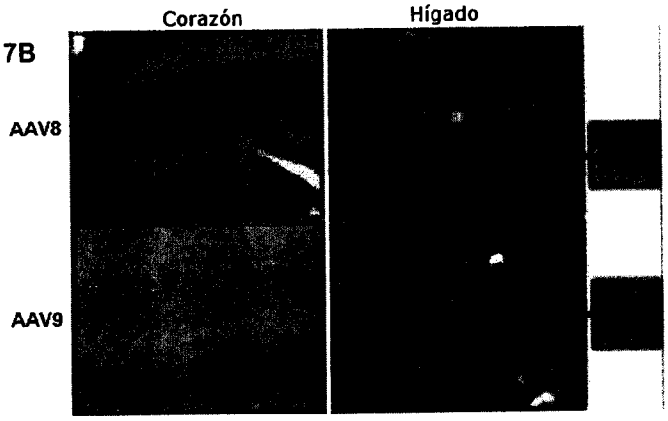


FIG. 7C

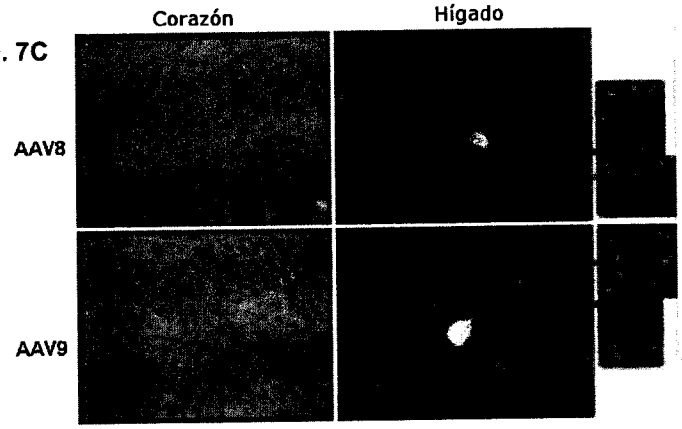


FIG. 8A

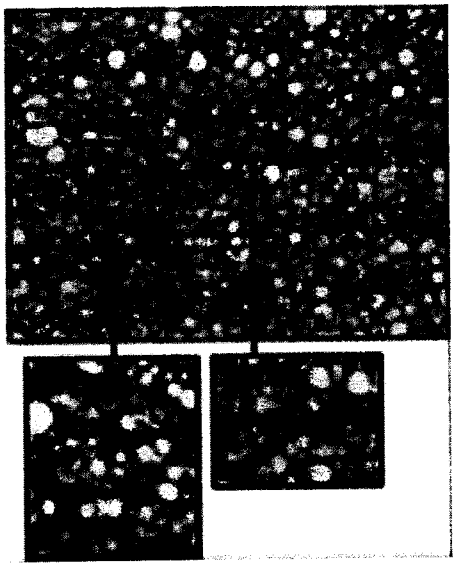


FIG. 8B

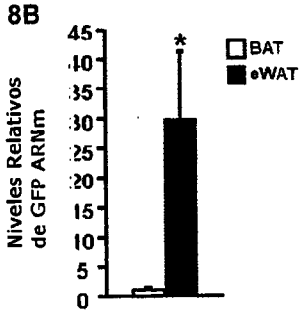
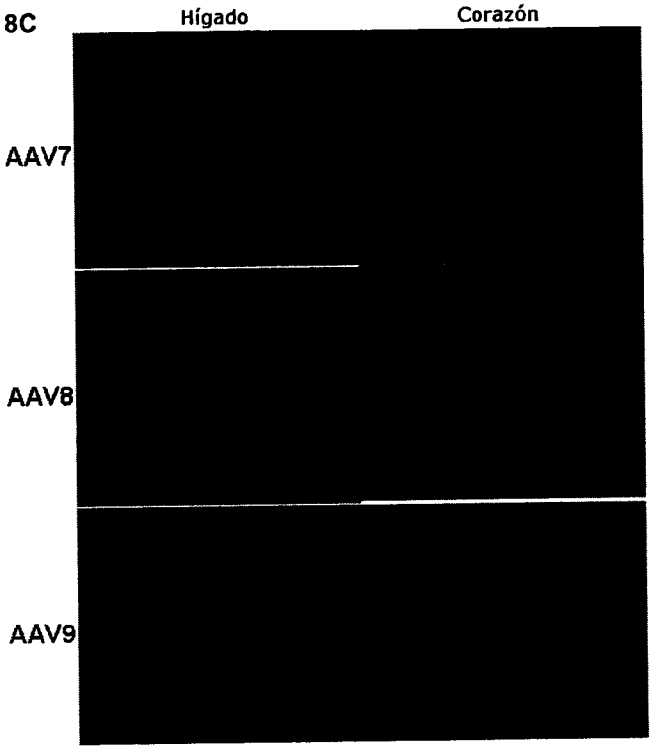


FIG. 8C



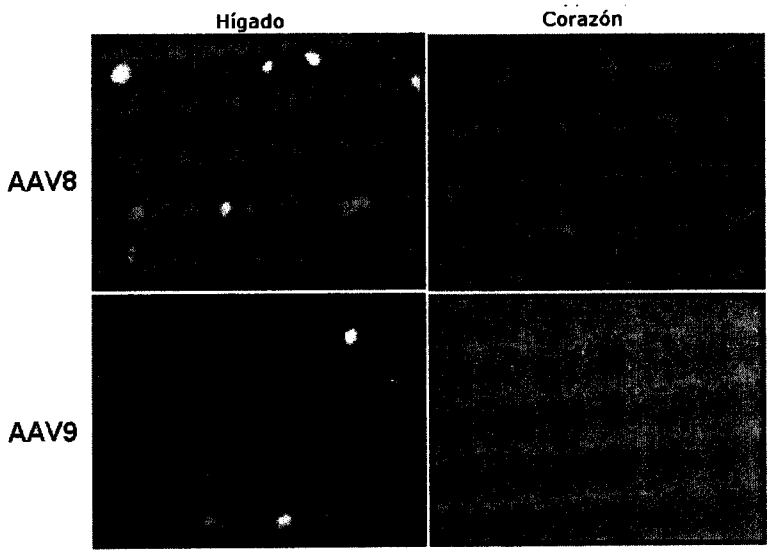


FIG. 9

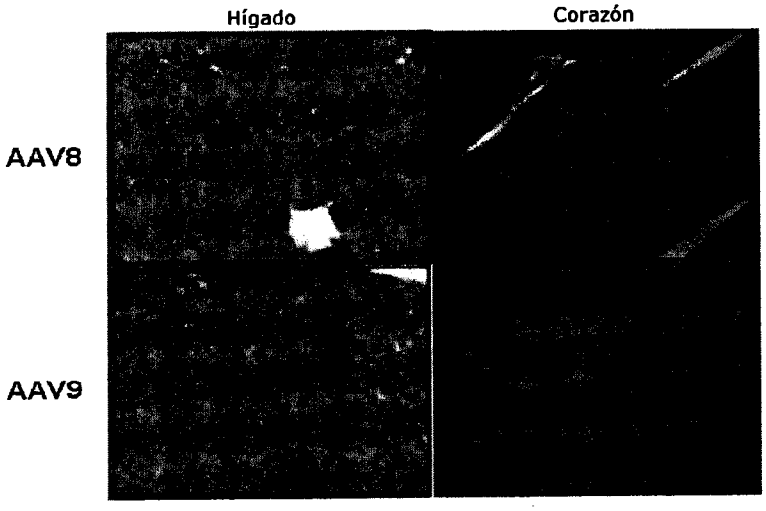


FIG. 10

FIG. 11A

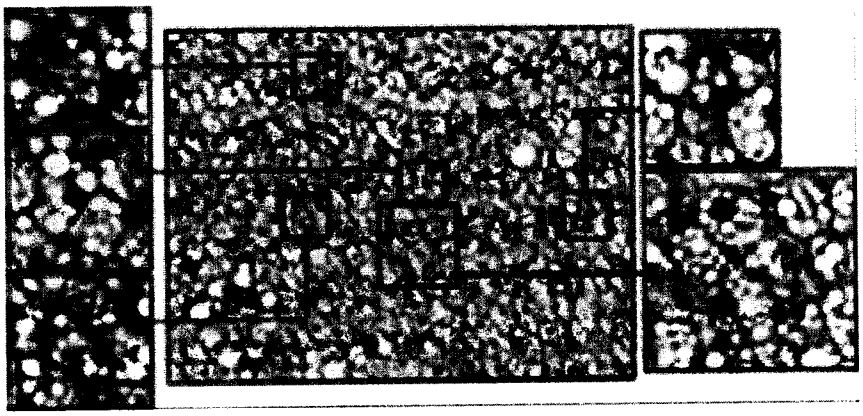
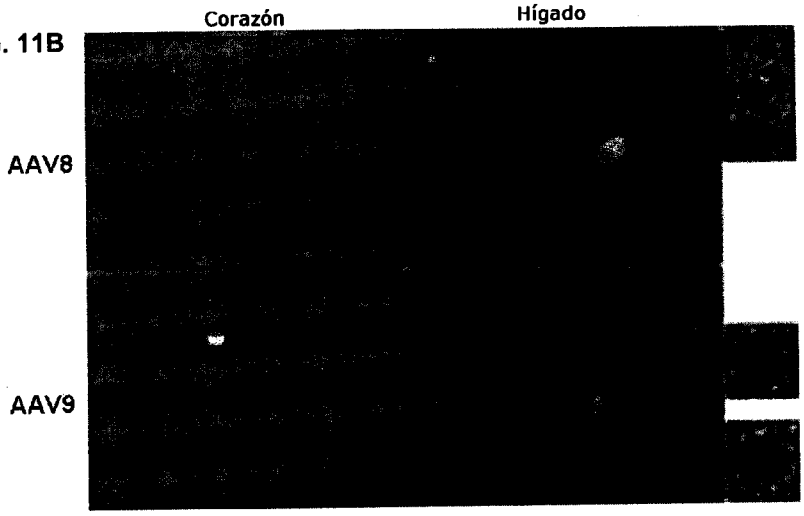


FIG. 11B



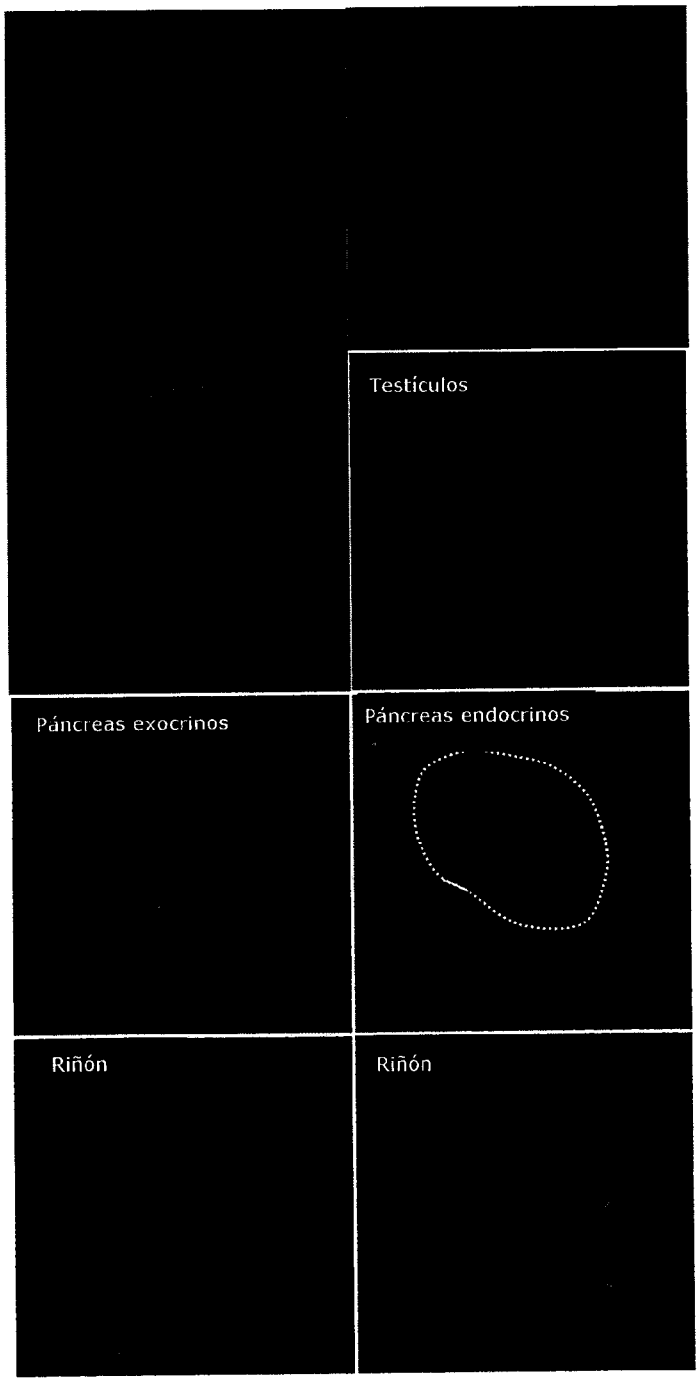

Testículos
Páncreas exocrinos
Páncreas endocrinos
Riñón
Riñón

FIG. 12

FIG. 13A

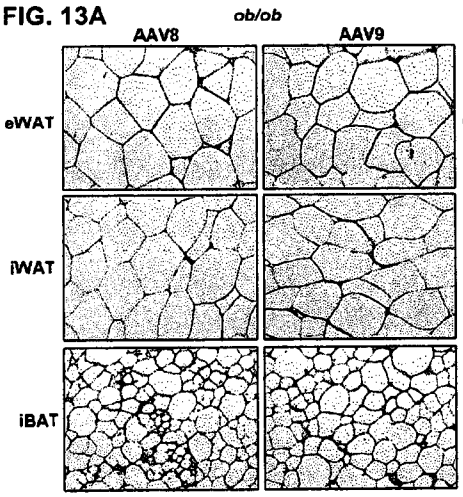


FIG. 13C

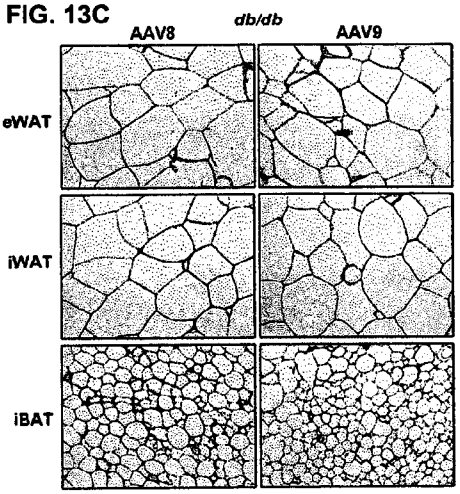


FIG. 13B

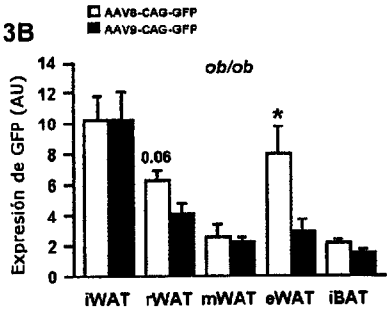
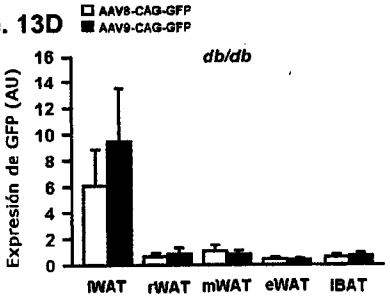


FIG. 13D



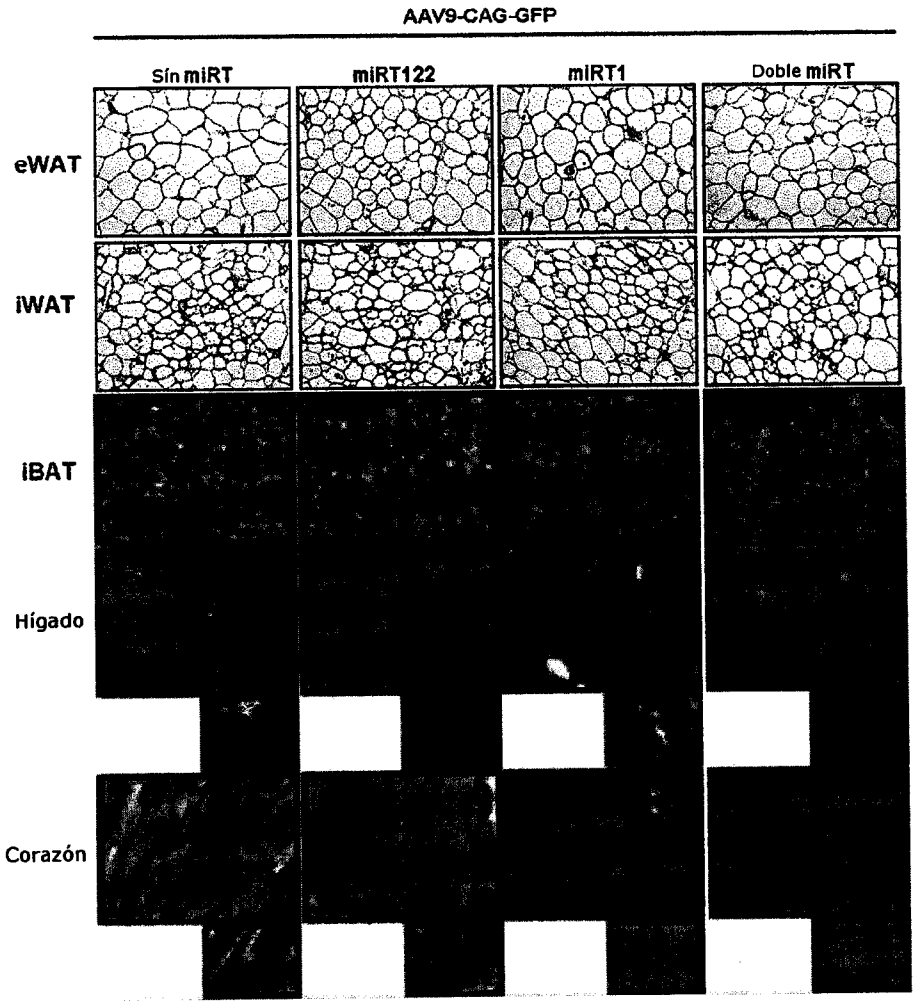

AAV9-CAG-GFP
Sín miRT
miRT122
miRT1
Doble miRT
eWAT
iWAT
iBAT
Hígado
Corazón

FIG. 14

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad Autónoma de Barcelona

<120> VECTORES VIRALES ADENO-ASOCIADOS ÚTILES PARA TRANSDUCIR TEJIDO ADIPOSO

<130> P8602EP00

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1644
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Intensificador de citomegalovirus y promotor constitutivo de beta-actina de pollo

<400> 1
tcgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag 60

cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc 120

caacgacccc cgcccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg 180

gactttccat tgacgtcaat gggtggagta tttacggtaa actgcccact tggcagtaca 240

tcaagtgtat catatgccaa gtacgccccc tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc 300

ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt 360

attagtcatc gctattacca tggtcgaggt gagccccacg ttctgcttca ctctccccat 420

ctccccccgc tccccacccc caattttgta tttatttatt ttttaattat tttgtgcagc 480

gatgggggcg gggggggggg gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg 540

gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagtt 600

tcctttttatg gcgaggcggc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc 660

gggagtcgct gcgttgcctt cgccccgtgc cccgctccgc gccgcctcgc gccgcccgcc 720

ccggctctga ctgaccgcgt tactcccaca ggtgagcggg cgggacggcc cttctcctcc 780

gggctgtaat tagcgcttgg tttaatgacg gcttgtttct tttctgtggc tgcgtgaaag 840

ccttgagggg ctccgggagg gccctttgtg cgggggggagc ggctcggggg gtgcgtgcgt 900

gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgcgtgcgg ctccgcgctg cccggcggct gtgagcgctg 960

cgggcgcggc gcggggcttt gtgcgctccg cagtgtgcgc gaggggagcg cggccggggg 1020

cggtgccccg cggtgcgggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg 1080

tgggggggtg agcaggggggt gtgggcgcgt cggtcgggct gcaacccccc ctgcaccccc 1140

ctccccgagt tgctgagcac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtacg gggcgtggcg 1200

cggggctcgc cgtgccgggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc ggggcggggc 1260

cgcctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg cccccggagc gccggcggct 1320

gtcgaggcgc ggcgagccgc agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgcagg 1380

gacttccttt gtcccaaatc tgtgcggagc cgaaatctgg gaggcgccgc cgcacccccct 1440

ctagcgggcg cggggcgaag cggtgcggcg ccggcaggaa ggaaatgggc ggggagggcc 1500

ttcgtgcgtc gccgcgccgc cgtcccccttc tccctctcca gcctcggggc tgtccgcggg 1560

gggacggctg ccttcggggg ggacggggca gggcggggtt cggcttctgg cgtgtgaccg 1620

gcggctctag agcctctgct aacc 1644

<210> 2
<211> 600
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Intensificador aP2 específico de adipocito y promotor aP2 murino basal

<400> 2
aattccagca ggaatcaggt agctggagaa tcgcacagag ccatgcgatt cttggcaagc 60

catgcgacaa aggcagaaat gcacatttca cccagagaga agggattgat gtcagcagga 120

agtcaccacc cagagagcaa atggagttcc cagatgcctg acatttgcct tcttactgga 180

tcagagttca ctagtggaag tgtcacagcc caaacactcc cccaaagctc agcccttcct 240

tgccttgtaa caatcaagcc gctcctggat gaactgctcc gccctctgtc tctttggcag 300

ggttggagcc cactgtggcc tgagcgactt ctatggctcc cttttctgtg attttcatgg 360

tttctgagct cttttccccc gctttatgat tttctctttt tgtctctctc ttgctaaacc 420

tccttcgtat atatgccctc tcaggtttca tttctgaatc atctactgtg aactattccc 480

attgtttgcc agaagccccc tggttcttcc ttctagacac caggcaaggg gcaggaggta 540

agaggcagga gtccataaaa cagccctgag agcctgctgg gtcagtgcct gctgtcagaa 600

<210> 3
<211> 722
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Intensificador UCP1 específico de adipocito and promotor UCP1 basal de rata

<400> 3
gacgtcacag tgggtcagtc acccttgatc acactgcacc agtcttcacc tttccacgct 60

tcctgccaga gcatgaatca ggctctctgg ggataccggc ctcaccccta ctgaggcaaa 120

ctttctccca cttctcagag gctctgaggg cagcaaggtc agccctttct ttggaatcta 180

gaaccactcc ctgtcttgag ctgacatcac agggcaggca gatgcagcag ggaagggcct 240

gggactggga cgttcatcct acaagaaagc tgtggaactt ttcagcaaca tctcagaaat 300

cagatcgcac ttattcaaag gagccaggcc ctgctctgcg ccctggtgga ggctcctcat 360

gtgaagagtg acaaaaggca ccatgttgtg gatacggggc gaagcccctc cggtgtgtcc 420

tccaggcatc atcaggaact agtgccaaag cagaggtgct ggccagggct ttgggagtga 480

cgcgcgtctg ggaggcttgt gcgcccaggg cacgcccctg ccgattccca ctagcaggtc 540

ttgggggacc tgggccggct ctgcccctcc tccagcaatc gggctataaa gctcttccaa 600

gtcagggcgc agaagtgccg ggcgatccgg gcttaaagag cgagaggaag ggacgctcac 660

ctttgagctc ctccacaaat agccctggtg gctgccacag aagttcgaag ttgagagttc 720

gg 722

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido homosentido de RFP

<400> 4
gcggccacta cacctgcgac 20

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido de RFP

<400> 5
tcggcgtgct cgtactgctc 20

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido homosentido de mHkII

<400> 6
gaaggggcta ggagctacca 20

<210> 7
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido de mHkII

<400> 7
ctcggagcac acggaagtt 19

<210> 8
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido homosentido de hSEAP

<400> 8
cggctgttgg gcactga 17

<210> 9
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido de hSEAP

<400> 9
ggaaggtccg ctggattga 19

<210> 10
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido homosentido de mVEGF164

<400> 10
agacagaaca aagccagaaa tcac 24

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido de mVEGF164

<400> 11
cacgtctgcg gatcttggac 20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido homosentido de total mVEGF

<400> 12
aaaaacgaaa gcgcaagaaa 20

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido de total mVEGF

<400> 13
tttctccgct ctgaacaagg 20

<210> 14
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido homosentido de mPECAM1

<400> 14
ctggtgctct atgcaagcct c 21

<210> 15
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido de mPECAM1

<400> 15
cggtgctgag acctgcttt 19

<210> 16
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido homosentido de GFP

<400> 16
aagttcatct gcaccaccg 19

<210> 17
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido antisentido de GFP

<400> 17
tccttgaaga agatggtgcg c 21

<210> 18
<211> 2210
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VP1 de AAV9

<400> 18
atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc 60

agtggtgggc tttgaaacct ggagcccctc aacccaaggc aaatcaacaa catcaagaca 120

acgctcgagg tcttgtgctt ccgggttaca aataccttgg acccggcaac ggactcgaca 180

aggggagcc ggtcaacgca gcagacgcgg cggccctcga gcacgacaag gcctacgacc 240

agcagctcaa ggccggagac aacccgtacc tcaagtacaa ccacgccgac gccgagttcc 300

aggagcggct caaagaagat acgtcttttg ggggcaacct cgggcgagca gtcttccagg 360

ccaaaaagag gcttcttgaa cctcttggtc tggttgagga agcggctaag acggctcctg 420

gaaagaagag gcctgtagag cagtctcctc aggaaccgga ctcctccgcg ggtattggca 480

aatcgggtgc acagcccgct aaaaagagac tcaatttcgg tcagactggc gacacagagt 540

cagtcccaga ccctcaacca atcggagaac ctcccgcagc cccctcaggt gtgggatctc 600

ttacaatggc ttcaggtggt ggcgcaccag tggcagacaa taacgaaggt gccgatggag 660

tgggtagttc ctcgggaaat tggcattgcg attcccaatg gctgggggac agagtcatca 720

ccaccagcac ccgaacctgg gccctgccca cctacaacaa tcacctctac aagcaaatct 780

ccaacagcac atctggagga tcttcaaatg acaacgccta cttcggctac agcacccccc 840

gggggtattt tgacttcaac agattccact gccacttctc accacgtgac tggcagcgac 900

tcatcaacaa caactgggga ttccggccta agcgactcaa cttcaagctc ttcaacattc 960

aggtcaaaga ggttacggac aacaatggag tcaagaccat cgccaataac cttaccagca 1020

cggtccaggt cttcacggac tcagactatc agctcccgta cgtgctcggg tcggctcacg 1080

agggctgcct cccgccgttc ccagcggacg ttttcatgat tcctcagtac gggtatctga 1140

cgcttaatga tggaagccag gccgtgggtc gttcgtcctt ttactgcctg gaatatttcc 1200

cgtcgcaaat gctaagaacg ggtaacaact tccagttcag ctacgagttt gagaacgtac 1260

ctttccatag cagctacgct cacagccaaa gcctggaccg actaatgaat ccactcatcg 1320

accaatactt gtactatctc tcaaagacta ttaacggttc tggacagaat caacaaacgc 1380

taaaattcag tgtggccgga cccagcaaca tggctgtcca gggaagaaac tacatacctg 1440

gacccagcta ccgacaacaa cgtgtctcaa ccactgtgac tcaaaacaac aacagcgaat 1500

ttgcttggcc tggagcttct tcttgggctc tcaatggacg taatagcttg atgaatcctg 1560

gacctgctat ggccagccac aaagaaggag aggaccgttt ctttcctttg tctggatctt 1620

taatttttgg caaacaagga actggaagag acaacgtgga tgcggacaaa gtcatgataa 1680

ccaacgaaga agaaattaaa actactaacc cggtagcaac ggagtcctat ggacaagtgg 1740

ccacaaacca ccagagtgcc caagcacagg cgcagaccgg ctgggttcaa aaccaaggaa 1800

tacttccggg tatggtttgg caggacagag atgtgtacct gcaaggaccc atttgggcca 1860

aaattcctca cacggacggc aactttcacc cttctccgct gatgggaggg tttggaatga 1920

agcacccgcc tcctcagatc ctcatcaaaa acacacctgt acctgcggat cctccaacgg 1980

ccttcaacaa ggacaagctg aactctttca tcacccagta ttctactggc caagtcagcg 2040

tggagatcga gtgggagctg cagaaggaaa acagcaagcg ctggaacccg gagatccagt 2100

acacttccaa ctattacaag tctaataatg ttgaatttgc tgttaatact gaaggtgtat 2160

atagtgaacc ccgccccatt ggcaccagat acctgactcg taatctgtaa 2210

<210> 19
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mirT122a

<400> 19
caaacaccat tgtcacactc ca 22

<210> 20
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> mirT1

<400> 20
ttacatactt ctttacattc ca 22