

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 482**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2006 E 06752135 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **23.01.2008 EP 1879623**

54 Título: **Terapia génica para trastornos de la médula espinal**

30 Prioridad:

**02.05.2005 US 677213 P**

**08.04.2006 US 790217 P**

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

**01.02.2013**

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)**

**500 KENDALL STREET**

**CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**DODGE, JAMES;**

**SHIHABUDDIN, LAMYA;**

**PASSINI, MARCO;**

**CHENG, SENG y**

**O'RIORDAN, CATHERINE R.**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 394 482 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Terapia génica para trastornos de la médula espinal

5 **[0001]** Esta solicitud reivindica la prioridad según el punto § 119(e) del artículo 35 de la Ley de comercio de los Estados Unidos de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 60/677.213, presentada el 2 de mayo de 2005, y de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 60/790.217, presentada el 8 de abril de 2006.

CAMPO DE LA INVENCION

10 **[0002]** La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para tratar trastornos que afectan a una función motora del sujeto y en particular, una función motora afectada por enfermedad o lesión en el cerebro y/o la médula espinal.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

**[0003]** La terapia génica es una modalidad de tratamiento emergente para los trastornos que afectan el sistema nervioso central (SNC). La terapia génica del SNC se ha visto facilitada por el desarrollo de vectores víricos capaces de infectar eficazmente las neuronas postmitóticas. El sistema nervioso central está compuesto por la médula espinal y el cerebro. La medula espinal conduce la información sensorial desde el sistema nervioso periférico al cerebro y conduce la información motora desde el cerebro a diversos efectores. Para una revisión de los vectores víricos para administración génica al sistema nervioso central, véase Davidson y col. (2003) Nature Rev. 4: 353 – 364.

25 **[0004]** Los vectores de virus adenoasociados (AAV) se consideran útiles para la terapia génica del SNC debido a que tienen un perfil de toxicidad e inmunogenicidad favorables, son capaces de transducir las células neuronales, y son capaces de mediar la expresión a largo plazo en el SNC (Kaplitt y col. (1994) Nat. Genet. 8: 148 – 154; Bartlett y col. (1998) Hum. Gene Ther. 9: 1181 – 1186; y Passini y col. (2002) J. Neurosci. 22: 6437 – 6446).

30 **[0005]** Una propiedad útil de los vectores de AAV se basa en la capacidad de algunos vectores de AAV de experimentar transporte retrógrado y/o anterógrado en las células neuronales. Las neuronas en una región del cerebro están interconectadas con regiones distales mediante axones del cerebro proporcionando de esta forma un sistema de transporte para la administración del vector. Por ejemplo, se puede administrar un vector de AAV a o próximo a los terminales de los axones de las neuronas. Las neuronas internalizan el vector de AAV y transportan este de una manera retrógrada a lo largo del axón al cuerpo de la célula. Las propiedades similares del adenovirus, el VHS y el virus de la pseudorrabia han demostrado que se liberan genes en estructuras distales en el interior del cerebro (Soudas y col. (2001) FASEB J. 15: 2283 – 2285; Breakefield y col. (1991) New Biol. 3: 203 – 218; y deFalco y col. (2001) Science. 291: 2608 – 2613).

40 **[0006]** Algunos grupos han notificado que la transducción del cerebro producida por el serotipo 2 de AAV (AAV2) está limitada al sitio de la inyección intracraneal (Keplitt y col. (1994) Nat. Genet. 8: 148 – 154; Passini y col. (2002) J. Neurosci. 22: 6437 – 6446; y Chamberlin y col. (1998) Brain Res. 793: 169 – 175). Recientes informes sugieren que el transporte axonal retrógrado de vectores víricos neurotrópicos puede producirse también en circuitos seleccionados del cerebro de la rata normal (Kaspar y col. (2002) Mol. Ther. 5: 50 – 56 (vector de AAV); Kasper y col. (2003) Science 301: 839 – 842 (vector lentivírico) y Azzouz y col. (2004) Nature 429: 413 – 417 (vector lentivírico). Roaul y col. (2005) Nat. Med. 11(4): 423 – 428 y Ralph y col. (2005) Nat. Med. 11(4): 429 – 433 informa que la inyección intramuscular de lentivirus que expresa la superóxido dismutasa de Cu/Zn humana silenciadora (SOD1) que interfiere el inicio de la enfermedad de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) por retardo del ARN, en un modelo de ELA en roedor terapéuticamente relevante.

50 **[0007]** Las células transducidas por vectores de AAV pueden expresar un producto transgénico terapéutico, tal como una enzima o un factor neurotrófico, para mediar efectos beneficiosos intracelularmente. Estas células pueden secretar también el producto transgénico terapéutico, que se puede capturar posteriormente por células distales en las que puede mediar en su efecto beneficioso. Este proceso se ha descrito como corrección cruzada (Neufeld y col. (1970) Science 169: 141 – 146).

**[0008]** Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de composiciones y procedimientos para tratar la disfunción de la médula espinal que dan como resultado una pérdida de la función motora en pacientes humanos. Esta divulgación satisface esta necesidad y proporciona también ventajas relacionadas.

60 RESUMEN DE LA INVENCION

**[0009]** La presente invención es tal como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

5 [0010] La divulgación proporciona procedimientos y composiciones para administrar un transgén en la médula espinal y/o en la región del tronco cerebral de un sujeto administrando un vector vírico neurotrópico recombinante que contiene el transgén en al menos una región de la región de los núcleos cerebelosos profundos (DCN) del cerebro del sujeto. La administración vírica se lleva a cabo en condiciones que favorecen la expresión del transgén en la médula espinal y/o la región del tronco cerebral.

10 [0011] En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos y composiciones para administrar un transgén a la médula espinal de un sujeto administrando un vector vírico neurotrópico recombinante que contiene el transgén a la región de la corteza motora del cerebro del sujeto. La administración del vector vírico se lleva a cabo en condiciones que favorecen la expresión del transgén en la médula espinal. Los vectores víricos administrados en la región de la corteza motora se internalizan por las neuronas motoras mediante su región del cuerpo celular y se expresa el transgén. El transgén expresado puede entonces experimentar transporte anterógrado en la porción terminal del axón de la neurona motora, que está presente en la médula espinal. Debido a la naturaleza de la corteza motora, los vectores víricos administrados en esta región del cerebro se pueden internalizar por los terminales de los axones de las neuronas motoras. El vector vírico puede experimentar también transporte anterógrado a lo largo del axón de la neurona y expresarse en el cuerpo celular de la neurona motora.

15 [0012] Se proporcionan adicionalmente composiciones y procedimientos para administrar un transgén a una neurona motora en un sujeto administrando un vector vírico neurotrópico recombinante que contiene el transgén a al menos una región de la región de los núcleos cerebelosos profundos del cerebro del sujeto. La administración del vector se lleva a cabo en condiciones que favorecen la expresión del transgén en una neurona motora distal en el sitio de la administración.

20 [0013] Se proporcionan también procedimientos y composiciones para administrar un transgén a una neurona motora en un sujeto administrando un vector vírico neurotrópico que contiene el transgén a la región de la corteza motora del cerebro del sujeto y en el que la administración se lleva a cabo en condiciones que favorecen la expresión del transgén en una neurona motora distal en el sitio de la administración.

25 [0014] En un aspecto alternativo, la divulgación proporciona composiciones y procedimientos para tratar un trastorno en una neurona motora en un sujeto administrando un vector vírico neurotrópico recombinante que contiene un transgén terapéutico a al menos una región de la región de los núcleos cerebelosos profundos del cerebro del sujeto. La administración se lleva a cabo en condiciones que favorecen la expresión de una cantidad terapéuticamente eficaz del transgén en al menos una subdivisión de la médula espinal y/o de la región del tronco cerebral.

30 [0015] En un aspecto más adicional, la divulgación proporciona composiciones y procedimientos para mejorar los síntomas de un trastorno en una neurona motora en un sujeto administrando un vector vírico neurotrópico recombinante que contiene un transgén terapéutico en la región de la corteza motora del cerebro del sujeto y en condiciones que favorecen la expresión del transgén en una cantidad terapéuticamente eficaz en al menos una subdivisión de la médula espinal y/o del tronco cerebral.

35 [0016] Debe entenderse que la anterior descripción general y la siguiente descripción detallada son a modo de ejemplo y a modo de explicación únicamente y no restringen la invención tal como se reivindica.

40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45 [0017] La **Figura 1** es un esquema de cómo los DCN podrían utilizarse para transportar virus terapéuticos a la médula espinal. Las líneas que se originan en el interior del recuadro en negro que rodea los DCN representan los terminales de los axones que se originan desde los cuerpos celulares (puntas de flecha) localizados en el interior de la médula espinal.

50 [0018] La **Figura 2** es una reproducción de un corte transversal histológico a través de la unión ponto-medular y el cerebelo, mostrando las tres regiones de los DCN.

55 [0019] La **Figura 3** es una vista esquemática del cerebelo que se ha cortado a lo largo de la línea del vermis (sección sagital) y a continuación se aplatana, así como una sección horizontal a través de la médula espinal y una representación de la musculatura esquelética. Esta muestra las rutas principales aferentes (entrada).

60 [0020] La **Figura 4** es un diagrama que muestra las rutas principales aferentes (salidas) de los DCN.

[0021] La **Figura 5** muestra esquemáticamente los circuitos neurales en la corteza cerebral, que unen las entradas con las salidas. Las fibras trepadoras se originan en la oliva inferior, que recibe por sí misma entradas procedentes de la corteza cerebral, médula espinal y sentidos especiales (visual y auditivo). Las entradas de las fibras musgosas se originan desde el resto de aferentes, tales como los aferentes vestibulares, los aferentes espinales, haces

musculares, órganos de golgi-tendones, receptores articulares, receptores de la piel y la corteza cerebral. Existen también tres tipos de interneuronas inhibitoras en el sistema intrínseco, que incluyen las células en cesta, las células de golgi y las células estrelladas. Estas están implicadas en la inhibición lateral y en el ajuste de la función de las neuronas motoras.

5 **[0022]** Las Figuras 2 a 5 se reproducen de Williams y col. (2005) The Human Brain: Capítulo 3: The Cerebellum, disponible en el sitio web: [www.vh.org/adult/provider/anatomy/BrainAnatomy/Ch3Text/Section07.html](http://www.vh.org/adult/provider/anatomy/BrainAnatomy/Ch3Text/Section07.html).

10 **[0023]** Las Figuras 6A a 6E muestran la tinción inmunopositiva de la esfingomielina ácida humana ("hASM") en secciones cerebelosas sagitales tras la inyección de diferentes vectores del serotipo de AAV [(A)2/1, (B)2/2, (C)2/5, (D)2/7 y (E)2/8] que codifican la ASM humana en los núcleos cerebelosos profundos de ratones ASMKO.

15 **[0024]** Las Figuras 7A a 7E demuestran el transporte de la esfingomielina ácida humana ("hASM") a la médula espinal procedente de los núcleos cerebelosos profundos. Se observó este efecto en ratones tratados con AAV2/2-ASM, AAV2/5-ASM, AAV2/7-ASM & AAV2/8-ASM. (A) 10 veces de aumento de la hASM; (B) 40 veces de aumento de la hASM; (C) hASM confocal; (D) chat confocal; y (E) hASM y ChAT confocal.

20 **[0025]** La Figura 8 muestra gráficamente niveles homogenados de tejido cerebeloso tras la inyección de diferentes serotipos de AAV (2/1, 2/2, 2/5, 2/7 y 2/8) que codifican la ASM en los núcleos cerebelosos profundos (n = 5/grupo). Los no vinculados por la misma letra son significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ).

25 **[0026]** Las Figuras 9A a 9G muestran la tinción inmunopositiva de la calbindina en secciones cerebelosas sagitales tras la inyección de diferentes vectores de serotipos de AAV [(A)2/1, (B)2/2, (C)2/5, (D)2/7 y (E)2/8] que codifican la ASM humana en los núcleos cerebelosos profundos de ratones ASMKO.

30 **[0027]** Las Figuras 10A y 10 B muestran el comportamiento de aceleración y vaivén del rotarod (a las 14 semanas de edad) en ratones ASMKO (inyectados con AAV- $\beta$ gal), WT, ASMKO tratados con AAV-ASM (n = 8/grupo). Los grupos no vinculados por la misma letra son significativamente diferentes. Los ratones inyectados con AAV2/1-ASM y AAV2/8-ASM demostraron una latencia hasta la caída significativamente más larga ( $p < 0,0009$ ) que la de los ratones ASMKO inyectados con AAV2/1- $\beta$ gal en la prueba de aceleración del rotarod. Para la prueba del vaivén del rotarod, los ratones inyectados con AA2/1-ASM demostraron una latencia hasta la caída significativamente más larga ( $p < 0,0001$ ) que los ratones inyectados con AAV2/1- $\beta$ gal).

35 **[0028]** Las Figuras 11A y 11B muestran el comportamiento del rotarod en ratones ASMKO (n = 8), WT (n = 8) y tratados con AAV-ASM bilateralmente (n = 5/grupo) (a las 20 semanas de edad). Para las pruebas de aceleración y vaivén, los ratones tratados con AAV-ASM las llevaron a cabo significativamente mejor ( $p < 0,001$ ) que los ratones ASMKO tratados con AAV2/1- $\beta$ gal. El comportamiento de los ratones inyectados con AAV2/1-ASM fue indistinguible de los ratones silvestres en las pruebas de aceleración y de vaivén.

40 **[0029]** La Figura 12A ilustra las conexiones entre las regiones de los núcleos cerebelosos profundos (medial, interpuesta, y lateral) y las regiones de la médula espinal (cervical, torácica, lumbar y sacra). La Figura 12B ilustra las conexiones entre las regiones de los núcleos cerebelosos profundos (medial, interpuesta y lateral) y las regiones del tallo cerebral (mesencéfalo, puente y médula). Las conexiones se representan por flechas, que comienzan en la región del cuerpo celular de una neurona y finalizan en la región terminal del axón de la neurona. Por ejemplo, las tres regiones de los DCN tienen cada una neuronas con cuerpos celulares que envían a los axones que terminan en la región cervical de la médula espinal mientras que la región cervical de la médula espinal tiene cuerpos celulares que envían axones que terminan en cualquiera de las regiones medial o interpuesta de los DCN.

50 **[0030]** La Figura 13 ilustra la distribución de la proteína fluorescente verde en el tallo cerebral, o las neuronas motoras superiores, tras la administración del AAV que codifica la proteína fluorescente verde (GFP).

**[0031]** La Figura 14 ilustra la distribución de la proteína fluorescente verde en las regiones de la médula espinal tras la administración a los DCN del AAV que codifica la proteína fluorescente verde (GFP).

55 **[0032]** La Figura 15 ilustra la reducción en la tinción de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en el tallo cerebral tras la administración a los DCN del AAV que codifica IGF-1 en comparación con la administración a los DCN del AAV que codifica GFP.

60 **[0033]** La Figura 16 ilustra la reducción en la tinción de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) dentro de los núcleos oromotores (núcleo trigeminal, núcleo hipoglosal, y núcleo facial) tras la administración a los DCN del AAV que codifica iGF-1 en comparación con la administración a los DCN del AAV que codifica GFP.

**[0034]** La Figura 17 ilustra la reducción en la tinción de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) a lo largo de la médula espinal tras la administración a los DCN del AAV que codifica iGF-1 en comparación con la administración a

los DCN del AAV que codifica GFP.

**[0035]** La **Figura 18** ilustra la distribución del ARNm de IGF-1 dentro del sistema nervioso central (WSNC) tras la administración a los DCN del AAV que codifica IGF-1 en comparación con la administración a los DCN del AAV que codifica GFP. Se utiliza beta-actina como control positivo para comparar los niveles del ARNm total.

**[0036]** La **Figura 19** ilustra que la administración a los DCN del AAV-IGF-1 promovió la supervivencia de las neuronas motoras. La diferencia entre los ratones tratados con AAV que codifica IGF-1 en comparación con la administración a los DCN del AAV que codifica GFP es estadísticamente significativa para un valor  $p = 0,01$  tal como se indica por el asterisco.

**[0037]** La **Figura 20** ilustra las mejoras funcionales en el comportamiento del rotarod, la fuerza de prensión del miembro posterior, y la fuerza de prensión del miembro anterior en ratones tratados con administración a los DCN del AAV que codifica IGF-1 en comparación con la administración a los DCN del AAV que codifica GFP.

**[0038]** La **Figura 21** ilustra el aumento de la supervivencia mediada por la administración a los DCN del AAV que codifica IGF-1 en comparación con la administración a los DCN del AAV que codifica GFP.

**[0039]** La **Figura 22** muestra la distribución de GFP en el interior del cerebro de ratón tras la administración bilateral de una GFP que expresa el vector AAV1 a los núcleos cerebelosos profundos (DCN). Además de los DCN, se observó también la tinción positiva de la GFP en los bulbos olfatorios, la corteza cerebral, el tálamo, el tronco cerebral, la corteza cerebelosa y la médula espinal. Todas estas áreas reciben cualquier proyección y/o envían proyecciones a los DCN.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

**[0040]** Con el fin de que la presente invención sea más fácilmente comprensible, se describen en primer lugar algunos términos. Se muestran definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

**[0041]** La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la técnica. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª edición (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, y col. eds., (1987)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, y ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney, ed. (1987)).

**[0042]** Tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la forma singular “un”, “uno” y “el” incluye las referencias plurales a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, el término “una célula” incluye una pluralidad de células, incluyendo sus mezclas.

**[0043]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “que comprende” se pretende que signifique que las composiciones y procedimientos incluyen los elementos enumerados, pero no excluyen otros. “Que consiste esencialmente de” cuando se utiliza para definir composiciones y procedimientos, significará que excluye otros elementos de cualquier significación esencial para la combinación. De esta manera, una composición que consiste esencialmente de los elementos tal como se define en la presente memoria descriptiva no excluiría los contaminantes traza procedentes del procedimiento de aislamiento y la purificación y los vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes, y similares. “Que consiste de” significará que excluye más de los elementos traza de otros ingredientes y etapas sustanciales del procedimiento para la administración de las composiciones de esta invención. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están comprendidas dentro del alcance de esta invención.

**[0044]** Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración, y peso molecular, incluyendo intervalos son aproximaciones que varían ( + ) o ( - ) en incrementos de 0,1. Debe entenderse, aunque no se indica siempre de manera explícita que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término “aproximadamente”. Debe entenderse también, aunque no se indica siempre de manera explícita, que los reactivos descritos en la presente memoria descriptiva son meramente a modo de ejemplo y que se conocen en la técnica equivalentes de los mismos.

**[0045]** El término “transgén” se refiere a un polinucleótido que se introduce en una célula y es capaz de transcribirse en el ARN y opcionalmente, traducirse y/o expresarse en condiciones adecuadas. En un aspecto, esto confiere una propiedad deseada a una célula en la que se introdujo, o conduce de otra manera a un resultado terapéutico o diagnóstico deseado. En otro aspecto, este puede transcribirse en moléculas que median la interferencia del ARN, tal como ARNip.

**[0046]** Los términos “partículas genómicas (pg)”, o “equivalentes genómicos” tal como se usan en referencia a un título vírico, se refieren al número de viriones que contienen el genoma del ADN de AAV recombinante, con respecto a la infectividad o a la funcionalidad. Se puede medir el número de partículas genómicas en una preparación de vector particular mediante procedimientos tales como los descritos en los Ejemplos de la presente memoria descriptiva, o por ejemplo, en Clark y col. (1999) Hum. Gene Ther., 10: 1031 – 1039; Veldwijk y col. (2002) Mol. Ther., 6: 272 – 278.

**[0047]** Los términos “unidad de infección (ui)”, “partícula infecciosa”, o “unidad de replicación”, tal como se usan en referencia al título vírico, se refieren al número de partículas de vector de AAV recombinante infecciosas y competentes mediante replicación tal como se midió mediante el ensayo de centros infecciosos, conocido también como ensayo de centros de replicación, tal como se describe, por ejemplo, en McLaughlin y col. (1988) J. Virol., 62: 1963 – 1973.

**[0048]** El término “unidad de transducción (ut)” tal como se usa en referencia a un título vírico, se refiere al número de partículas de vector de AAV recombinante infecciosas que dan como resultado la producción de un producto transgénico funcional tal como se midió en ensayos funcionales tal como se describe en los Ejemplos en la presente memoria descriptiva, o por ejemplo, en Xiao y col. (1997) Exp. Neurobiol., 144: 113 – 124; o en Fisher y col. (1996) J. Virol., 70: 520 – 532 (ensayo LFU).

**[0049]** Los términos “terapéutico”, “cantidad terapéuticamente eficaz” y sus análogos se refieren a la cantidad de un ARN, ADN o producto de expresión de ADN y/o ARN que dan como resultado la prevención o el retraso del inicio o la mejora de los síntomas en un sujeto o una consecución de un resultado biológico deseado, tal como la corrección de una neuropatología, por ejemplo, una patología celular asociada con una enfermedad neuronal motora tal como ELA. El término “corrección terapéutica” se refiere al grado de corrección que da como resultado la prevención o el retraso del inicio o la mejora de los síntomas en un sujeto. Se puede determinar la cantidad eficaz mediante procedimientos empíricos conocidos.

**[0050]** Se pretende que una “composición” abarque también una combinación del principio activo y otro vehículo, por ejemplo, un compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o marca detectable) o activo, tal como un adyuvante, diluyente, aglutinante, estabilizante, tampones, sales, disolventes lipófilos, conservante, adyuvante o similares. Los vehículos incluyen también excipientes farmacéuticos y aditivos de proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, y carbohidratos (por ejemplo, azúcares, incluyendo monosacáridos, di, tri, tetra, y oligosacáridos, azúcares derivatizados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros azucarados), que pueden estar presentes individualmente o en combinación, que comprenden solos o en combinación un 1 – 99,99 % en peso o en volumen. Los excipientes de proteínas a modo de ejemplo incluyen albúmina de suero tal como albúmina de suero humano (ASH) albúmina humana recombinante (AHr), gelatina, caseína, y similares. Los componentes de aminoácidos/anticuerpos representativos, que pueden funcionar también con una capacidad tamponante, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo, y similares. Los excipientes de carbohidratos se pretende también que queden comprendidos dentro del alcance de esta divulgación, los ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones, y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y micinositol.

**[0051]** El término vehículo incluye además un tampón o un agente de ajuste del pH; normalmente, el tampón es una sal preparada a partir de un ácido o base orgánica. Los tampones representativos incluyen sales de ácidos orgánicos tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético, o ácido ftálico; Tris, clorhidrato de trometamina, o tampones fosfato. Los vehículos adicionales incluyen excipientes/aditivos poliméricos tales como polivinilpirrolidonas, ficolos (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil-cuadratura-ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes aromatizantes, agentes antimicrobianos, endulzantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos tales como “TWEEN 20” y “TWEEN 80”, lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol), y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).

**[0052]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “vehículo farmacéuticamente aceptable” abarca cualquiera de los vehículos farmacéuticos normalizados, tales como solución salina tamponada con fosfato, agua, y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y diversos tipos de agentes humectantes. Las composiciones pueden incluir también estabilizantes y conservantes y cualquiera de los vehículos anteriormente señalados con la condición adicional de que puedan ser aceptables para el uso in vivo. Para los ejemplos de vehículos, estabilizantes y adyuvantes, véanse Martin REMINGTON'S PHARM. SCI., 15ª Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) y Williams & Williams, (1995), y en la "PHYSICIAN'S DESK REFERENCE", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998).

**[0053]** Un “sujeto”, “individuo” o “paciente” se usa indistintamente en la presente memoria descriptiva, que se refiere a un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, murinos, ratas, simios, seres humanos, animales de granja, animales para deportes, y mascotas.

5  
**[0054]** Un “control” es un sujeto o muestra alternativa utilizada en un experimento en un experimento a fines comparativos. Un control puede ser “positivo” o “negativo”. Por ejemplo, cuando el objetivo del experimento es determinar una correlación de un nivel de expresión elevada de un gen con un tipo particular de patología (véase ELA, por ejemplo, más abajo), es generalmente preferible usar un control positivo (un sujeto o una muestra procedente de un sujeto, que transporta dicha alteración y presenta síntomas característicos de la enfermedad), y un control negativo (un sujeto o una muestra procedente de un sujeto que carece de la expresión alterada y los síntomas clínicos de la enfermedad).

15  
**[0055]** “Expresado diferencialmente”, tal como se aplica a un gen, se refiere a la producción diferencial del ARNm transcrito procedente del gen o del producto de proteína codificado por el gen. Un gen expresado diferencialmente puede estar expresado en exceso o expresado por defecto en comparación con el nivel de expresión de una célula normal o del control. En un aspecto, esto se refiere a un diferencial que es al menos de 1,5 veces, o al menos 2,5 veces, o alternativamente al menos 5 veces, o alternativamente al menos 10 veces superior o inferior que el nivel de expresión detectado en una muestra del control. El término “expresado diferencialmente” se refiere también a las secuencias de nucleótidos en una célula o tejido que se expresan cuando son silenciosas en una célula del control o no se expresan cuando se expresan en una célula del control.

25  
**[0056]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “modular” significa variar la cantidad o intensidad de un efecto o resultado, por ejemplo, para potenciar, aumentar, disminuir o reducir.

**[0057]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “mejorar” es sinónimo de “aliviar” y significa reducir o aligerar. Por ejemplo, se pueden mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno haciéndolos más soportables.

30  
**[0058]** En aspectos en los que la transferencia génica está mediada por un vector vírico de ADN, tal como un adenovirus (Ad) o virus adenoasociado (AAV), una construcción de vector se refiere al polinucleótido que comprende el genoma vírico o parte del mismo, y un transgén. Los adenovirus (Ads) son un grupo homogéneo de virus relativamente bien caracterizado, que incluye aproximadamente 50 serotipos. Véase, por ejemplo la Solicitud PCT Internacional N° WO 95/27071. Los Ads crecen fácilmente y no requieren integración en el genoma de la célula hospedadora. Se han construido también vectores derivados de Ad recombinantes, particularmente los que reducen el potencial para la recombinación y la generación de virus naturales. Véanse, las Solicitudes PCT Internacionales N°s WO 95/00655 y WO 95/11984. Los AAV naturales tienen una elevada infectividad y especificidad al integrarse en el genoma de la célula hospedadora. Véanse, Hermonat and Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6488 – 6470 y Lebkowski, y col. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 3988 – 3996.

40  
**[0059]** La divulgación proporciona un procedimiento para administrar un transgén en la médula espinal y/o el tronco cerebral en un sujeto administrando un vector vírico neurotrópico recombinante que contiene un transgén en al menos una región de la región de los núcleos cerebelosos profundos, en el que la administración se lleva a cabo en condiciones que favorecen la expresión del transgén en un sitio distal al sitio de la administración. La administración puede dar como resultado también la expresión del transgén en el sitio de la administración.

50  
**[0060]** A no ser que se indique específicamente de otra forma, la expresión del transgén no está limitada a la traducción de un polipéptido o proteína sino que incluye también la replicación y/o la transcripción del polinucleótido del transgén.

**[0061]** En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para administrar un producto de transgén terapéutico a una célula diana del SNC, que es una neurona o una célula glial, en un mamífero que padece un trastorno neuronal motor, por ejemplo, ELA o lesión traumática de la médula espinal. El transgén puede codificar IGF-1.

55  
**[0062]** En otro aspecto, la divulgación es un procedimiento para administrar un transgén en la médula espinal de un sujeto administrando un vector vírico neurotrópico recombinante que contiene dicho transgén en la región de la corteza motora del cerebro, en la que dicha administración se lleva a cabo en condiciones que favorecen la expresión de dicho transgén en un sitio distal a dicho sitio de administración.

60  
**[0063]** En otro aspecto más adicional, el vector vírico de la divulgación se administra en al menos una región de la región de los núcleos cerebelosos profundos del cerebro cuando el producto del transgén se expresa y administra en la médula espinal y/o la región del tronco cerebral del sujeto.

**[0064]** En otra realización, el vector vírico se administra en al menos una región de la región de los núcleos cerebelosos profundos del cerebro que está interconectada con el tronco cerebral y las neuronas motoras espinales. Estas regiones diana tienen conexiones directas con las células (por ejemplo, interneuronas y astrocitos) que componen el entorno celular de la neurona motora. La administración libera el producto del transgén en el entorno celular de la neurona motora, en el que el producto media un efecto beneficioso sobre las células que los componen.

**[0065]** En una realización, la divulgación es un procedimiento para administrar un transgén para o modular su expresión, en una neurona motora de un sujeto administrando un vector vírico neurotrópico que contiene el transgén en la región de la corteza motora del cerebro del sujeto, en la que el transgén se expresa en una región de la neurona motora distal a dicho sitio de administración.

**[0066]** En una realización alternativa, la divulgación es un procedimiento para tratar un trastorno de las neuronas motoras en un sujeto administrando un vector vírico neurotrópico recombinante que contiene un transgén terapéutico en al menos una región de la región de los núcleos cerebelosos profundos del cerebro del sujeto, en la que el transgén se expresa en una cantidad terapéuticamente eficaz en al menos una subdivisión de la médula espinal del sujeto. Estas subdivisiones incluyen una o más de cervical, torácica, lumbar o sacra (véase la Figura 1, Figura 12A). El transgén se puede expresar también en una cantidad terapéuticamente eficaz en al menos una región del tronco cerebral, tal como, por ejemplo, el mesencéfalo, el puente, o la médula (véase la Figura 12B). Se puede expresar también en una cantidad terapéuticamente eficaz en al menos una región del tronco cerebral y en al menos una subdivisión de la médula espinal del sujeto.

**[0067]** Esta divulgación también es un procedimiento para mejorar los síntomas de un trastorno de las neuronas motoras en un sujeto administrando un vector vírico neurotrópico recombinante que contiene un transgén terapéutico en la región de la corteza motora del cerebro, en la que dicho transgén se expresa en una cantidad terapéuticamente eficaz en al menos una subdivisión de la médula espinal del sujeto. Estas subdivisiones incluyen una o más de cervical, torácica, lumbar o sacra (véase la Figura 1, Figura 12A).

**[0068]** Los vectores víricos neurotrópicos adecuados para la práctica de esta divulgación incluyen, pero no se limitan a vectores víricos adenoasociados (AAV), vectores víricos del herpes simple (Patente de los Estados Unidos N° 5.672.344) y vectores lentivíricos.

**[0069]** En la invención, se pueden utilizar AAV de cualquier serotipo. En algunas realizaciones, se pueden utilizar AAV de cualquier serotipo siempre que los vectores sean capaces de experimentar transporte axonal retrógrado en un cerebro afectado por la enfermedad, o transporte axonal en un cerebro no comprometido. El serotipo del vector vírico utilizado en algunas realizaciones de la invención se selecciona entre el grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, y AAV8 (véanse, por ejemplo., Gao y col. (2002) PNAS, 99: 11854 – 11859; y Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocol ed. Machida, Humana Press, 2003). Se pueden utilizar otros serotipos además de los relacionados en la presente memoria descriptiva. Además, se pueden utilizar también vectores de AAV pseudotipados en los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva. Los vectores de AAV pseudotipados son aquellos que contienen el genoma de un serotipo de AAV en la cápsida de un segundo serotipo de AAV, por ejemplo, un vector de AAV que contiene la cápsida de AAV2 y el genoma de AAV1 o un vector de AAV que contiene la cápsida de AAV5 y el genoma de AAV2 (Auricchio y col., (2001) Hum. Mol. Genet, 10(26): 3075 – 81).

**[0070]** Los vectores de AAV se derivan del ADN de parvovirus monocatenarios (ss) que no son patógenos para los mamíferos (revisado en Muzyscka (1992) Curr. Top. Microb. Immunol., 158: 97 – 129). De manera breve, los vectores basados en AAV tienen los genes víricos rep y cap que representan el 96 % del genoma vírico eliminado quedando las dos repeticiones terminales invertidas flanqueantes de 145 pares de bases (pb) (TTR), que se utilizan para iniciar la replicación del ADN vírico, el empaquetamiento y la integración. En ausencia del virus auxiliar, el AAV natural se integra en el genoma de la célula hospedadora humana con especificidad preferente por el sitio en el cromosoma 19q 13.3 o puede permanecer expresado episómicamente. Una única partícula de AAV puede acomodar hasta 5 kb de ADNss, dejando por tanto aproximadamente 4,5 kb para un transgén y los elementos reguladores, que es normalmente suficiente. Sin embargo, se describen sistemas que realizan el corte y empalme en trans, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N° 6.544.785, que pueden casi doblar este límite.

**[0071]** En una realización ilustrativa, AAV es AAV2 o AAV1. Se han estudiado extensamente los virus adenoasociados de muchos serotipos, especialmente AAV2, y se han caracterizado como vectores de terapia génica. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con la preparación de vectores funcionales de terapia génica basados en AAV. Se pueden encontrar numerosas referencias a diversos procedimientos de producción, purificación y preparación de AAV para la administración a sujetos humanos en el extenso cuerpo de la bibliografía publicada (véase, por ejemplo, Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003). Adicionalmente, se ha descrito la terapia génica basada en AAV dirigida a hacer intervenir al SNC en las Patentes de los Estados Unidos N°s 6.180.613 y 6.503.888. Los vectores de AAV a modo de ejemplo adicionales son los vectores de los serotipos AAV-2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 y AAV2/8 recombinantes que codifican la proteína



humana.

**[0072]** En algunas realizaciones de la invención, el vector comprende un transgén unido de manera operable con un promotor. El transgén codifica una molécula biológicamente activa, la expresión de la cual en el SNC da como resultado al menos una corrección parcial de la neuropatología. Se han publicado las secuencias del ADNc genómicas y funcionales de la ELA humana (véanse, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos N° 5.773.278 y 6.541.218). El gen del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-1 tiene una estructura compleja, que es bien conocida en la técnica. Tiene al menos dos productos de ARNm cortados y empalmados de forma alternativa que provienen del transcrito génico. Existe un péptido de 153 aminoácidos, conocido por diversos nombres que incluyen IGF-1A o IGF-1Ea, y un péptido de 195 aminoácidos, conocido por diversos nombres que incluyen IGF-1B o IGF-1Eb. La forma madura de IGF-1 es un polipéptido de 70 aminoácidos. IGF-1Ea e IGF-1Eb contienen el péptido maduro de 70 aminoácidos, pero difieren en la secuencia y la longitud de sus extensiones carboxiterminales. Las secuencias peptídicas de IGF-1Ea e IGF-1Eb se representan por las SEQ ID NOS: 1 y 2, respectivamente. Los ADNc genómicos y funcionales de IGF-1 humano, así como información adicional con respecto al gen IGF-1 y sus productos, están disponibles en Unigene con el N° de Acceso NM\_00618.

**[0073]** El nivel de expresión del transgén en células eucariotas se determina en última instancia por el promotor transcripcional en el interior del casete de expresión del transgén. Se utilizan en algunas realizaciones promotores que muestran actividad a largo plazo y son específicos de tejidos e incluso de células. Los ejemplos no limitantes de promotores incluyen, pero no se limitan a, el promotor del citomegalovirus (CMV) (Kaplitt y col. (1994) Nat. Genet. 8: 148 – 154), el promotor de CMV/β3 – globina humana (Mandel y col. (1998) J. Neurosci. 18: 4271 – 4284), el promotor de GFAP (Xu y col. (2001) Gene Ther. 8: 1323 – 1332), el promotor de la enolasa específica de neuronas de 1,8 – kb (NSE) (Klein y col. (1998) Exp. Neurol. 150: 183 – 194), el promotor de la beta actina del pollo (CBA) (Miyazaki (1989) Gene 79: 269 – 277), el promotor de la β-glucuronidasa (GUSB) (Shiple y col. (1991) Genetics 10: 1009 – 1018), y los promotores de la ubiquitina tales como los aislados de la ubiquitina A humana, ubiquitina B humana, y ubiquitina C humana tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 6.667.174. Para prolongar la expresión, se pueden unir de manera operable adicionalmente otros elementos reguladores al transgén, tales como, por ejemplo el Elemento Postregulador del Virus de la Hepatitis de la Marmota (WPRE) (Donello y col. (1998) J. Virol. 72: 5085 – 5092) o el sitio de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino (BHG).

**[0074]** En algunas aplicaciones de terapia génica del SNC puede ser necesario controlar la actividad transcripcional. Para este fin, se puede obtener la regulación farmacológica de la expresión génica con vectores víricos incluyendo diversos elementos reguladores y promotores sensibles al fármaco tal como se describe, por ejemplo, en Haberman y col. (1998) Gene Ther. 6: 1604 – 16011; y Ye y col. (1995) Science 283: 88 – 91.

**[0075]** En los procedimientos de esta divulgación se puede administrar el vector vírico poniendo en contacto un extremo axonal terminal de una neurona con una composición que contiene un vector vírico que transporta el transgén, permitiendo que la partícula vírica sea sometida a endocitosis y transportada intracelularmente (retrogradamente) a lo largo del axón hasta el cuerpo celular de la neurona; dejando que se exprese el producto del transgén terapéutico, en el que el producto del transgén terapéutico alivia la patología en el sujeto. El efecto puede ser sobre las neuronas motoras, sobre las células que componen el entorno de la neurona motora (tal como las interneuronas y los astrocitos), o sobre ambas. En algunas realizaciones, la concentración del vector en la composición es al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, o 50 ( $\times 10^{12}$  pg/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, o 50 ( $\times 10^8$  ut/ml); o (c) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, o 50 ( $\times 10^{10}$  ul/ml).

**[0076]** En procedimientos adicionales de esta divulgación, el vector vírico se puede administrar poniendo en contacto el cuerpo celular de una neurona con una composición que contiene un vector vírico que transporta el transgén, permitiendo que la partícula vírica sea sometida a endocitosis, dejando que se exprese el producto del transgén terapéutico y se transporte de forma anterógrada intracelularmente a lo largo del axón hasta el terminal del axón de la neurona, en el que producto del transgén terapéutico alivia por tanto la patología en el sujeto. El efecto puede ser sobre las neuronas motoras, sobre las células que componen el entorno de la neurona motora (tal como las interneuronas y los astrocitos), o sobre ambas. En algunas realizaciones, la concentración del vector en la composición es al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, o 50 ( $\times 10^{12}$  pg/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, o 50 ( $\times 10^8$  ut/ml); o (c) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, o 50 ( $\times 10^{10}$  ul/ml).

**[0077]** En un aspecto, el transgén codifica moléculas biológicamente activas, la expresión de las cuales en el SNC da como resultado al menos una corrección parcial de la neuropatología. En algunas realizaciones, el producto del transgén terapéutico es una molécula de ARN que inhibe la expresión de la SOD en un sujeto aliviando y evitando por tanto los síntomas de ELA. Véanse Roaul y col. (2005) Nat Med. 11(4): 423 – 428 y Ralph y col. (2005) Nat. Med. 11(4): 429 – 433.

**[0078]** En un aspecto, cuando se llevan a cabo estos procedimientos, el transgén expresa una cantidad terapéutica de una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en el factor-1 de crecimiento de tipo insulina (IGF-1), calbindina D28, parvalbúmina, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, EPO (eritropoyetina). CBP (proteína de unión

[CREB] a la proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc), SMN-1, SMN-2 y CNTF (factor neurotrófico ciliar).

5 **[0079]** Alternativamente, el transgén inhibe la expresión de una forma mutante de una proteína, por ejemplo, la SOD mutante que da como resultado la ELA. Roaul y col. (2005) más arriba y Ralph y col. (2005) más arriba.

10 **[0080]** Para la identificación de estructuras en el cerebro humano, véanse, por ejemplo, The Human Brain: Surface, Three-Dimensional Sectional Anatomy With MRI, and Blood Supply, 2ª ed., eds. Deuteron y col., Springer Vela, 1999; Atlas of the Human Brain, eds. Mai y col., Academic Press; 1997; y Co-Planar Sterotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging, eds. Tamarack y col., Thyme Medical Pub., 1988. Para la identificación de estructuras en el cerebro del ratón, véase, por ejemplo, The Mouse Brain In Sterotaxic Coordinates, 2ª ed., Academic Press, 2000. La Figura 1 muestra esquemáticamente la médula espinal y sus cuatro subdivisiones: cervical, torácica, lumbar y sacra.

15 **[0081]** La divulgación sujeto proporciona procedimientos para modular, corregir o aumentar la función motora en un sujeto que padece un daño neuronal motor. Únicamente con fines de ilustración, el sujeto puede padecer entre una o más de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular bulbar espinal, atrofia muscular espinal, ataxia cerebelosa espinal, esclerosis lateral primaria (ELP), o lesión traumática espinal traumática.

20 **[0082]** Sin estar limitados a ninguna teoría, la patología asociada con el daño en las neuronas motoras puede incluir la degeneración de las neuronas motoras, gliosis, anomalías en los neurofilamentos, pérdida de fibras mielizadas en los tractos corticoespinales y en las raíces ventrales. Se han reconocido, por ejemplo, dos tipos de inicio; inicio bulbar, que afecta a las neuronas motoras superiores (neuronas motoras de la corteza y del tronco cerebral), afecta a los músculos faciales, aloqución, deglución: e inicio límbico, que afecta a las neuronas motoras inferiores (neuronas motoras de la médula espinal), se refleja por la espasticidad, debilidad generalizada, atrofia muscular, parálisis, e insuficiencia respiratoria. En la ELA, los sujetos tienen inicio bulbar y límbico. En la ELP, los sujetos tienen inicio bulbar.

30 **[0083]** Sin estar limitados a ninguna teoría, una realización de la divulgación se basa en la capacidad para proporcionar una molécula terapéutica (por ejemplo, una proteína o péptido) en cada división de la médula espinal. Esto se puede llevar a cabo inyectando un vector de AAV en los DCN. Además, puede ser importante dirigirse a la lámina individual situada en el interior de cada división de la médula espinal. Las láminas son subregiones específicas dentro de regiones del cerebro y de la médula espinal. Puede ser deseable en algunas realizaciones dirigirse a la lámina específica en el interior de alguna división de la médula espinal. Debido a que se puede producir daño a las neuronas motoras también en el interior de las neuronas motoras superiores, puede ser también deseable proporcionar la molécula terapéutica a la médula espinal, incluyendo alguna o todas las subdivisiones así como al tronco cerebral, incluyendo alguna o todas las subdivisiones. La presente divulgación utiliza la introducción de un vector de AAV en los DCN para llevar a cabo la administración anteriormente descrita de una molécula terapéutica en la(s) región(es) de la médula espinal y/o el tronco cerebral. La Figura 12A ilustra las conexiones entre las regiones de los núcleos cerebelosos profundos y la médula espinal mientras que la Figura 12B ilustra las conexiones entre las regiones de los núcleos cerebelosos profundos y el tronco cerebral.

45 **[0084]** La capacidad para organizar y ejecutar actos motores complejos depende de las señales procedentes de las áreas motoras en la corteza cerebral, es decir, la corteza motora. Las órdenes motoras corticales descienden en dos tractos. Las fibras corticobulbares controlan los núcleos motores en el tronco cerebral que mueven los músculos faciales y las fibras corticoespinales controlan las neuronas motoras espinales que inervan los músculos del tronco y las extremidades. La corteza cerebral influencia también de forma indirecta la actividad motora actuando sobre las rutas descendentes del tronco cerebral.

50 **[0085]** La corteza motora primaria se encuentra a lo largo del giro precentral en el área de Brodmann (4). Los axones de las neuronas corticales que proyectan la medula espinal corren juntos en el tracto corticoespinal, un haz masivo de fibras que contiene aproximadamente 1 millón de axones. Aproximadamente una tercera parte de estos se originan a partir del giro precentral del lóbulo frontal. Otra tercera parte se origina a partir del área 6. El resto se origina en las áreas 3, 2 y 1 en la corteza sensorial somática y regulan la transmisión de la entrada aferente a través del asta dorsal.

60 **[0086]** Las fibras corticoespinales se tienden junto con las fibras corticobulbares a través de la extremidad posterior de la cápsula interna para alcanzar la porción ventral del mesencéfalo. Se separan en el puente en pequeños haces de fibras que pasan entre los núcleos pontinos. Se reagrupan en la médula para formar la pirámide medular. Aproximadamente tres cuartas partes de las fibras corticoespinales cruza la línea media en la decusación piramidal en la unión de la médula y la medula espinal. Las fibras cruzadas descienden en la parte dorsal de las columnas laterales (columna dorsolateral) de la médula espinal formando el tracto corticoespinal lateral. Las fibras no cruzadas descienden en las columnas ventrales como el tracto corticoespinal ventral.

**[0087]** Las divisiones lateral y ventral del tracto corticoespinal terminan en aproximadamente las mismas regiones de la materia gris espinal que los sistemas lateral y medial del tronco cerebral. El tracto corticoespinal lateral se proyecta principalmente en los núcleos motores en la parte lateral del asta ventral y en las interneuronas en la zona intermedia. El tracto corticoespinal ventral se proyecta bilateralmente en la columna celular ventromedial y en las porciones adyacentes de la zona intermedia que contienen las neuronas motoras que inervan los músculos axiales. La Figura 3 muestra esquemáticamente las rutas aferentes principales (entrada).

**[0088]** La parte profunda dentro del cerebelo es la materia gris denominada los núcleos cerebelosos profundos señalados como el núcleo medial (fastigial), el núcleo interpuesto (interpósito) y el núcleo lateral (dentado). Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “núcleos cerebelosos profundos” se refiere conjuntamente a estas tres regiones. La Figura 2 muestra esquemáticamente las tres regiones de los DCN. La Figura 4 muestra esquemáticamente las rutas eferentes principales (salida) procedentes de los DCN. La Figura 5 muestra esquemáticamente los circuitos neurales en la corteza cerebral. Las Figuras 12A y 12B muestran esquemáticamente las conexiones entre los DCN y la médula espinal o el tronco cerebral, respectivamente.

**[0089]** Si se desea, puede correlacionarse la estructura del cerebro humano con estructuras similares de otros mamíferos. Por ejemplo, la mayoría de los mamíferos, incluyendo los seres humanos y los roedores, muestran una similar organización topográfica de las proyecciones de la corteza entorrinal-hipocampo, con neuronas en la parte lateral de la corteza entorrinal lateral y medial que se proyectan en la parte dorsal o el polo septal del hipocampo, mientras que la proyección en el hipocampo ventral se origina principalmente a partir de neuronas en las partes mediales de la corteza entorrinal (Principles of Neural Science, 4<sup>a</sup> ed., eds Kandel y col., McGraw-Hill, 1991; The Rat Nervous System, 2<sup>a</sup> ed., ed. Paxinos, Academic Press, 1995). Además, las células de la capa II de la corteza entorrinal se proyectan hacia el giro dentado, y terminan en los dos tercios externos de la capa molecular del giro dentado. Los axones procedentes de las células de la capa III se proyectan bilateralmente en las áreas CA1 y CA3 del asta de amón del hipocampo, que terminan en la capa molecular del estrato lagunoso.

**[0090]** En un aspecto, los procedimientos dados a conocer incluyen administrar en el SNC de un sujeto afectado un vector vírico neurotrópico que transporta un transgén que codifica un producto terapéutico y permite al transgén expresarse en el interior del SNC distalmente desde el sitio de administración a un nivel terapéutico. Además, el vector puede comprender un polinucleótido que codifica una molécula biológicamente activa eficaz para tratar el trastorno del SNC. Dichas moléculas biológicamente activas pueden comprender péptidos que incluyen, pero no se limitan a versiones naturales o mutadas de proteínas de longitud completa, versiones naturales o mutadas de fragmentos de proteínas, polipéptidos sintéticos, anticuerpos, y fragmentos de anticuerpos tales como moléculas Fab'. Las moléculas biológicamente activas pueden comprender también nucleótidos que incluyen polinucleótidos de ADN monocatenario o bicatenario y polinucleótidos de ARN monocatenario o bicatenario. Para una revisión de las tecnologías de nucleótidos a modo de ejemplo, que se pueden utilizar en la práctica de los procedimientos dados a conocer en la presente memoria descriptiva, véanse Kurreck, (2003) J., Eur. J. Biochem. 270, 1628 – 1644 [tecnologías de sentido contrario]; Yu y col., (2002) PNAS 99(9), 6047 – 6052 [Tecnologías de ARN de interferencia]; y Elbashir y col., (2001) Genes Dev., 15(2): 188 – 200 [tecnología de ARNip].

**[0091]** En una realización ilustrativa, la administración se lleva a cabo mediante inyección directa de una disolución de vector de título elevado en los DCN de un sujeto o paciente. Por ejemplo, la administración es mediante inyección directa en una o más regiones de los núcleos cerebelosos profundos del cerebro seleccionadas entre el grupo que consiste en la región medial (fastigial), la región interpuesta (interpósita) y la región lateral (dentada). Los DCN son un sitio atractivo para la inyección debido a sus extensas conexiones eferentes y aferentes con el tronco cerebral y la médula espinal. Estas células proporcionan un medio eficaz y mínimamente invasivo para administrar el vector vírico y el transgén expresados en las regiones de la médula espinal y las regiones del tronco cerebral. Sin estar limitados a ninguna teoría los terminales de los axones pueden capturar el vector vírico y transportarlo retrógradamente a lo largo del axón hasta el cuerpo celular de estas neuronas, que se proyecta a lo largo de la región de la médula espinal y/o el tronco cerebral. Los cuerpos celulares de las neuronas están también presentes en los DCN que tiene los extremos terminales del axón que terminan, por ejemplo, en la región cervical de la médula espinal. El vector vírico capturado por estos cuerpos celulares, o el transgén expresado resultante del vector vírico o ambos, se pueden transportar de forma anterógrada hasta los extremos terminales del axón en la región espinal cervical. Por tanto, utilizando los DCN como un sitio de inyección, solo se inyecta un pequeño volumen de vector vírico, pero este media significativamente en la expresión del transgén a lo largo de una o más regiones en la médula espinal y/o el tronco cerebral.

**[0092]** En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden la administración de un vector neurotrópico de título elevado que transporta un transgén terapéutico de tal manera que el producto del transgén se expresa a un nivel terapéutico en un segundo sitio en el interior del SNC distal al primer sitio. En algunas realizaciones, el título vírico de la composición es al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, o 50 ( $\times 10^{12}$  pg/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, o 50 ( $\times 10^9$  ut/ml); o (c) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, o 50 ( $\times 10^{10}$  ui/ml). En realizaciones adicionales, la administración se lleva a cabo mediante inyección intraparenquimal de una disolución de vector neurotrópico de título alto en el cerebro enfermo, posteriormente el transgén se expresa distal,

contralateral o ipsilateralmente, en el sitio de administración a un nivel terapéutico de al menos 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 mm desde el sitio de administración.

**[0093]** La distancia entre el primer y el segundo sitios se define como la región de distancia mínima entre el sitio de administración (primer sitio) y el límite de la transducción detectable del sitio distal (segundo sitio) tal como se midió utilizando los procedimientos conocidos en la técnica o tal como se describe en los Ejemplos, por ejemplo, la hibridación in situ. Algunas neuronas en el SNC de los mamíferos superiores pueden abarcar grandes distancias en virtud de sus proyecciones axonales. Por ejemplo, en seres humanos, algunos axones pueden abarcar una distancia de 1000 mm o más. De esta manera, en diversos procedimientos de la invención, el vector puede transportarse axonalmente a lo largo de la longitud completa del axón a dicha distancia para alcanzar y transducir el cuerpo celular progenitor.

**[0094]** Se escoge un sitio de administración del vector en el interior del SNC basándose en la región diana deseada de la neuropatología y en la topología de los circuitos cerebrales implicados siempre que el sitio de administración y la región diana tengan conexiones axonales. La región diana puede definirse, por ejemplo, utilizando coordenadas estereotáxicas en 3-D. en algunas realizaciones, el sitio de administración se escoge de tal manera que al menos 0,1, 0,5, 1, 5, o 10 % de la cantidad total de vector inyectado se administra distalmente en la región diana de al menos 1, 200, 500, o 1000 mm<sup>3</sup>. Un sitio de administración puede estar localizado en una región inervada por la proyección de neuronas que conectan regiones distales del cerebro. Por ejemplo, el área de la sustancia negra y el área segmental ventral envían proyecciones densas a la región caudada y al putamen (conocidas comúnmente como el cuerpo estriado). Se puede apuntar hacia las neuronas situadas en el interior de la sustancia negra y el segmento ventral para la transducción mediante el transporte retrógrado de AAV tras la inyección en el cuerpo estriado. Como otro ejemplo, el hipocampo recibe proyecciones axonales predecibles, bien definidas de otras regiones del cerebro. Otros sitios de administración pueden estar localizados, por ejemplo, en la médula espinal, el tronco cerebral (médula, mesencéfalo, y puente), mesencéfalo, cerebelo (incluyendo los núcleos cerebelosos profundos), diencefalo (tálamo, hipotálamo), telencefalo (cuerpo estriado, corteza cerebral, o; en el interior de la corteza, los lóbulos occipital, temporal, parietal o frontal), o sus combinaciones.

**[0095]** El segundo sitio (diana) puede estar localizado en cualquier región del SNC, incluyendo el cerebro y la médula espinal, que contiene unas neuronas que se proyectan hasta el primer sitio (de administración). En algunas realizaciones, el segundo sitio está en una región del SNC escogida entre la sustancia negra, el bulbo raquídeo, el tronco cerebral, o la médula espinal.

**[0096]** Para administrar el vector específicamente a una región concreta del sistema nervioso central, especialmente a una región concreta del cerebro, se puede administrar mediante microinyección estereotáxica. Por ejemplo, en el día de la cirugía, los pacientes tendrán la base del marco estereotáxico fija en su sitio (atornillada en el cráneo). El cerebro con base de marco estereotáxico (RM-compatible con marcación fiduciaria) se someterá a diagnóstico por imágenes utilizando RM de alta resolución. Las imágenes de la RM se transferirán a continuación a un ordenador en el que se ejecuta el software estereotáxico. Se utilizará una serie de imágenes coronales, sagitales y axiales para determinar el sitio diana de inyección del vector, y la trayectoria el software traduce directamente la trayectoria en coordenadas tridimensionales adecuadas para el marco estereotáxico. Se taladran agujeros de burl por encima del sitio de entrada y el equipo estereotáxico se sitúa con la aguja implantada a la profundidad dada. A continuación se inyectará el vector en un vehículo farmacéuticamente aceptable. A continuación se administra el vector mediante inyección directa en el sitio diana primario y se transporta de forma retrógrada hasta los sitios distales diana mediante a través de los axones. Se pueden utilizar rutas adicionales de administración, por ejemplo, aplicación cortical superficial con visualización directa, u otra aplicación no estereotáxica.

**[0097]** Además, debido a que cada región de las regiones específicas diana de los DCN del SNC (véanse la Figura 1 y las Figuras 12A y 12 B), se puede apuntar específicamente a la región del SNC a la cual se administra el transgén preseleccionando la región de los DCN para la administración. Como será evidente para una persona experta en la técnica, se puede conseguir una gran cantidad de administraciones de dosificación y dirigidas variando la localización, la secuencia y el número de administraciones del transgén. El volumen total de material que se va a administrar, y el número total de partículas de vector que se van a administrar, los determinará el experto en la técnica basándose en aspectos conocidos de la terapia génica. Se pueden ensayar la eficacia y la seguridad terapéuticas en un modelo animal adecuado. Por ejemplo, existe una variedad de modelos animales bien caracterizados los LSD, por ejemplo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva o en Watson y col. (2001) *Methods Mol. Med.* 76: 383 – 403; o Jeyakumar y col. (2002) *Neuropath. Appl. Neurobiol.*, 28: 343 – 357 y ALS (véanse Tu y col. (1996) *P.N.A.S.* 93: 3155 – 3160; Roaul y col. (2005) *Nat. Med.* 11(4): 423 – 428 y Ralph y col. (2005) *Nat. Med.* 11 (4): 429 – 433).

**[0098]** En ratones experimentales, el volumen total de disolución de AAV inyectado es por ejemplo, entre 1 a 5 µl. Para otros mamíferos, que incluyen el cerebro humano, los volúmenes y tasas de administración se escalan adecuadamente. Por ejemplo, se ha demostrado que volúmenes de 150 µl pueden inyectarse de forma segura en el cerebro de primates (Janson et al. (2002) *Hum. Gene Ther.* 13: 1391 – 1412). El tratamiento puede consistir en una

única inyección por sitio diana, o se puede repetir en todo el tracto de la inyección, si es necesario. Se pueden utilizar múltiples sitios de inyección. Por ejemplo, en algunas realizaciones, además del primer sitio de administración, se administra una composición que contiene un vector vírico que transporta un transgén a otro sitio que puede ser contralateral o ipsilateral al primer sitio de administración. Las inyecciones pueden ser únicas o múltiples, unilaterales o bilaterales.

**[0099]** Se pueden producir preparaciones de AAV de título elevado utilizando técnicas conocidas en la materia, por ejemplo, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.658.776 y en *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Humana Press, 2003.

**[0100]** Los siguientes ejemplos proporcionan realizaciones ilustrativas de la invención. Una persona normalmente experta en la técnica reconocerá las numerosas modificaciones y variaciones que se pueden llevar a cabo sin alterar el espíritu o el alcance de la presente invención. Dichas modificaciones y variaciones quedan abarcadas dentro del alcance de la invención. Los ejemplos no limitan de ninguna manera la invención.

## EJEMPLOS

### Titulación de vectores recombinantes

**[0101]** Se midieron los títulos del vector de AAV de acuerdo con el número de copias del genoma (partículas de genoma por mililitro). Las concentraciones de partículas del genoma estuvieron basadas en la Taqman®-PCR del ADN del vector tal como se ha notificado anteriormente (Clark y col. (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10: 1031 – 1039; Veldwijk y col. (2002) *Mol. Ther.*, 6: 272 – 278). De manera breve, se trató el AAV-ASM purificado con tampón de digestión de la cápsida (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 EDTA 1,0 mM, SDS al 0,5 %, 1,0 mg/ml de proteinasa K) a 50° C durante 1 hora para liberar el ADN del vector. Las muestras de ADN se sometieron a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que hibridaron las secuencias específicas en el ADN del vector, tal como la región promotora, el transgén, o la secuencia poli A. A continuación se cuantificaron los resultados de la PCR mediante el software Real-time Taqman®, de tal manera que se proporcionaron mediante el Sistema detector de Secuencias Prism 7700 de Perkin Elmer-Applied Biosystems (Foster City, CA).

**[0102]** Los vectores que transportan un gen marcador ensayable tal como el gen de la  $\beta$ -galactosidasa o el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) se pueden titular usando un ensayo de infectividad. Las células susceptibles (por ejemplo, Hela, o células COS) se transducen con el AAV y se lleva a cabo un ensayo para determinar la expresión génica tal como la tinción de las células transducidas con el vector de la  $\beta$ -galactosidasa con X-gal (5-bromo-4 cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) o el microscopio de fluorescencia para las células transducidas con GFP. Por ejemplo, el ensayo se llevó a cabo de la siguiente forma.  $4 \times 10^4$  células HeLa se plaquearon en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos utilizando medios de crecimiento normales. Después de la unión, es decir, aproximadamente 24 horas después, se infectaron las células con Ad de tipo 5 a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 y se transdujeron con diluciones en serie del vector empaquetado y se incubaron a 37° C. Uno a tres días después, antes de que se observaran intensos efectos citopáticos, se llevó a cabo el ensayo adecuado sobre las células (por ejemplo, tinción con X-gal o microscopio de fluorescencia). Si se utiliza un gen indicador tal como el de la  $\beta$ -galactosidasa, las células se fijan en para formaldehído al 2 %, glutaraldehído al 0,5 % y se tiñen para la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa utilizando X-gal. Se cuentan las diluciones del vector que proporcionan células separadas en pocillos. Cada célula positiva representa 1 unidad de transducción (ut) del vector.

### La expresión de la proteína funcional disuade la mejora motora en un modelo de ratón terapéuticamente relevante

**[0103]** Los ratones ASMKO son un modelo aceptado de los tipos A y B de la enfermedad de Niemann-Pick (Horinouchi y col. (1995) *Nat. Genetics* 10: 288 – 293; Jin y col. (2002) *J. Clin. Invest.* 109: 1183 – 1191; y Otterbach (1995) *Cell* 81: 1053 – 1061). La enfermedad de Niemann-Pick (NPD) se clasifica como una enfermedad de almacenamiento lisosómico y es un trastorno neurometabólico heredado caracterizado por una deficiencia genética en la esfingomielinasa ácida (ASM, esfingomielin colinafosfohidrolasa, EC 3.1.3.12). La ausencia de una proteína ASM funcional da como resultado la acumulación de sustrato de esfingomielina en el interior de los lisosomas de las neuronas y la lía en todo el cerebro. Esto conduce a la formación de grandes cantidades de lisosomas distendidos en el pericarion que son una característica clave y el fenotipo celular primario del tipo A de la NPD. La presencia de lisosomas distendidos está correlacionada con la pérdida de la función celular normal y un progresivo curso neurodegenerativo que conduce a la muerte de los individuos afectados en la primera infancia (*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, eds. Scriver y col., McGraw-Hill, Nueva York, 2001, pp. 3589 – 3610). Los fenotipos secundarios celulares (por ejemplo, las anormalidades metabólicas adicionales) están también asociados con esta enfermedad, de forma notable, el elevado nivel de acumulación de colesterol en el compartimento lisosómico. La esfingomielina tiene una fuerte afinidad por el colesterol, lo que da como resultado el secuestro de grandes cantidades de colesterol en los lisosomas de los ratones ASMKO y en pacientes humanos (Leventhal y col. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 44976 – 44983; Slotte (1997) *Subcell. Biochem.* 28: 277 – 293; y Viana y col. (1990) *J. Med. Genet.* 27: 499 – 504).

**[0104]** El siguiente experimento evaluó la capacidad relativa de los vectores de los serotipos AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 y AAV2/8 que codifican la ASM humana (hASM) para expresar la proteína hASM, una patología correcta de almacenamiento del colesterol, que experimentan transporte, rescate de células de Purkinje, e inicio de la recuperación funcional en el ratón ASMKO tras inyección unilateral en el interior de los núcleos cerebelosos profundos. Un grupo adicional de ratones ASMKO recibió inyecciones bilaterales en los DCN con el fin de evaluar si el aumento de la diseminación/expresión de la proteína del transgén mejoraría la recuperación funcional del comportamiento.

**[0105]** Sesenta y seis ratones (ASMKO) machos homocigóticos ( - / - ) con el gen de la esfingomielinasa ácida inactivado y dieciséis crías de machos de la misma camada silvestres se engendraron a partir de apareamientos con heterocigóticos ( + / - ). Se genotipicaron los ratones mediante la PCR siguiendo el procedimiento descrito en Gal y col. (1975) N Engl J Med: 293: 632 – 636. Los ratones de la colonia original se cruzaron posteriormente con la raza C57/Bl6. Los animales se alojaron con un ciclo de 12.12 horas de luz: oscuridad y se les proporcionó alimento y agua *a voluntad*. Se llevaron a cabo todos los procedimientos mediante un protocolo aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los animales.

**[0106]** Tras anestesiarnos con isoflurano, los ratones (~ 7 semanas de edad) se inyectaron unilateralmente en los núcleos cerebelosos profundos (A-P. -5,75 desde bregma, M-L. -1,8 desde bregma, D-V: -2,6 desde dura, varilla incisiva: 0,0) con uno de los siguientes vectores del serotipo de AAV (n = 8/vector) AAV1-CMV-βgal, AAV1-CMV-ASM, AAV2-CMV-ASM, AAV5-CMV-ASM, AAV7-CMV-ASM, y AAV8-CMV-ASM. Se administraron los vectores con una jeringuilla Hamilton de 10 µl montada sobre una bomba de jeringuilla a una velocidad de 0,5 µl/minuto para un total de  $1,86 \times 10^{10}$  de partículas de genoma por cerebro. El volumen de inyección final para cada vector fue de 4 µl. Una hora antes y veinticuatro horas después de la cirugía se administró a los ratones ketoprofeno (5 mg/kg; SC) para la analgesia.

**[0107]** Se sacrificaron los ratones 7 semanas después de la inyección (14 semanas de edad). En el momento del sacrificio se dosificaron en exceso los ratones con eutasol (150 mg/kg; IP) y se decapitaron rápidamente (n = 5/grupo) o se perfundieron transcárdialmente (n = 3/grupo). Se retiraron rápidamente los cerebros de los ratones decapitados, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido, se diseccionaron en 3 secciones (hemisferio cerebral derecho, hemisferio cerebral izquierdo, y cerebelo) homogeneizadas, y se analizaron para la hASM mediante ELISA. Los cerebros y las médulas espinales de los ratones perfundidos se procesaron para la expresión de la proteína ASM humana, la acumulación de colesterol tal como se detectó mediante la tinción con filipina, y la supervivencia de células de Purkinje con la tinción de la calbindina en secciones de 50 µm para vibratomo. Los ratones ASMKO que recibieron inyecciones bilaterales (- de 7 semanas de edad) de AAV2/1-βgal (n = 8), AAV2/1-ASM (n = 5), y AAV2/2-ASM (n = 5) se sacrificaron a las 20 semanas de edad tras experimentar la prueba del rotarod. Se probaron los ratones con el rotarod mediante la aceleración y el vaivén para la función motora en el SmartScan) utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Se reproducen los procedimientos a modo de ejemplo en Sleat y col. (2004) J. Neurosci. 24: 9117 – 9126. Las Figuras 10 y 11 muestran gráficamente los resultados de las pruebas del rotarod como una medida de la recuperación de la función motora.

**[0108]** Se clonó el ADNc de la ASM humana de longitud completa bajo el control del promotor inmediato temprano del citomegalovirus (CMV), con una secuencia de poliadenilación del SV40, y un intrón híbrido, en un plásmido que contenía las ITR del serotipo 2 de AAV (AAV2 ITR). Jin y col. (2002) J Clin Invest. 109: 1183 – 1191. Se produjeron vectores híbridos mediante transfección triple utilizando una serie de plásmidos auxiliares que contenían los dominios que codificaban la cápsida específica del serotipo que además los genes de la replicación del AAV de tipo 2. Esta estrategia permite el empaquetamiento de los vectores AAV2 ITR en cada virión específico del serotipo Rabinowitz, y col. (2002) J Virol. 76: 791 – 801. Con esta solución se utilizó el genoma recombinante de la hASM para generar una serie de vectores rAAV-hASM de diversos serotipos que incluían AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 y AAV2/8. Se purificaron vectores de AAV recombinantes mediante cromatografía de intercambio iónico (Serotipos 2/1, 2/2 y 2/5). O’Riordan y col. (2000) J Gene Med 2: 444 – 54 o centrifugación en gradiente de CsCl (serotipos 2/8 y 2/7) Rabinowitz y col. (2002) J. Urol. 76: 791 – 801. Se determinó el título final de las partículas del virión de AAV-ASM (partículas resistentes a la ADNasa) mediante PCR con TaqMan de la secuencia de CMV. Clark y col. (1999) Hum. Gene Therapy 10: 1031 – 1039.

**[0109]** Los anticuerpos de la ASM humana son específicos de seres humanos y provocan reacciones cruzadas con la ASM de ratón. Se incubaron placas 9018 de Coster (Corning, NY) revestidas (100 µl/pocillo) con anticuerpo monoclonal dirigido contra ASM recombinante humana (rhASM) (2 µg/ml) diluido en tampón carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) durante la noche a 2 – 8° C. Se retiró el anticuerpo con revestimiento en exceso y se añadió diluyente de bloqueo (KPL, Inc., MD) durante 1 h a 37° C. Se lavaron las placas con un lavador de microplacas (Molecular Devices, CA) durante dos ciclos. Se pipetearon los controles y las muestras normalizadas en tampón de dilución normalizado (PBS, 0,05 % Tween, HP-BSA al 1 %) por duplicado y se dejaron incubar durante 1 h a 37° C. Se lavaron las placas tal como se ha descrito anteriormente. Se añadieron cien microlitros de anticuerpo biotinilado dirigido contra ASM humana recombinante (rhASM) (diluido 1: 20K en tampón de dilución normalizado) a cada pocillo, se dejaron incubar durante 1 h a 37° C, y a continuación se retiraron con un lavador de microplacas. A

continuación se añadió Estreptavidina – HRP (Pierce Biotechnology, Inc., IL) diluida 1: 10K (100 µl/pocillo) y se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tal como se ha descrito anteriormente y a continuación se incubaron con SureBlue TMB (KPL, Inc., MD) durante 15 minutos a 36 – 38° C. La reacción se detuvo con disolución de detención (KPL, Inc., MD) y se leyeron a continuación los valores de la absorbancia a 450 nm con un lector de placas Spectra Max 340 (Molecular Devices, CA). Se completó el análisis de los datos usando un software Softmax Pro 4.3 (Molecular Devices, CA).

**[0110]** Se determinó la concentración de proteínas de cada muestra con un kit BCA de ensayo de proteínas (Pierce Biotechnology, Inc., IL) utilizando albúmina de suero bovino como patrón.

**[0111]** Los ratones se perfundieron transcárdialmente con un fijador que contenía paraformaldehído al 2 %, glutaraldehído al 0,03 %, CaCl<sub>2</sub> al 0,002 % en tampón acetato de sodio 0,1 M a pH 6,5, seguido por perfusión con el mismo fijador a pH 8,5. Los cerebros y las médulas espinales de ratón se diseccionaron y se fijaron posteriormente durante la noche a 4° C en fijador a pH 8,5 sin glutaraldehído. Los tejidos se lavaron en tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,4, se incluyeron en agar al 3,5 % y se seccionaron en secciones sagitales de 50 µm con un vibratomo.

**[0112]** Los cerebros y las médulas espinales se seccionaron sagitalmente en un vibratomo a intervalos de 50 µm. Las secciones se procesaron para la inmunofluorescencia con anticuerpos primarios dirigidos contra la ASM humana (1: 200). Se incubaron las secciones en suero de burro al 10 %, Triton X-100 al 0,3 % en PBS durante 1 hora, seguido por la incubación con anticuerpo de ratón biotinilado dirigido contra ASM humana en suero de burro al 2 %, Triton X-100 al 0,2 % en PBS durante 72 horas. Tras el lavado, se amplificó la señal utilizando un kit Tyramide de Amplificación de la Señal (PerkinElmer, Boston MA). Se visualizó la proteína ASM humana con un microscopio fluorescente Nikon, y se capturaron las imágenes con una cámara SPOT y el software de Adobe Photoshop.

**[0113]** Se diluyó en primer lugar el complejo de la filipina (Sigma, St. Louis, MO) en metanol al 100 % hasta una concentración madre de 1 mg/ml. La disolución madre es estable durante 4 semanas a – 20° C. Tras lavar con PBS, se incubaron las secciones en la oscuridad durante tres horas en una disolución de 10 µg/ml de filipina preparada recientemente en PBS. A continuación se lavaron las secciones tres veces con PBS. Se visualizaron los depósitos de colesterol con un filtro ultravioleta en un microscopio de fluorescencia.

**[0114]** Los cerebros se procesaron para la inmunofluorescencia utilizando anticuerpos primarios dirigidos contra la proteína de unión al calcio, la calbindina. Se lavaron las secciones con tampón fosfato de potasio (KPB) y a continuación se enjuagaron con solución salina tamponada con fosfato de potasio (KPBS). A continuación se bloquearon las secciones en suero de burro al 5 %, Triton X-100 al 0,25 % en KPBS durante hasta 3 horas y a continuación se incubaron en suero de burro al 5 % Triton X-100 al 0,2 % y anticuerpo de ratón dirigido contra calbindina (1: 2500, Sigma, St. Louis, MO) en KPBS. Después de 72 horas a 4° C las secciones se enjuagaron con KPBS con Triton X-100 al 0,1 % tres veces. Se añadió anticuerpo secundario de burro dirigido contra CY3 de ratón (1: 333, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) en KPBS + Triton X-100 al 0,1 % durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las secciones con KPB y a continuación se montaron sobre portas revestidos de gel. Las células positivas a la calbindina se visualizaron con epifluorescencia. A fin de cuantificar las células de Purkinje del cerebelo, se seleccionaron cuatro secciones del cerebelo medio enfrentadas entre sí de cada animal. Las células de Purkinje inmunopositivas a la calbindina se visualizaron con un microscopio fluorescente y se contaron los cuerpos celulares con un aumento de 20X. Cada lóbulo se contó por separado. Se contaron dos planos focales separados por lóbulo. Solo se contaron las células en el foco para asegurar que no se contaba ninguna célula dos veces.

**[0115]** Se procesaron en primer lugar secciones de vibratomo de cincuenta (50) µm para la inmunofluorescencia con anticuerpos dirigidos contra la ASM humana, tal como se ha descrito anteriormente. A continuación se lavaron las secciones en PBS y se tiñeron para la colina acetiltransferasa (ChAT; anticuerpo policlonal de conejo, 1: 500, Chemicon International, Temecula, CA) con el protocolo reseñado anteriormente para la calbindina. Se utilizó, sin embargo, un anticuerpo de burro dirigido contra FITC de conejo (1: 200, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) en lugar de utilizar un anticuerpo CY3 secundario. Se visualizó la tinción en primer lugar con epifluorescencia y las últimas imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal.

**[0116]** Se cuantificó la tinción de la filipina de la siguiente forma. Se capturaron imágenes que correspondían a la exposición utilizando un microscopio de epifluorescencia vertical de campo amplio Nikon E600 equipado con una cámara digital SPOT. Se diagnosticó por imágenes el grupo AAV2/1-β-gal en primer lugar, y esta exposición se utilizó para adquirir todas las imágenes adicionales. Cada imagen analizada representa un plano sagital medial en toda la longitud de cada semicerebro. Se llevó a cabo el análisis morfométrico con el software Metamorph (Universal Imaging Corporation). Las imágenes de AAV2/1-β-gal se compararon con un umbral; una vez establecido, se utilizó el mismo umbral en todas las imágenes. El usuario seleccionó las siguientes regiones manualmente y se analizaron por separado; el cerebelo, el puente, la médula, el mesencéfalo, la corteza cerebral, el hipocampo, el tálamo, el hipotálamo y el cuerpo estriado. Se midió la intensidad integrada en cada región, y se utilizaron todas las medidas (n = 3/grupo) a partir de un grupo dado de animales para generar promedios. A continuación se calculó la reducción en

el colesterol en los animales tratados como el porcentaje de disminución de la intensidad integrada en comparación con los ratones inyectados con  $\beta$ -gal inactivado. Se observó la inmunotinción positiva de la hASM en todo el cerebelo (Tabla 1), el puente, la médula y la médula espinal tras la inyección unilateral de AAV-ASM en el interior de los núcleos cerebelosos profundos.

5

Tabla 1

Áreas con tinción de la hASM positiva como función del serotipo de AAV. * indica que la hASM positiva estaba por debajo del límite de detección, pero se siguió llevando a cabo la corrección de la patología del colesterol					
Estructura	AAV1	AAV2	AAV5	AAV7	AAV8
núcleos cerebelosos profundos	++++	++	+++	+++	++++
lóbulos cerebelosos	++++	++	+++	+++	++++
puente	++	++	++	++	+
médula	+	++	++	+++	+
médula espinal		+++	+++	++	+
tálamo	*	*	*	*	*
hipotálamo	*	*	*	*	*
hipocampo	*	*	*	*	*
cuerpo estriado	*	*	*	*	*
corteza cerebral	*	*	*	*	*

10 **[0117]** En el interior del cerebelo, los ratones tratados con AAV2/1-ASM tuvieron el nivel más extendido (es decir, la diseminación entre los lóbulos dentro de la misma sección sagital) de expresión de la hASM, mientras que los ratones tratados con AAV2/2-ASM tuvieron el nivel más restringido de expresión de la proteína ASM humana. La expresión de la proteína ASM humana en los ratones tratados con AAV2/5-ASM, AAV2/7-ASM, y AAV2/8-ASM fue intermedia entre estos dos grupos. La diseminación medial – lateral entre las secciones sagitales fue máxima en los ratones tratados con los serotipos 1 y 8 y mínima en los ratones inyectados con el serotipo 2. Los serotipos 5 y 7 iniciaron modelos de diseminación medial – lateral intermedios entre los serotipos 1 y 2. Cada capa del cerebelo (es decir, molecular, de Purkinje y granular) se transdujo por cada serotipo de AAV; sin embargo, fue evidente un aumento en la afinidad por la capa molecular para todos los serotipos. La transducción de las células de Purkinje fue máxima en los ratones tratados con los serotipos 1 y 5. Los ratones inyectados con el serotipo 7 tuvieron una cantidad menor de células de Purkinje transducidas. Los ratones tratados con el serotipo 8 tuvieron también pocas células de Purkinje transducidas, pero tuvieron una menor expresión de la ASM en el interior de la capa granular cuando se los comparó con los serotipos 1, 2, 5 y 7. Las células de Purkinje transducidas con la ASM parecieron tener una citoestructura sana. Los análisis cuantitativos de la expresión de la proteína hASM mediada por AAV mediante ELISA en homogenados de tejido cerebeloso apoyan estos hallazgos inmunohistoquímicos. Los ratones inyectados con los serotipos 1 y 8 demostraron tener niveles de la proteína hASM en el cerebelo significativamente mayores ( $p < 0,0001$ ) cuando se los comparó con el resto de ratones. Los niveles de la hASM cerebelosa de los ratones inyectados con los serotipos 2, 5 y 7 no estuvieron por encima de los niveles de los ratones silvestres (es decir, los niveles de fondo). Tal como se esperaba, no se detectó ASM humana en los ratones silvestres – los anticuerpos dirigidos contra la hASM utilizados en el ELISA son específicos de seres humanos.

30 **[0118]** Una ausencia de la proteína ASM funcional da como resultado una acumulación lisosómica de esfingomielina, y defectos metabólicos secundarios posteriores tales como tráfico anormal de colesterol. Sarna y col. Eur. J. Neurosci. 13: 1873 – 1880 y Leventhal y col. (2001) J. Biol. Chem. 276: 44976 – 4498. La acumulación de colesterol libre en el cerebro del ratón ASMKO se visualizó mediante la demanda de filipina, una molécula autofluorescente aislada de streptomyces filipinensis. Los cerebros de los ratones silvestres no se tiñen positivamente para la filipina. En todos los ratones tratados con AAV (con excepción de AAV2/1- $\beta$ gal) el aclaramiento de la tinción de la filipina (Tabla 2) se solapó con las áreas que fueron positivas para la inmunotinción de la hASM indicando que cada serotipo del vector es capaz de generar un producto del transgén funcional.

35



Tabla 2

Porcentaje de reducción en el aclaramiento de la filipina (es decir, colesterol) en comparación con los ratones ASMKO tratados con AAV-βgal en regiones del cerebro seleccionadas tras la inyección intracerebral de diferentes serotipos de AAV (n = 3/serotipo; 2/1, 2/2, 2/5, 2/7, y 2/8) que codifican la ASM humana en los núcleos cerebelosos profundos de los ratones ASMKO.					
	2/1	2/2	2/5	2/7	2/8
Cerebelo	96,54 ± 2,14	93,85 ± 1,257	86,75 ± 9,58	96,47 ± 1,93	99,12 ± 0,66
Mesencéfalo	96,72 ± 1,73	53,08 ± 22,89	65,88 ± 24,53	73,39 ± 22,39	91,10 ± 0,105
Puente	91,31 ± 5,80	50,07 ± 21,26	70,96 ± 25,60	93,15 ± 31,20	96,72 ± 1,20
Médula	93,29 ± 6,22	88,46 ± 3,04	81,55 ± 17,31	80,73 ± 14,99	97,40 ± 1,60
Tálamo	48,88 ± 25,25	41,21 ± 27,35	34,86 ± 16,67	48,44 ± 28,65	77,03 ± 12,08
Hipotálamo	82,81 ± 10,14	86,96 ± 12,93	88,46 ± 5,90	82,95 ± 11,46	99,68 ± 0,31
Corteza	27,60 ± 24,75	73,62 ± 14,9	55,65 ± 28,89	76,97 ± 14,27	98,30 ± 0,34

5 **[0119]** Tal como se ha demostrado anteriormente por (Passini y col. (2003) en "Society for Neuroscience" Nueva Orleans, LA), el aclaramiento de la filipina se produjo también en áreas anatómicamente conectadas con el sitio de inyección, pero que no se tiñeron positivamente para la hASM. El análisis con MetaMorph indicó que se produjo una reducción en la tinción con la filipina a lo largo de todo el eje rostral caudal. En el cerebelo y el tronco cerebral la filipina se redujo máximamente en los ratones tratados con AAV2/1-ASM y AAV2/8-ASM, mientras que en el diencéfalo y la corteza cerebral de los ratones tratados con AAV2/8-ASM hubo el mayor nivel global de aclaramiento de la filipina (Tabla 2). Sin embargo, estos resultados indican que el nivel de la hASM requerida para corregir la patología de almacenamiento del colesterol en el SNC del ratón ASMKO es mínimo (es decir, por debajo del límite de detección de la inmunofluorescencia de la hASM).

15 **[0120]** Los estudios histológicos indican que el cerebelo del ratón ASMKO experimenta un rápido deterioro. Más específicamente, las células de Purkinje mueren progresivamente entre las 8 y 20 semanas de edad (Sarna et al. (2001) Eur. J. Neurosci. 13: 1813 – 1880 y Stewart y col. (2002) en "Society for Neuroscience" Orlando, FL). La calbindina es un marcador celular ampliamente aceptado. La tinción de la calbindina positiva en ratones tratados con AAV-ASM podría sugerir que la expresión mediada por AAV de la hASM es terapéutica. Los resultados globales de los inventores indican que la expresión de la hASM mediada por AAV en el cerebelo indica la muerte de las células de Purkinje en el ratón AMSKO (Tabla 3). Tal como se esperaba, la supervivencia de las células de Purkinje no se produce en los lóbulos I – III; se inyectaron los ratones a las 7 semanas de edad y a las 8 semanas, la mayoría de estas células había muerto ya. La supervivencia de las células de Purkinje en los lóbulos IVN fue máxima en ratones tratados con el serotipo 1. En el lóbulo VI no se observó supervivencia significativa de las células de Purkinje en ratones tratados con AAV. En el lóbulo VII, únicamente los ratones tratados con el serotipo 5 mostraron una supervivencia significativa de las células de Purkinje. En el lóbulo VIII, de nuevo los ratones tratados con el serotipo 5 así como con el serotipo 2 mostraron una supervivencia significativa de las células de Purkinje. En los lóbulos IX y X no hubo diferencias significativas entre ratones WT (silvestres) y KO (inactivados genéticamente) (o entre ratones tratados con AAV) en los recuentos de las células de Purkinje. Esto se esperaba, debido a que a las 14 semanas de edad (es decir, la edad en el sacrificio) las células de Purkinje es estos lóbulos son aún viables en ratones ASMKO. En todos los lóbulos, la supervivencia de las células de Purkinje fue máxima en ratones tratados con los serotipos 1, 2, y 5 y mínima en ratones tratados con los serotipos 7 y 8.

Tabla 3

Recuentos de células de Purkinje en los lóbulos I – X cerebelosos en ratones WT y ASMKO tras la inyección intracerebelosa de diferentes serotipos de AAV (n = 3/serotipo; 2/1, 2/2, 2/5, 2/7, y 2/8) que codifican la ASM humana en los núcleos cerebelosos profundos de los ratones ASMKO. Los números que aparecen en negrita cursiva son significativamente diferentes de los ratones KO (a saber, ratones tratados con AAV2/1-βgal) p < 0.01.							
	2/1	2/2	2/5	2/7	2/8	KO	WT
I/II	7,42 ± 9,80	4,5 ± 10,58	9,40 ± 11,59	12,33 ± 10,58	1 ± 9,16	5,8 ± 11,59	113 ± 10,58
III	12,42 ± 10,32	11,33 ± 11,14	26,80 ± 12,21	15,33 ± 11,14	9,8 ± 12,21	2 ± 9,65	147,50 ± 11,14
IV/V	60,57 ± 17,28	36,5 ± 18,67	27,80 ± 20,45	29,66 ± 18,67	6,8 ± 20,45	8 ± 16,16	220,66 ± 18,67
VI	61,14 ± 11,21	27,5 ± 12,11	72,20 ± 13,26	31,16 ± 12,11	3,8 ± 13,26	68,5 ± 10,48	121,16 ± 12,11
VII	17,42 ± 4,15	37,66 ± 4,49	40,60 ± 4,91	5,33 ± 4,49	0,2 ± 4,95	17,37 ± 3,88	37,16 ± 4,49
VIII	44,14 ± 10,75	48,66 ± 11,62	82,80 ± 12,73	11,33 ± 11,62	18,40 ± 12,73	35,12 ± 10,06	103,33 ± 11,62
IX	126,28 ± 19,17	102,66 ± 20,71	136,40 ± 22,68	60,16 ± 20,71	84,40 ± 22,68	108,0 ± 17,93	144 ± 20,71
X	89,85 ± 12,54	76,83 ± 13,55	93,80 ± 14,84	48,16 ± 13,55	64,80 ± 14,84	87 ± 11,73	86,66 ± 13,55

5 **[0121]** En la prueba del rotarod con aceleración, los ratones se inyectaron unilateralmente con AAV2/1-ASM y AAV2/8-ASM demostró una latencia significativamente más larga (p < 0,0009) que la de los ratones ASMKO inyectados con AAV2/1-βgal. Los ratones inyectados con el serotipo AA2/1-ASM no fueron significativamente diferentes de los silvestres. Los ratones inyectados con AAV2/2-ASM y AAV2/5-ASM mostraron una tendencia de una latencia más larga que la de los ratones ASMKO inyectados con AAV2/1-βgal; mientras que, los ratones inyectados con AAV2/7-ASM no. Para la prueba del rotarod con vaivén, únicamente los ratones inyectados con AA2/1-ASM demostraron una latencia significativamente más larga (p < 0,0001) que la de los ratones inyectados con AA2/1-βgal. En este caso, los ratones silvestres se condujeron significativamente mejor que los ratones inyectados con AA2/1-ASM. Los ratones ASMKO que recibieron una inyección bilateral tanto de AAV2/1-ASM como de AAV2/2-ASM se condujeron significativamente mejor (p < 0,001) que los ratones tratados con ASMKO AAV2/1-βgal para las pruebas de aceleración y vaivén. Los ratones inyectados bilateralmente con AAV2/1-ASM se condujeron de manera comparable que los ratones silvestres en ambas pruebas.

20 **[0122]** Una manera de determinar si la hASM generada por AAV es funcionalmente activa en el interior del SNC de ASMKO es evaluar su influencia en la patología de almacenamiento del colesterol – un defecto metabólico secundario de la enfermedad NPA. En todos los ratones tratados con AAV (con excepción de AAV2/1-βgal) la corrección de la patología de almacenamiento del colesterol se solapa con las áreas que fueron positivas para la inmunotinción de la hASM lo que indica que cada serotipo del vector es capaz de generar un producto del transgén funcional. Tal como se ha demostrado anteriormente, se produjo también la corrección del metabolismo anómalo del colesterol en áreas anatómicamente conectadas con el sitio de inyección, pero también en regiones que no se tiñen positivamente para la hASM, lo que sugiere que el nivel de hASM requerido para la corrección de la patología de almacenamiento del colesterol es mínimo. Consistente con estos resultados histoquímicos y bioquímicos de la hASM, los ratones tratados con los serotipos 1 y 8 demostraron una marcada reducción en la patología de almacenamiento del colesterol. Los ratones tratados con los serotipos 2, 5 y 7 mostraron también una reducción en la patología de almacenamiento del colesterol, pero no en la misma extensión que los ratones tratados con los serotipos 1 y 8.

#### 30 Modelo terapéuticamente relevante de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

35 **[0123]** La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa fatal que se caracteriza por una pérdida selectiva de neuronas motoras en la corteza, el tronco cerebral y la médula espinal. La progresión de la enfermedad puede conducir a la atrofia de las extremidades, de los músculos axiales y respiratorios. La muerte celular de las neuronas motoras se acompaña progresivamente por la gliosis reactiva, anomalías en los neurofilamentos, y una pérdida significativa de grandes fibras mielinadas en los tractos corticoespinales y en las raíces ventrales<sup>1-6</sup>. Aunque la etiología de la ELA es mal comprendida, la acumulación de evidencias indica que la ELA esporádica (ELAE) y la ELA familiar (ELAF) comparten muchas características patológicas similares; proporcionando, de esta manera, una esperanza de que el estudio de cualquier forma conducirá a un tratamiento común<sup>7</sup>. La ELAF representa aproximadamente un 10 % de los casos diagnosticados, de los cuales el 20 % están asociados con mutaciones dominantes heredadas en la Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1)<sup>8</sup>. Los ratones

transgénicos que expresan la proteína SOD1 humana mutante (por ejemplo, ratones SOD1<sup>G93A</sup>) resumen muchas características patológicas de la ELA y son un modelo animal disponible para estudiar la ELA<sup>9</sup>. Para la ELAE, se han implicado una miríada de mecanismos patológicos como el origen subyacente, que incluyen la excitotoxicidad inducida, exposición a toxinas, disfunción del proteasoma, daño mitocondrial, desorganización de los neurofilamentos y pérdida del soporte neurotrófico<sup>10,11</sup>.

**[0124]** Hasta la fecha, no existe terapia eficaz para el tratamiento de la ELA. Se han investigado extensamente los factores neurotróficos tales como el factor I de crecimiento de la insulina (IGF-1) por su potencial utilidad en el tratamiento de la ELA. La administración intracraneal de vectores víricos (que son capaces de transporte axonal) a regiones del SNC que están interconectadas con el tronco cerebral y neuronas motoras espinales proporciona un medio de administración de potenciales agentes terapéuticos, tales como IGF-1, a áreas que serían difíciles de otra forma de apuntar con los medios de la técnica anterior.

**[0125]** Sin estar limitado por ninguna teoría, puede ser que estas regiones diana no necesiten necesariamente tener conexiones directas con las neuronas motoras; esto es, puede ser suficiente para estas regiones diana tener conexiones directas con células (por ejemplo, interneuronas y astrocitos) que componen meramente el entorno celular de la neurona. Esta suposición se cimienta por los estudios en ratones quiméricos que son mezclas de células normales que expresan la SOD1 mutante. Estos experimentos mostraron que las células no neuronales que no expresan la SOD1 mutante retrasaron la degeneración y alargaron significativamente la supervivencia de las neuronas motoras que expresaban el mutante<sup>13</sup>. Además, experimentos adicionales han demostrado que las células que se integran en el entorno celular de una neurona motora (por ejemplo, astrocitos y microglia) son importantes fuentes de factores neurotróficos, y se ha sugerido que el daño a estas células (tal como se produce patológicamente en la ELA) es una de los factores subyacentes que contribuye a la degeneración de la neurona motora<sup>11</sup>.

**[0126]** Una región del SNC que es probable que soporte el transporte de un vector vírico terapéutico y/o exprese la proteína en el entorno celular de las neuronas motoras es la de los núcleos cerebelosos profundos (DCN) del cerebelo. Los DCN tienen extensas conexiones aferentes y eferentes con el tronco cerebral y la médula espinal (véase la figura 1)<sup>14-19</sup>. Apuntar a los DCN en un modelo de ratón de enfermedad neurometabólica con vectores víricos capaces de transporte axonal dio como resultado la detección de la proteína del transgén en el tronco cerebral y la médula espinal<sup>20</sup>. De manera interesante, la proteína del transgén se detectó en células que fueron positivas y negativas para la colina acetiltransferasa (ChAT), un marcador de la neurona motora.

**[0127]** La expresión en exceso de mutaciones del gen de la superóxido dismutasa (SOD1) en ratones y ratas resume las características clínicas y patológicas de la ELA en seres humanos. Los compuestos activos en el retraso de los síntomas en este modelo han demostrado ser predictivos de la eficacia clínica en pacientes con ELA, y por tanto es un modelo terapéuticamente relevante de esta enfermedad. Dichos modelos de ratón se han descrito anteriormente en Tu y col. (1996) P.N.A.S. 93: 3155 – 3160; Kaspar y col. (2003) Science 301: 839 – 842; Roaul y col. (2005) Nat. Med. 11(4): 423 – 428 y Ralph y col. (2005) Nat. Med. 11(4): 429 – 433.

**[0128]** Los actuales experimentos, por tanto, buscan investigar la influencia de la administración bilateral en los DCN de AAV-IGF-1 sobre la progresión de la enfermedad en ratones SOD1<sup>G93A</sup> sintomáticos (es decir, de 90 días de edad). Específicamente, los objetivos primarios fueron determinar si la administración de AAV-IGF-1 dio como resultado la administración del vector (1) y/o la proteína en el tronco cerebral y la médula espinal; (2) una reducción en la neuropatología en el tronco cerebral y la médula espinal; (3) la mejora en la función motora del comportamiento; y (4) una significativa ampliación de la duración de la vida. Los resultados indican que la inyección de vectores víricos en las regiones del SNC que están interconectadas con el tronco cerebral y la médula espinal es una solución viable para administrar potenciales transgenes terapéuticos en el tronco cerebral y la médula espinal. Además, los resultados de los investigadores apoyan el desarrollo de terapias que se diseñan para tratar la degeneración de las neuronas motoras a través de la modificación de su entorno celular.

**[0129]** Se llevaron a cabo dos estudios en el G93A SOD1 (ratón SOD1<sup>G93A</sup> mutante, denominado aquí ratón SOD1). Este modelo imita estrechamente la ELA humana. Existe una degeneración progresiva de las neuronas motoras con déficits motores en las extremidades posteriores que aparecen alrededor de los 90 días de edad en el ratón. Se produce la muerte alrededor de los días 120-122. Cada estudio tuvo cuatro grupos de tratamiento: 1) ratones que recibieron el serotipo 1 de AAV que codifica IGF-1 (AAV1-IGF-1); 2) ratones que recibieron el serotipo 1 de AAV que codifica la proteína fluorescente verde (AAV1-GFP); 3) ratones que recibieron el serotipo 2 de AAV que codifica IGF-1 (AAV2-IGF-1); y 4) ratones que recibieron el serotipo 2 de AAV que codifican la proteína fluorescente verde (AAV2-GFP).

**[0130]** Sin estar limitados a ninguna teoría, IGF-1 es una proteína terapéutica para el tratamiento de la ELA debido a sus muchas acciones a diferentes niveles del eje neural (véase Dore y col., Trends Neurosci, 1997, 20: 326 – 331). En el cerebro: se cree que reduce la apoptosis neuronal y glial, protege a las neuronas frente a la toxicidad inducida por hierro, colchicina, desestabilizantes del calcio, peróxidos, y citocinas. Se cree también que modula la liberación

de los neurotransmisores acetilcolina y glutamato. Se cree también que induce la expresión del neurofilamento, la tubulina y la proteína básica mielina. En la médula espinal: se cree que IGF-1 modula la actividad de ChAT y atenúa la pérdida del fenotipo colinérgico, potencia el rápido crecimiento de las neuronas motoras, aumenta la mielinización, inhibe la desmielinización, estimula la proliferación de neuronas motoras y la diferenciación de células precursoras, y promueve la división, maduración, y crecimiento de las células de Schwann. En el músculo: se cree que IGF-1 induce la formación del grupo de receptores de la acetilcolina en la unión neuromuscular y aumenta la función neuromuscular y la fuerza muscular. En este experimento, se utilizó la forma IGF-1Ea de la proteína.

**[0131]** Se utilizó la proteína fluorescente verde como una proteína control, lo que permitió también la visualización de la expresión mediada por la inyección de los vectores de AAV.

**[0132]** Diecinueve días después del nacimiento, se inyectaron los ratones SOD1 bilateralmente en los DCN con los vectores de AAV recombinantes. En un estudio, la dosis fue aproximadamente de 2,0 e10 gc/ml por sitio. Se sacrificaron algunos ratones aproximadamente 110 días después del nacimiento y sus cerebros y médulas espinales se analizaron para la tinción de GFP, la expresión de IGF-1 mediante inmunohistoquímica, la expresión de IGF-1 mediante ELISA, la expresión de IGF-1 mediante RT-PCR, la localización de ChAT mediante inmunohistoquímica, la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), los recuentos de neuronas motoras, el ensayo funcional (vaivén y aceleración) en el rotarod, tal como se ha descrito anteriormente, la fuerza de agarre de las extremidades anteriores y de las extremidades posteriores utilizando una medida de la fuerza de agarre, y la supervivencia.

**[0133]** Se indujo un “acontecimiento de muerte” cuando los animales no se podían mantener “derechos” por sí mismos en los 30 segundos después de que el animal se colocara sobre su espalda, o los técnicos de cuidado animal encontrarán a los animales muertos. Se llevó a cabo la clasificación del “acontecimiento de muerte” en 2 individuos por grupo de animales (enmascarándose GFP frente a IGF-1) en el momento de la evaluación.

**[0134]** Se detectó GFP en el tronco cerebral y a lo largo de cada división de la médula espinal tras la administración bilateral de un vector de AAV que expresaba GFP en los núcleos cerebelosos profundos (DCN) (véanse las Figuras 13 y 14). La Figura 22 muestra la distribución de GFP en el interior del cerebro de ratón. Además de los DCN, se observó también la tinción positiva de GFP en los bulbos olfatorios, la corteza cerebral, el tálamo, el tronco cerebral, la corteza cerebelosa y la médula espinal. Todas estas áreas reciben alguna proyección desde y/o envían proyecciones a los DCN. Además, se observaron fibras y/o células positivas a GFP próximas a células positivas a ChAT.

**[0135]** Se detectó el ARNm de IGF-1 en el tronco cerebral y en cada división de la médula espinal en ratones tratados con AAV1-IGF-1 o AAV2-IGF-1 demostrándose que el vector experimentó transporte retrógrado (véase la Figura 18). Se detectó la proteína IGF-1 en el tronco cerebral y la médula espinal en ratones tratados con AAV1-IGF-1 o AAV2-IGF-1. Se observó una reducción en la tinción de GFAP en los núcleos oromotores (por ejemplo, el núcleo trigeminal motor, el núcleo facial, y el núcleo hipoglosal) y en cada división de la médula espinal en ratones tratados con AAV1-IGF-1 o AAV2-IGF-1 (véanse las Figuras 15-17). GFAP es un marcador de la gliosis, que es un hito patológico de la ELA. La administración de AAV1-IGF-1 o AAV2-IGF1 conduce a una mejora funcional significativa en las tareas del rotarod y la fuerza de agarre (véase la Figura 20). La administración de AAV-IGF-1 AAV2-IGF1 aumentó significativamente la duración de la vida del ratón SOD1 (véase la Figura 21 en la que la supervivencia promedio aumentó a 133,5 o 134 días en los ratones tratados con AAV-IGF-1 en comparación con los 121 o 120 días en los ratones tratados con AAV-GFP). La Figura 19 ilustra que la administración a los DCN de AAV-IGF-1 promovió la supervivencia de las neuronas motoras. La diferencia entre los ratones tratados con AAV que codifica IGF-1 en comparación con la administración a los DCN del AAV que codifica GFP es estadísticamente significativa para un valor  $p = 0,01$  tal como se indica mediante el asterisco.

**[0136]** Con respecto al serotipo, el tratamiento con AAV-IGF-1 promovió significativamente la supervivencia de las neuronas motoras, mejoró el comportamiento motor en las pruebas del rotarod y la fuerza de agarre, y aumentó significativamente la duración de la vida. Se detectó la expresión de IGF-1 en todo el tronco cerebral y la médula espinal utilizando la PCR y ELISA.

**[0137]** La memoria descriptiva se comprende más completamente a la luz de las enseñanzas de las referencias citadas en la misma. Las realizaciones comprendidas dentro de la memoria descriptiva proporcionan una ilustración de las realizaciones de la invención y no deben construirse para limitar el alcance de la invención. El técnico experto reconoce fácilmente que quedan abarcadas por la invención otras muchas realizaciones. Todas las publicaciones, patentes y secuencias biológicas citadas en esta divulgación se incorporan por referencia en su totalidad. En la medida en la que el material incorporado por referencia contradiga o sea inconsistente con la presente memoria descriptiva, la presente memoria descriptiva sustituirá cualquier material mencionado. La cita de cualquier referencia en la presente memoria descriptiva no es un reconocimiento a que dichas referencias sean la técnica anterior a la presente invención.

**[0138]** A no ser que se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de ingredientes del cultivo

celular, condiciones de tratamiento, y así sucesivamente utilizados en la memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones, debe entenderse que están modificados en todos los ejemplo por el término "aproximadamente". De acuerdo con esto, a no ser que se indique de otra forma lo contrario, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se buscan obtener mediante la presente invención. A no ser que se indique de otra forma, el término "al menos" precediendo una serie de elementos debe entenderse que se refiere a cada elemento en la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de atribuir, utilizando no más de la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente memoria descriptiva. Se pretende que dichos equivalentes sean abarcados por las siguientes reivindicaciones.

**Referencias**

**[0139]**

1. Leigh, P.N. y Swash, M. Cytoskeletal pathology in motor neuron diseases. *Adv Neurol* 56, 115 – 24 (1991).

2. Carpenter, S. Proximal axonal enlargement in motor neuron disease *Neurology* 18 841 – 51 (1968).

3. Gonatas, N.K. y col. Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 140, 731 – 7 (1992).

4. Hirano, A. y col. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 43, 471 – 80 (1984).

5. Leigh, P.N. y col. Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity. *Brain* 114 (Pt 2), 775 – 88 (1991).

6. Delisle, M.B. y Carpenter, S. Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 63, 241 – 50 (1984).

7. Hirano, A. Neuropathology of ALS: an overview. *Neurology* 47, S63 – 6 (1996).

8. Rosen, D.R. y col. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59 – 62 (1993).

9. Gurney, M.E. y col. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772 – 5 (1994).

10. Rowland, L.P. y Shneider, N.A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344, 1688 – 700 (2001).

11. Buijn, L.I., Miller, T.M. y Cleveland, D.W. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27, 723 – 49 (2004).

12. Cleveland, D.W. y Rothstein, J.D. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2, 806 – 19 (2001).

13. Lindsay, R.M. Neurotrophic growth factors and neurodegenerative diseases: therapeutic potential of the neurotrophins and ciliary neurotrophic factor. *Neurobiol Aging* 15, 249 – 51 (1994).

14. Kaspar, B.K., Llado, J., Sherkat, N., Rothstein, J.D. y Gage, F.H. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 301, 839 – 42 (2003).

15. Clement, A.M. y col. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302, 113 – 7 (2003).

16. Matsushita, M. Projections from the lowest lumbar and sacral-caudal segments to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* 404, 21 – 32 (1999).

17. Matsushita, M. y Gao, X. Projections from the thoracic cord to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* 386, 409 – 21 (1997).

18. Matsushita, M. y Xiong, G. Projections from the cervical enlargement to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* 377, 251 – 61 (1997).

19. Matsushita, M. y Yaginuma, H. Afferents to the cerebellar nuclei from the cervical enlargement in the rat, as demonstrated with the Phaseolus vulgaris leucoagglutinin method. Neurosci Lett 113, 253 – 9 (1990).

5 20. Matsushita, M. & Yaginuma, H. Projections from the central cervical nucleus to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. J Comp Neurol 353, 234 – 46 (1995); Voogd, J. The cerebellar nuclei and their efferent pathways in The rat nervous system (ed. Paxinos, G.) 208 – 215 (Elsevier Academic Press, San Diego, 2004).

10 LISTADO DE SECUENCIAS

**[0140]**

< 110 > GENZYME CORPORATION

< 120 > TERAPIA GÉNICA PARA TRASTORNOS DE LA MÉDULA ESPINAL

15 < 130 > 5302PCT

< 140 > PCT/US2006/

< 141 > 02-05-2006

< 150 > US 60/677.213

< 151 > 02-05-2005

20 < 150 > US 60/790,217

< 151 > 08-04-2006

< 160 > 2

< 170 > PatentIn versión 3.3

< 210 > 1

25 < 211 > 153

< 212 > PRT

< 213 > Homo sapiens

< 400 > 1

ES 2 394 482 T3

Met Gly Lys Ile Ser Ser Leu Pro Thr Gln Leu Phe Lys Cys Cys Phe  
 1 5 10 15

Cys Asp Phe Leu Lys Val Lys Met His Thr Met Ser Ser Ser His Leu  
 20 25 30

Phe Tyr Leu Ala Leu Cys Leu Leu Thr Phe Thr Ser Ser Ala Thr Ala  
 35 40 45

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe  
 50 55 60

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly  
 65 70 75 80

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys  
 85 90 95

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu  
 100 105 110

Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp  
 115 120 125

Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly  
 130 135 140

Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg Met

145

150

- < 210 > 2
- < 211 > 195
- < 212 > PRT
- < 213 > Homo sapiens
- < 400 > 2

5

Met Gly Lys Ile Ser Ser Leu Pro Thr Gln Leu Phe Lys Cys Cys Phe  
 1 5 10 15  
 Cys Asp Phe Leu Lys Val Lys Met His Thr Met Ser Ser Ser His Leu  
 20 25 30  
 Phe Tyr Leu Ala Leu Cys Leu Leu Thr Phe Thr Ser Ser Ala Thr Ala  
 35 40 45  
 Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe  
 50 55 60  
 Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys  
 85 90 95  
 Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu  
 100 105 110  
 Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp  
 115 120 125  
 Met Pro Lys Thr Gln Lys Tyr Gln Pro Pro Ser Thr Asn Lys Asn Thr  
 130 135 140  
 Lys Ser Gln Arg Arg Lys Gly Trp Pro Lys Thr His Pro Gly Gly Glu  
 145 150 155 160  
 Gln Lys Glu Gly Thr Glu Ala Ser Leu Gln Ile Arg Gly Lys Lys Lys  
 165 170 175  
 Glu Gln Arg Arg Glu Ile Gly Ser Arg Asn Ala Glu Cys Arg Gly Lys  
 180 185 190  
 Lys Gly Lys  
 195



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector vírico neurotrópico recombinante que comprende un transgén terapéutico, para uso en el tratamiento de un trastorno de las neuronas motoras en un sujeto, comprendiendo el tratamiento administrar dicho vector vírico a la región de la corteza motora del cerebro o en al menos una región de la región de los núcleos cerebelosos profundos del cerebro, en el que el producto del transgén se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz a al menos una subdivisión de la médula espinal y/o a al menos una división del tronco cerebral, y en el que dicho vector vírico neurotrópico recombinante es un vector vírico adenoasociado (vector de AAV).
- 10 2. El vector vírico neurotrópico recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un trastorno de las neuronas motoras en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho vector de AAV se selecciona entre el grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, y AAV8.
- 15 3. El vector vírico neurotrópico recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un trastorno de las neuronas motoras en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha región de la región de los núcleos cerebelosos profundos del cerebro se selecciona entre el grupo que consiste en la región medial, la región interpuesta, y la región lateral.
- 20 4. El vector vírico neurotrópico recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un trastorno de las neuronas motoras en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha administración es bilateral.
- 25 5. El vector vírico neurotrópico recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un trastorno de las neuronas motoras en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha subdivisión de la médula espinal se selecciona entre el grupo que consiste en la subdivisión cervical, la subdivisión torácica, la subdivisión lumbar, y la subdivisión sacral.
- 30 6. El vector vírico neurotrópico recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un trastorno de las neuronas motoras en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho transgén se administra a todas las subdivisiones de la médula espinal.
- 35 7. El vector vírico neurotrópico recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un trastorno de las neuronas motoras en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho transgén se selecciona entre el grupo que consiste en el factor-1 de crecimiento de la insulina (IGF-1), EPO (eritropoyetina), calbindina D28, CBP (proteína de unión [CREB] a la proteína de unión al elemento de respuesta del AMPC), parvalbúmina, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2, y CNTF (factor neurotrópico ciliar).
- 40 8. El vector vírico neurotrópico recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un trastorno de las neuronas motoras en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho trastorno de las neuronas motoras se selecciona entre el grupo que consiste en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis lateral primaria (ELP), atrofia muscular bulbar espinal, ataxia cerebelosa espinal, atrofia muscular espinal y lesión traumática de la médula espinal.
- 45 9. El vector vírico neurotrópico recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un trastorno de las neuronas motoras en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es un paciente humano.

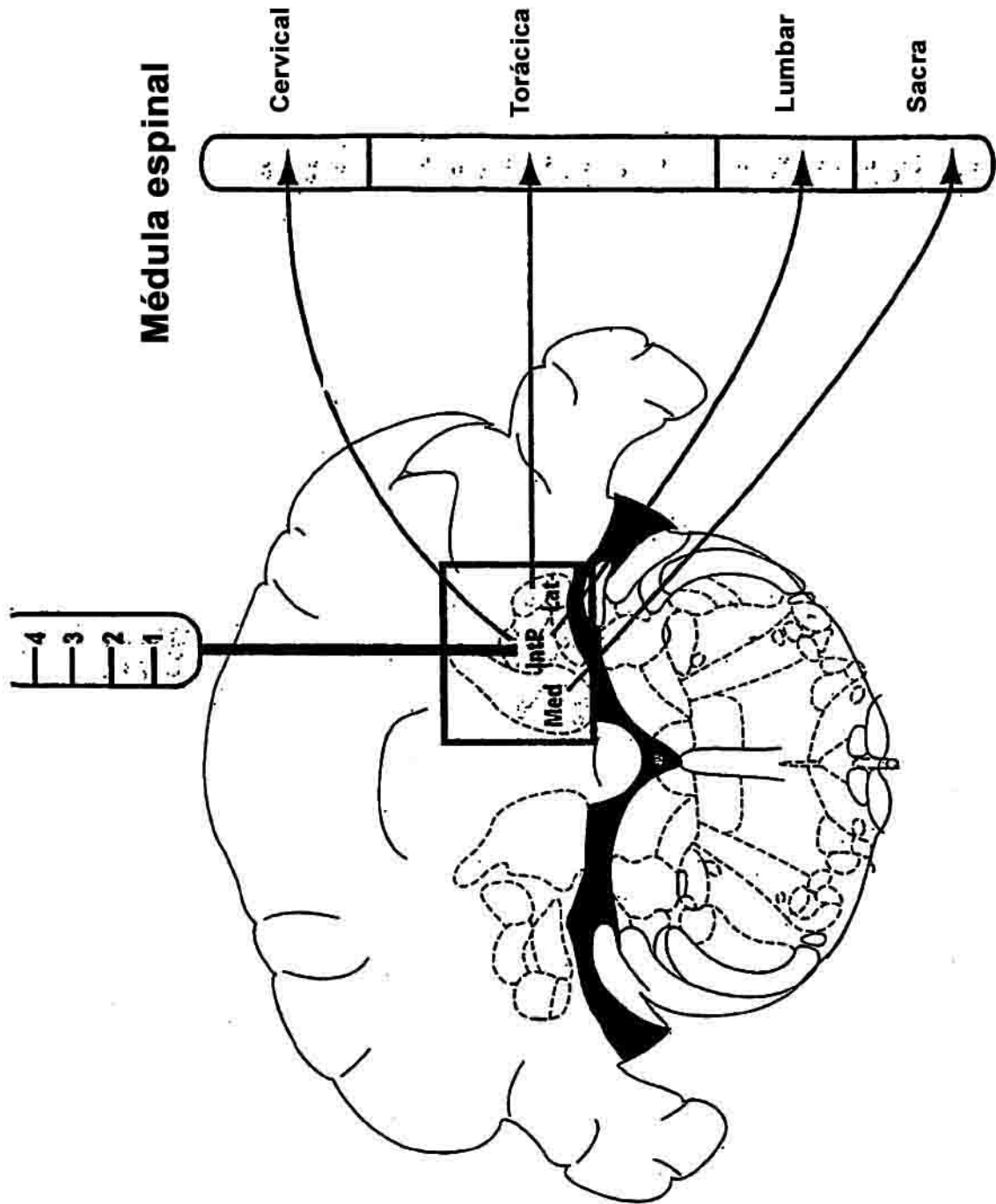
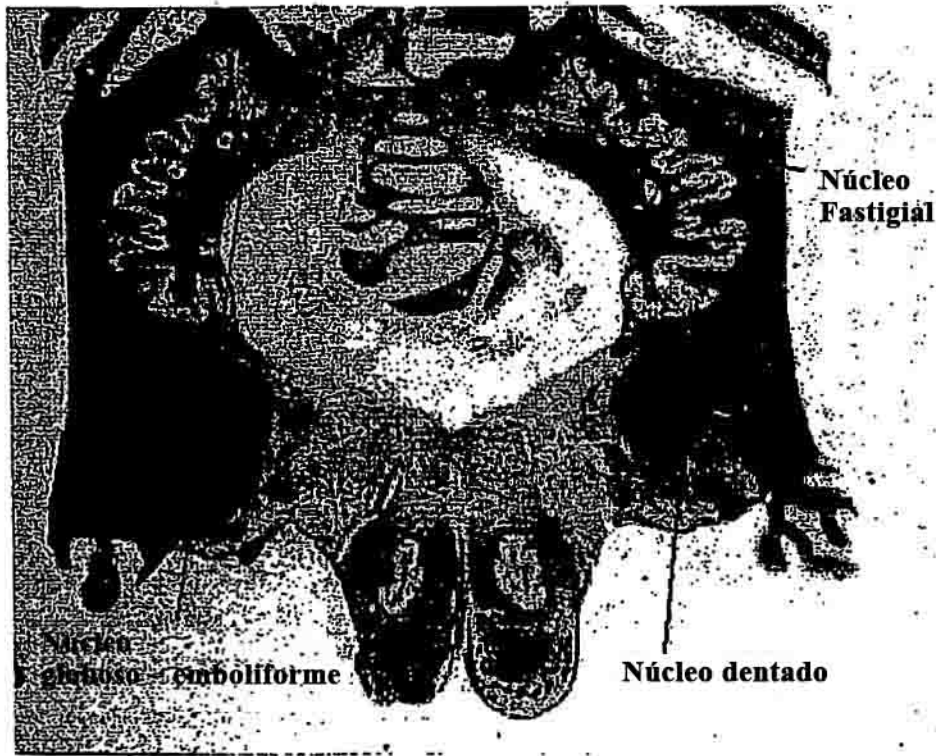
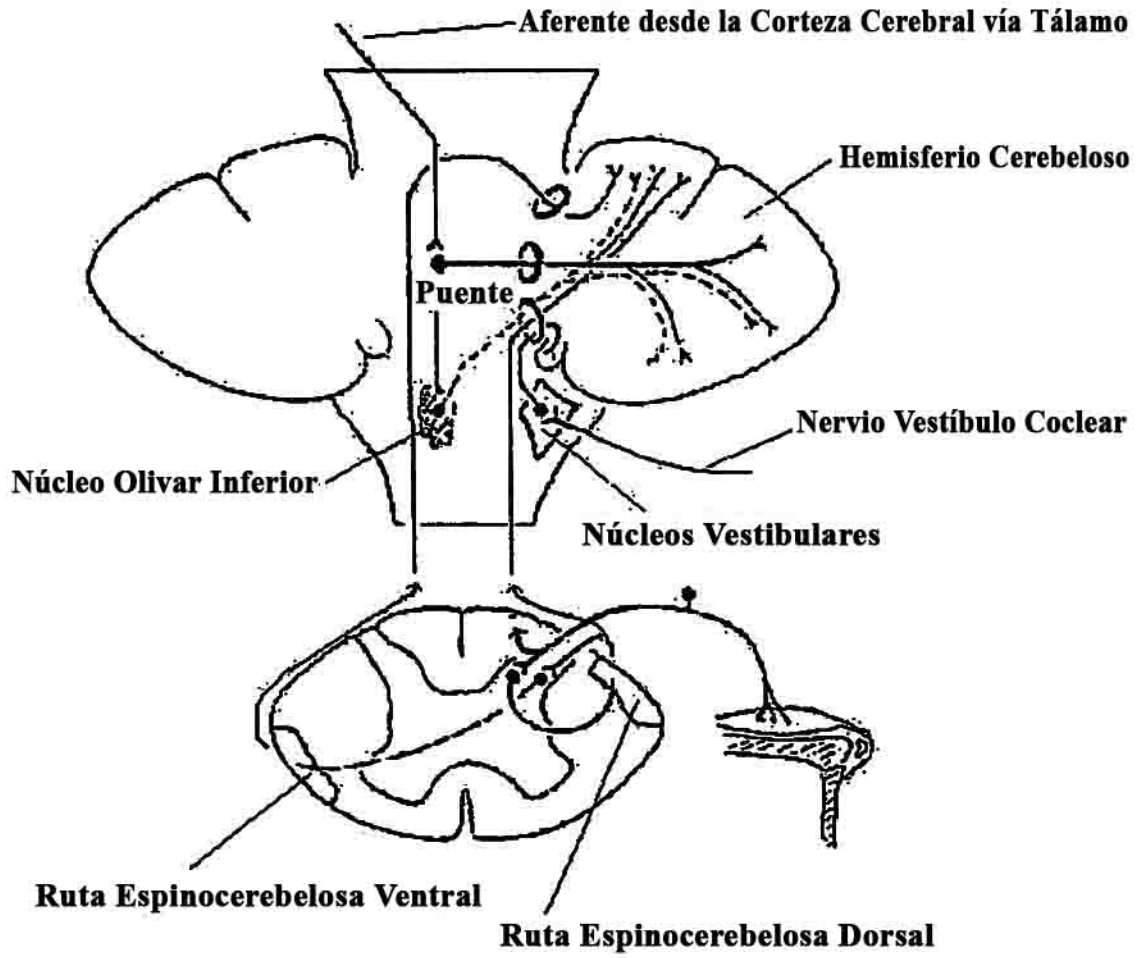


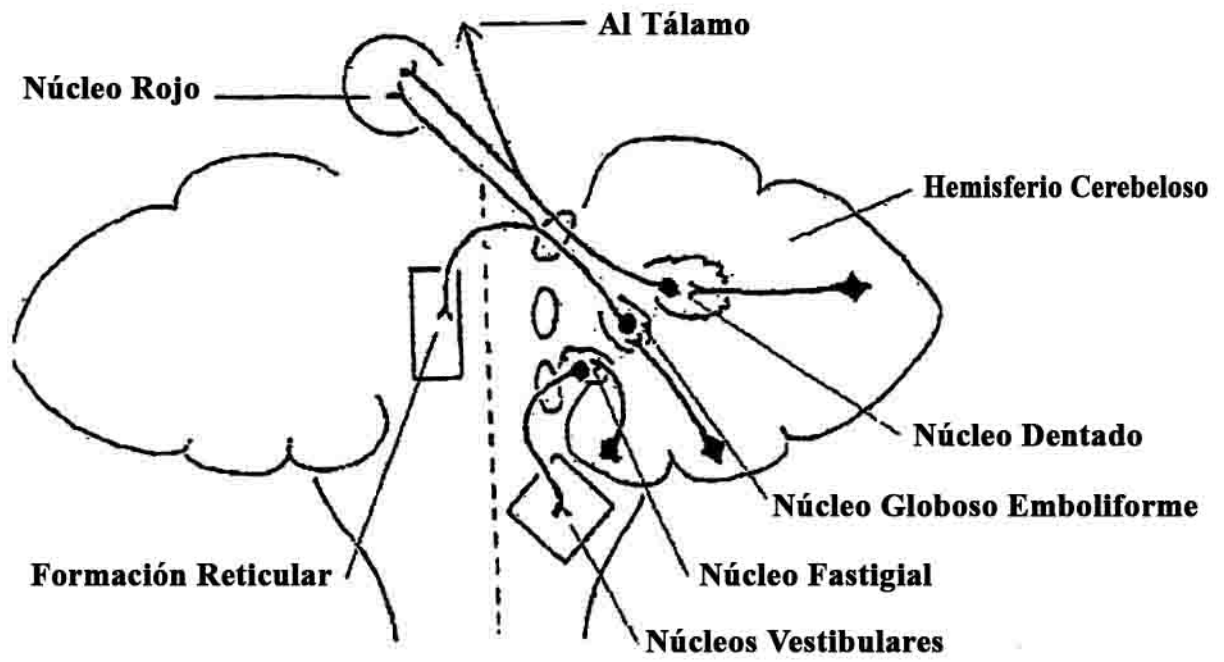
FIGURA 1



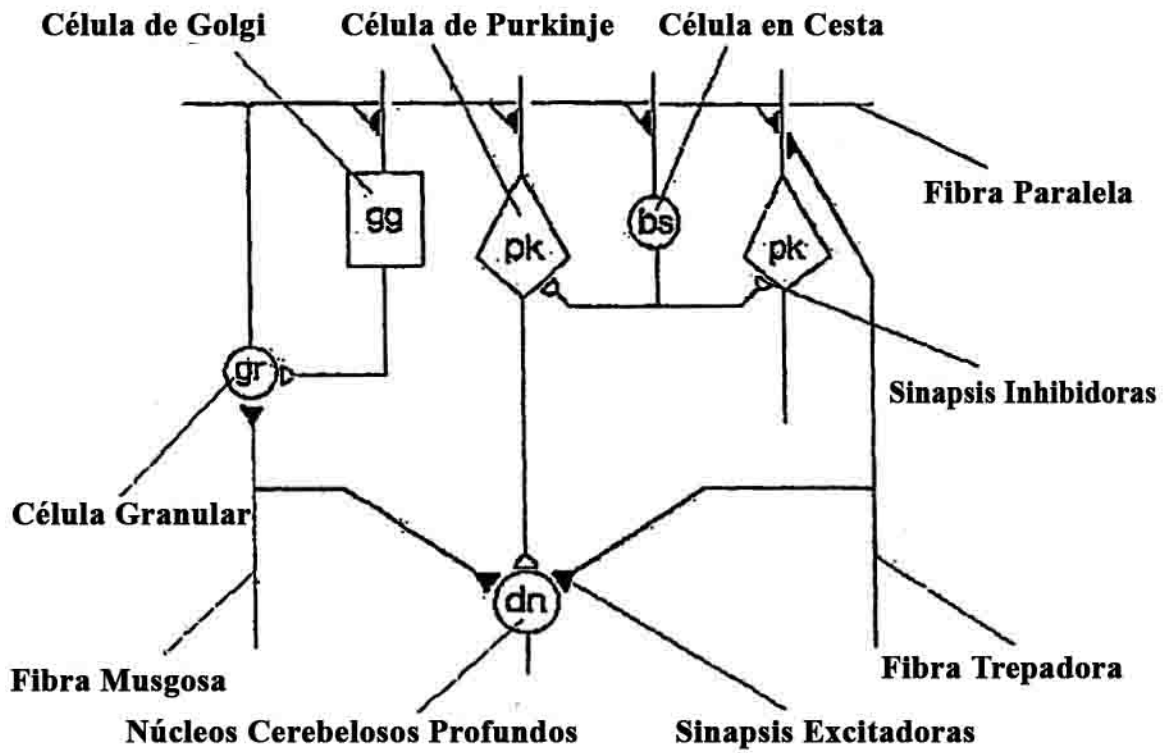
**FIGURA 2**



**FIGURA 3**



**FIGURA 4**



**FIGURA 5**

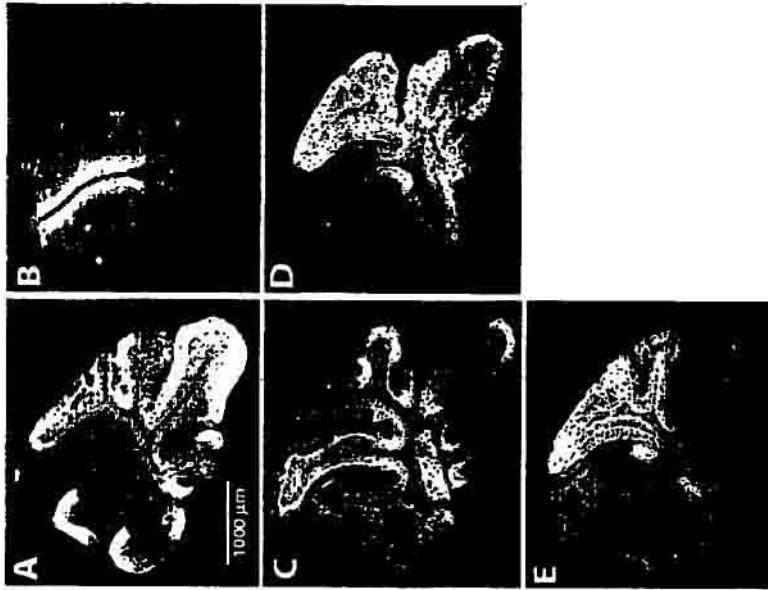


Figura 6

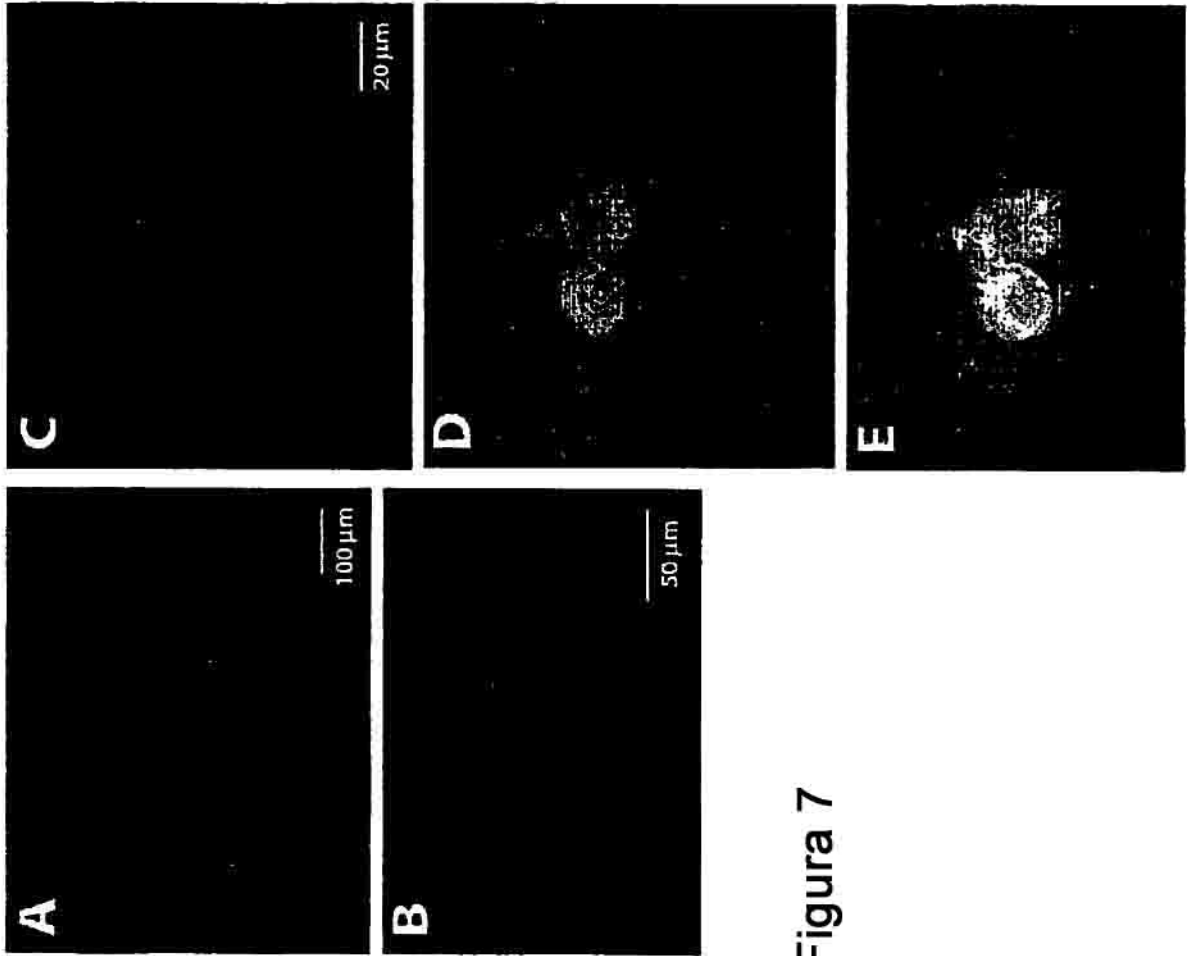


Figura 7



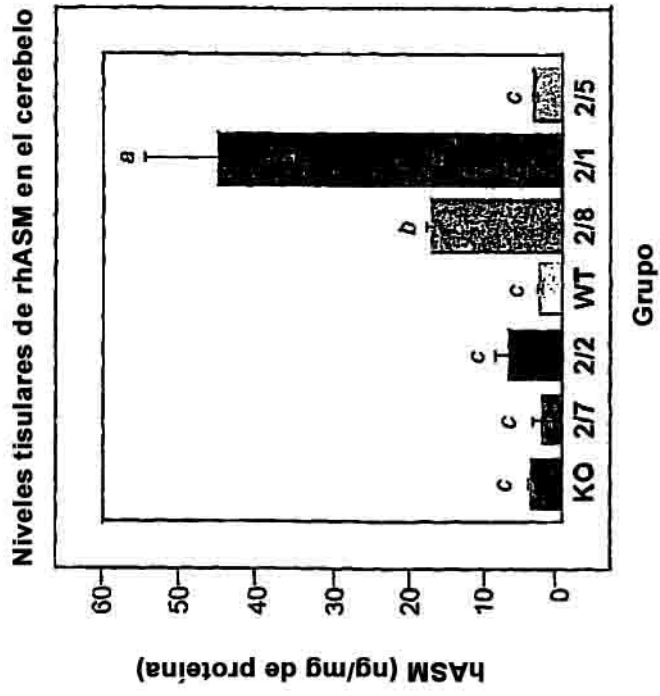


FIGURA 8

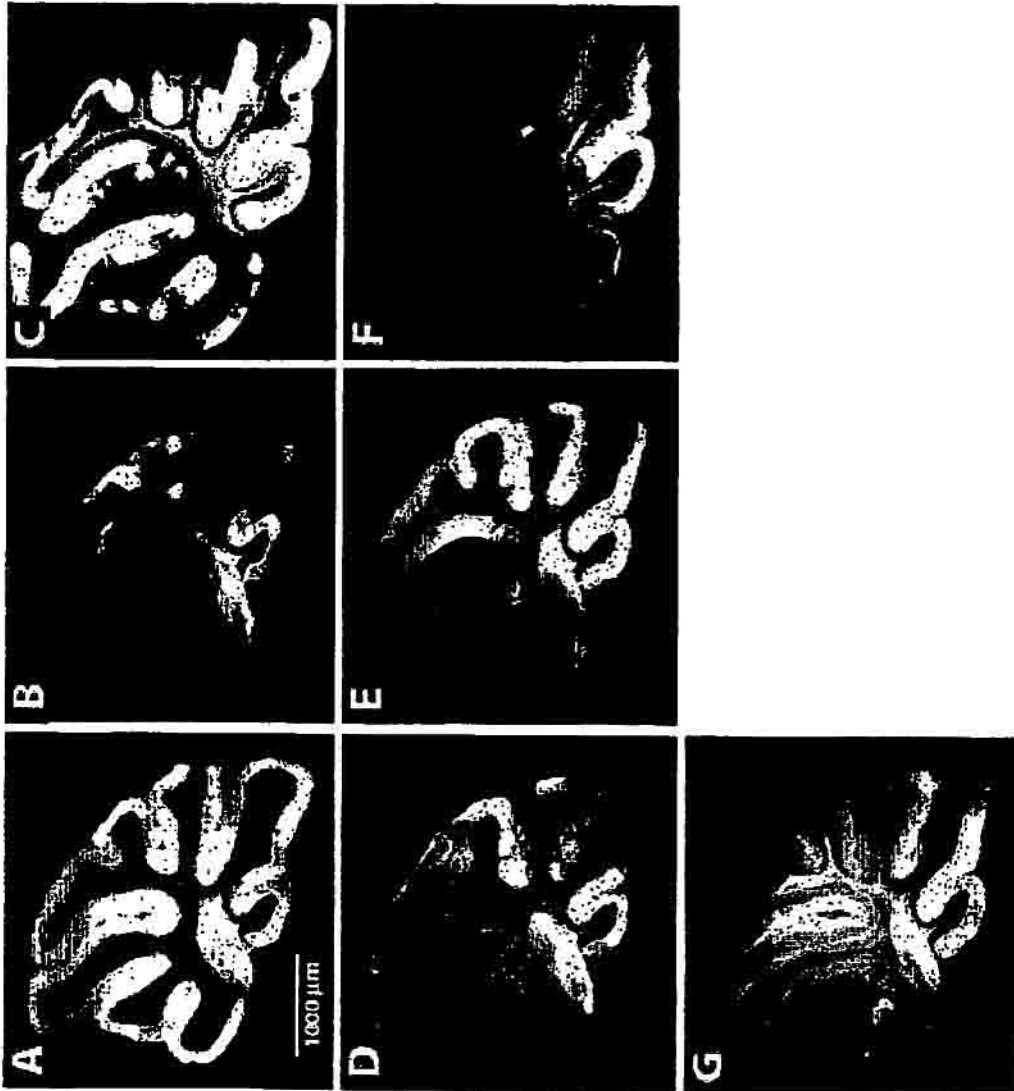


Figura 9

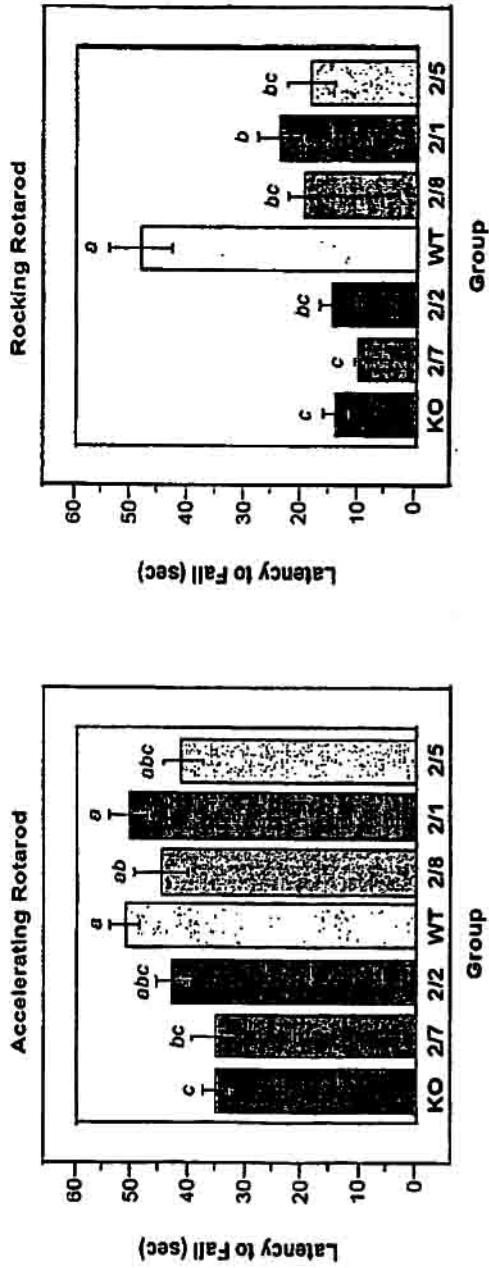


Figure 5

FIGURE 10

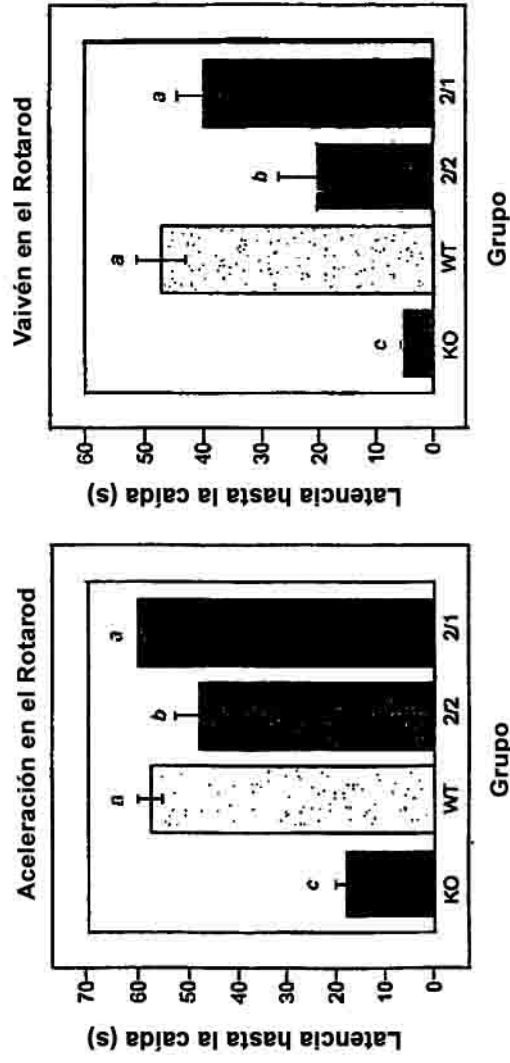


Figura 6

**FIGURA 11**

Figura 12A

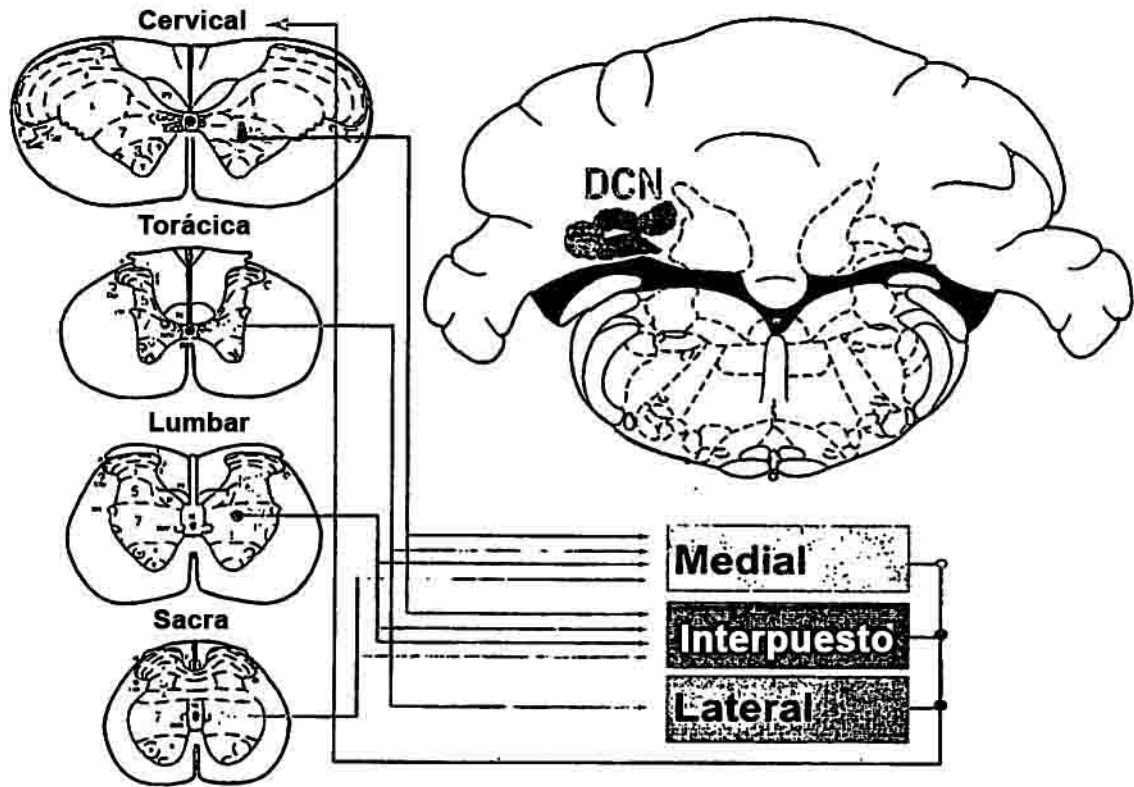


Figura 12B

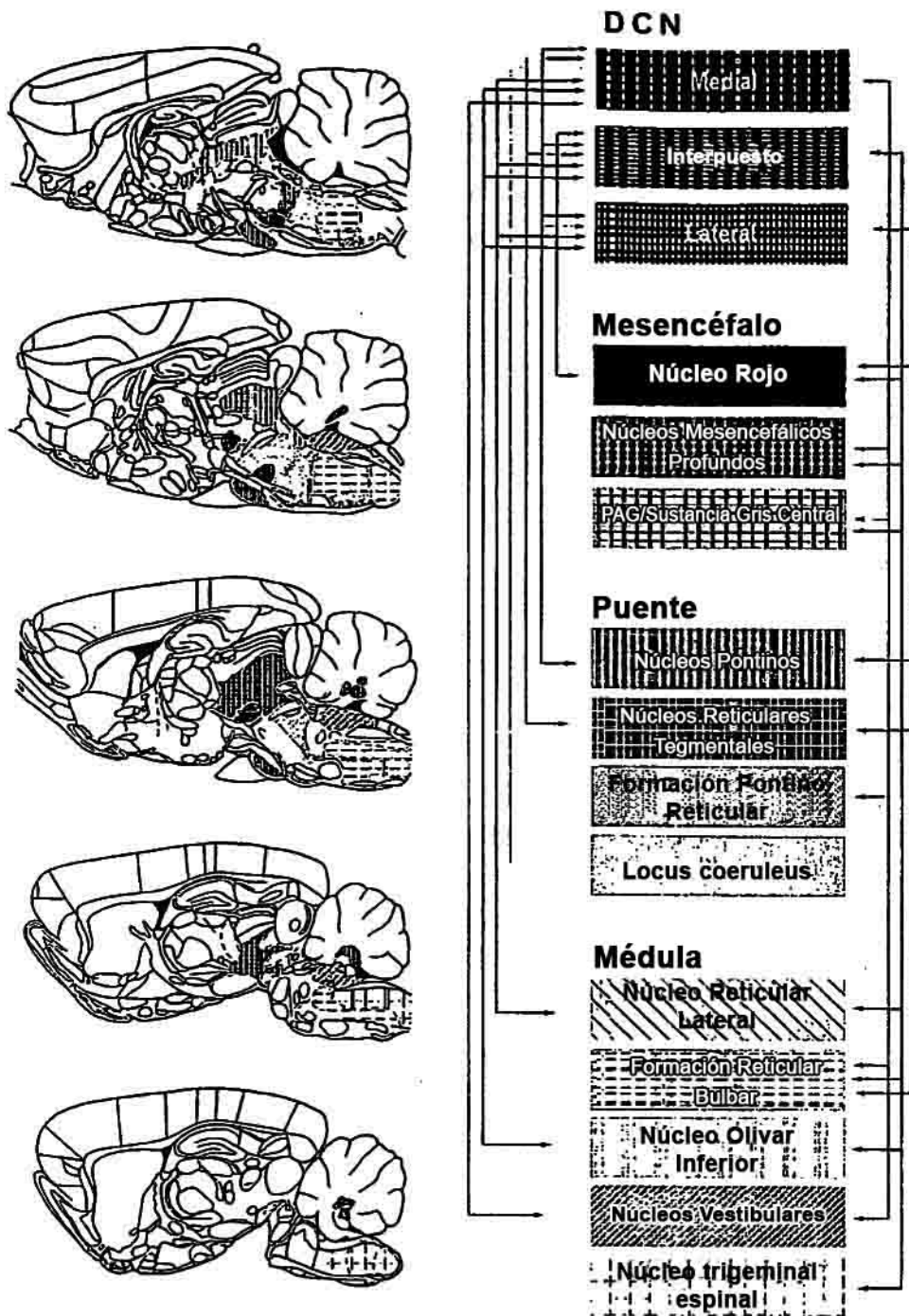




Figura 13

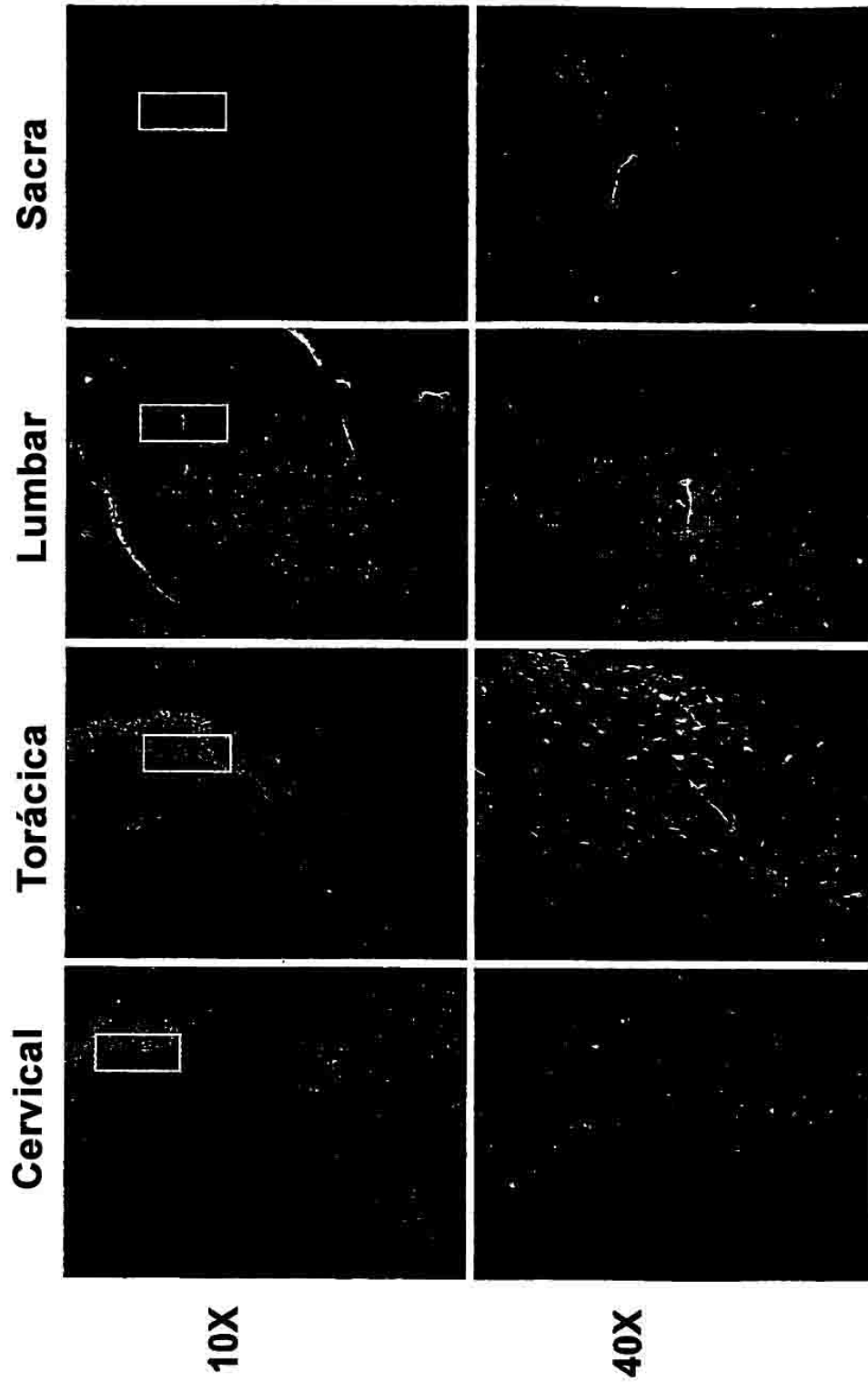


Figura 14



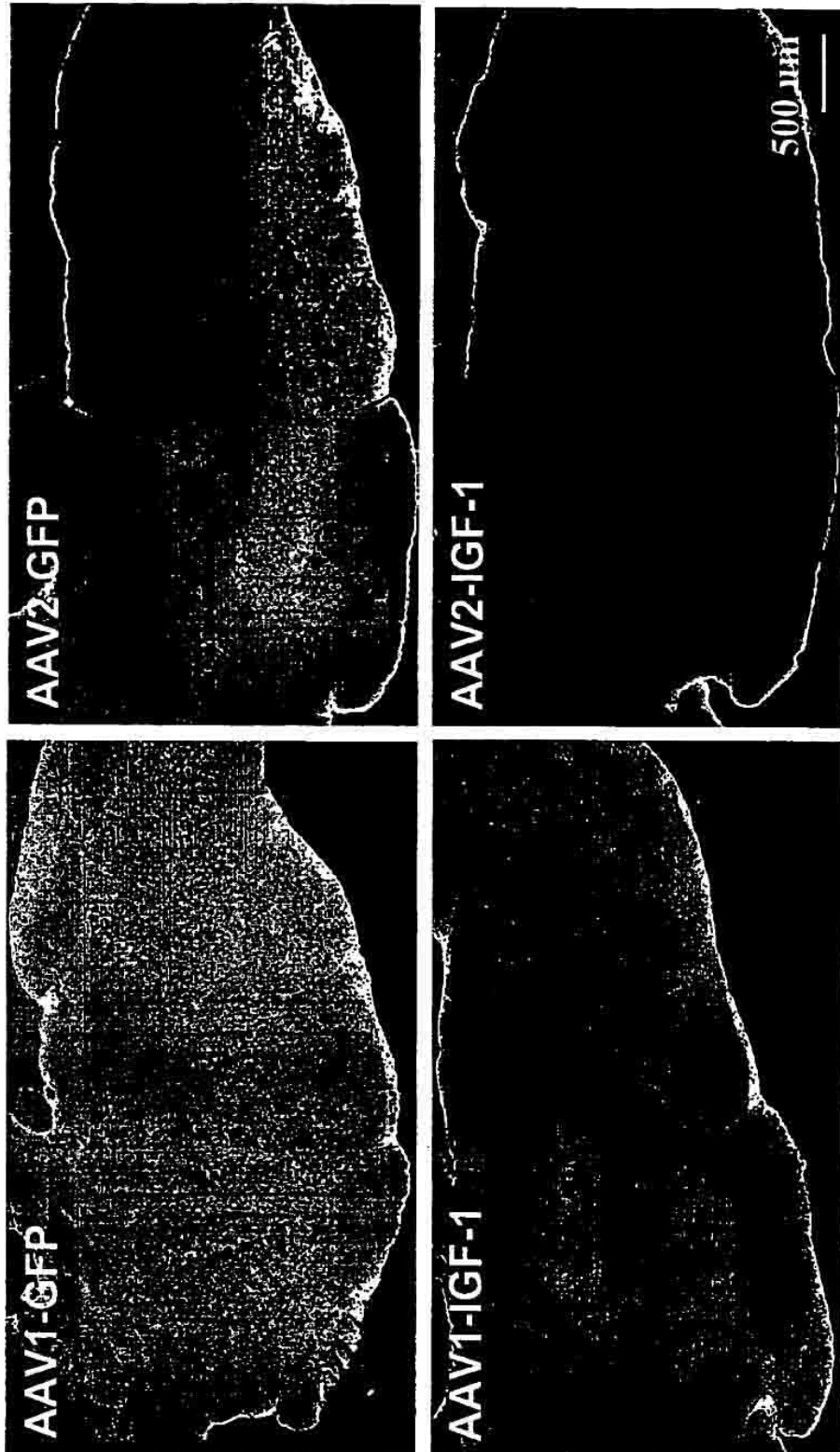


Figura 15

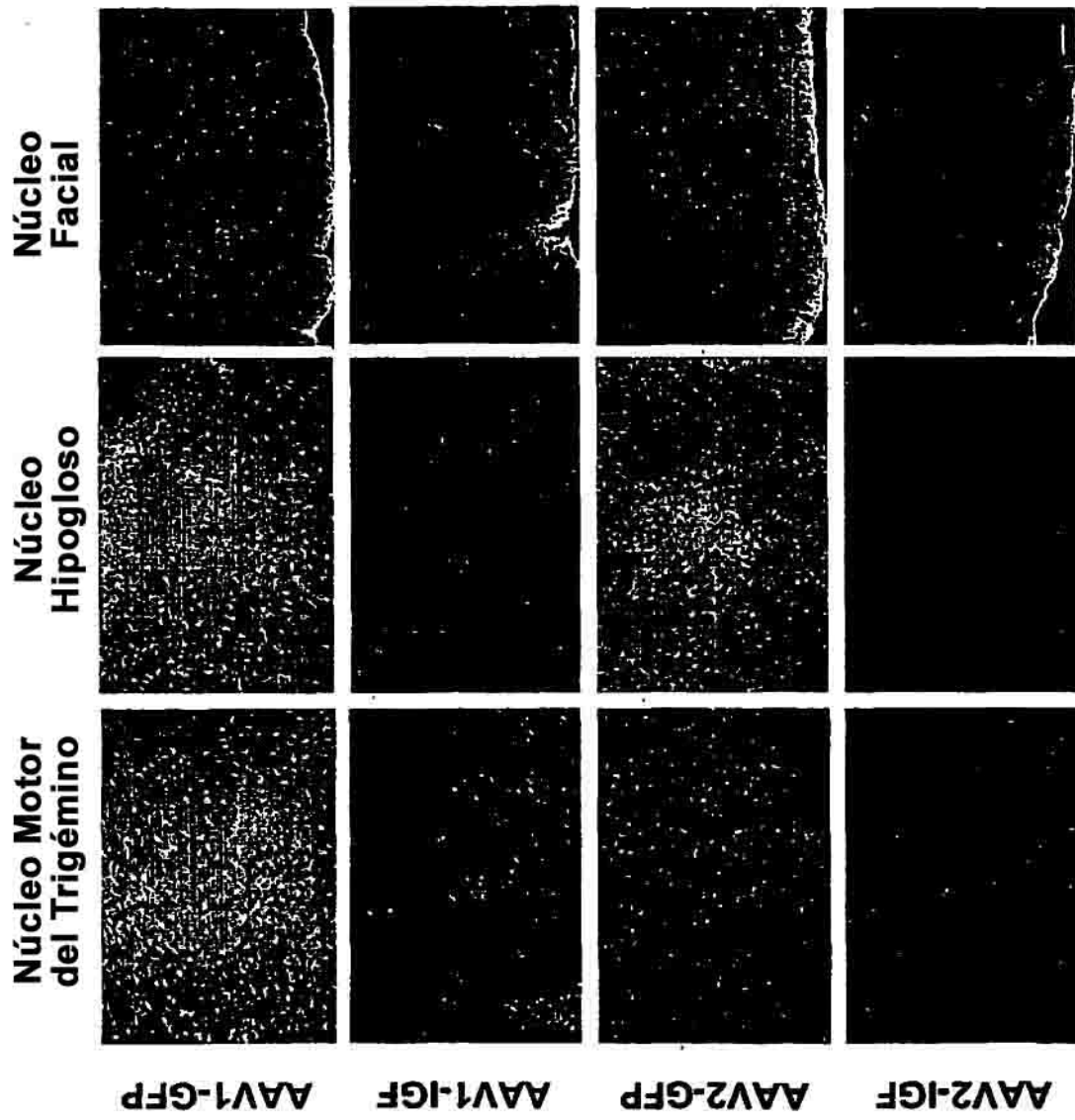


Figura 16

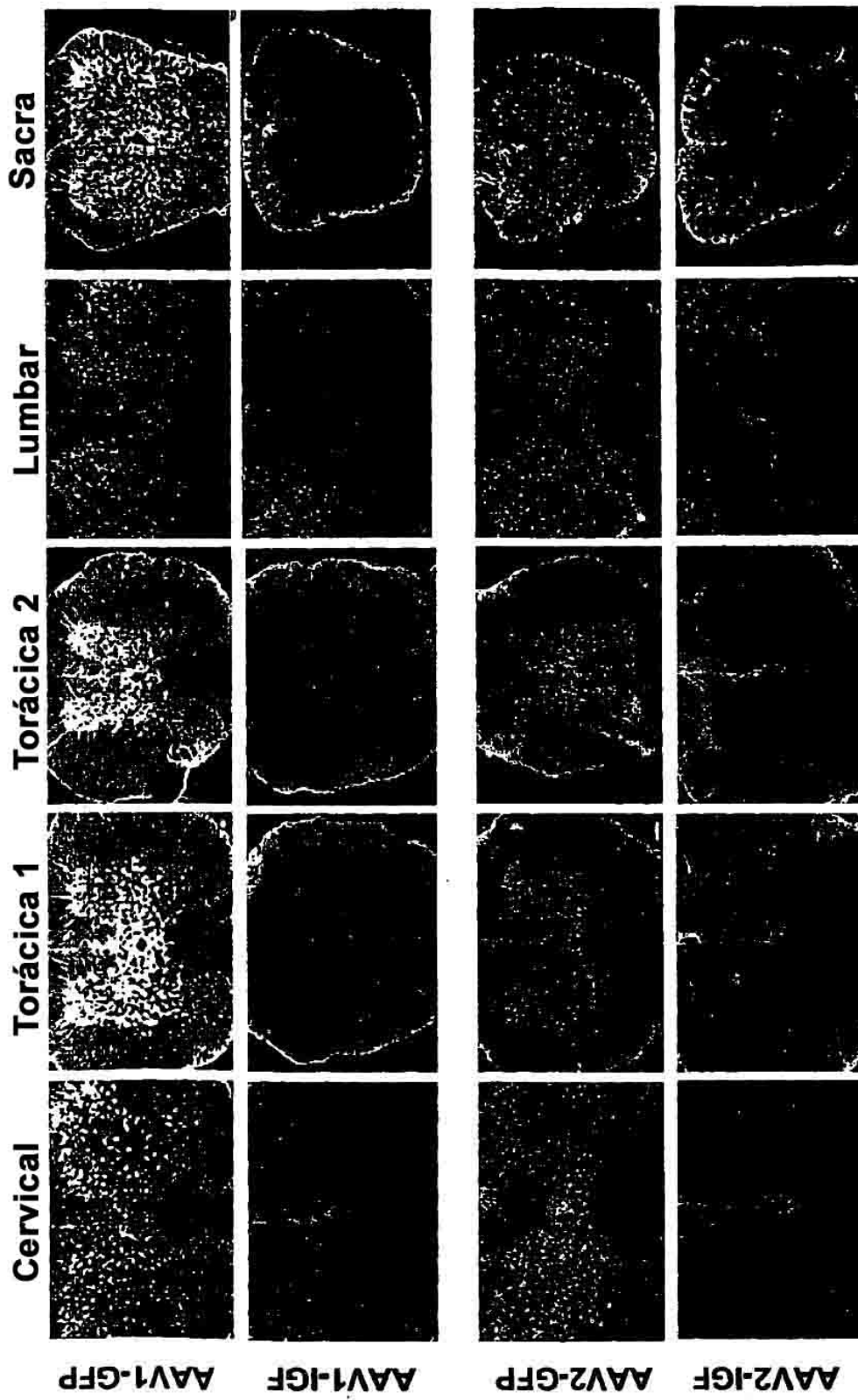


Figura 17

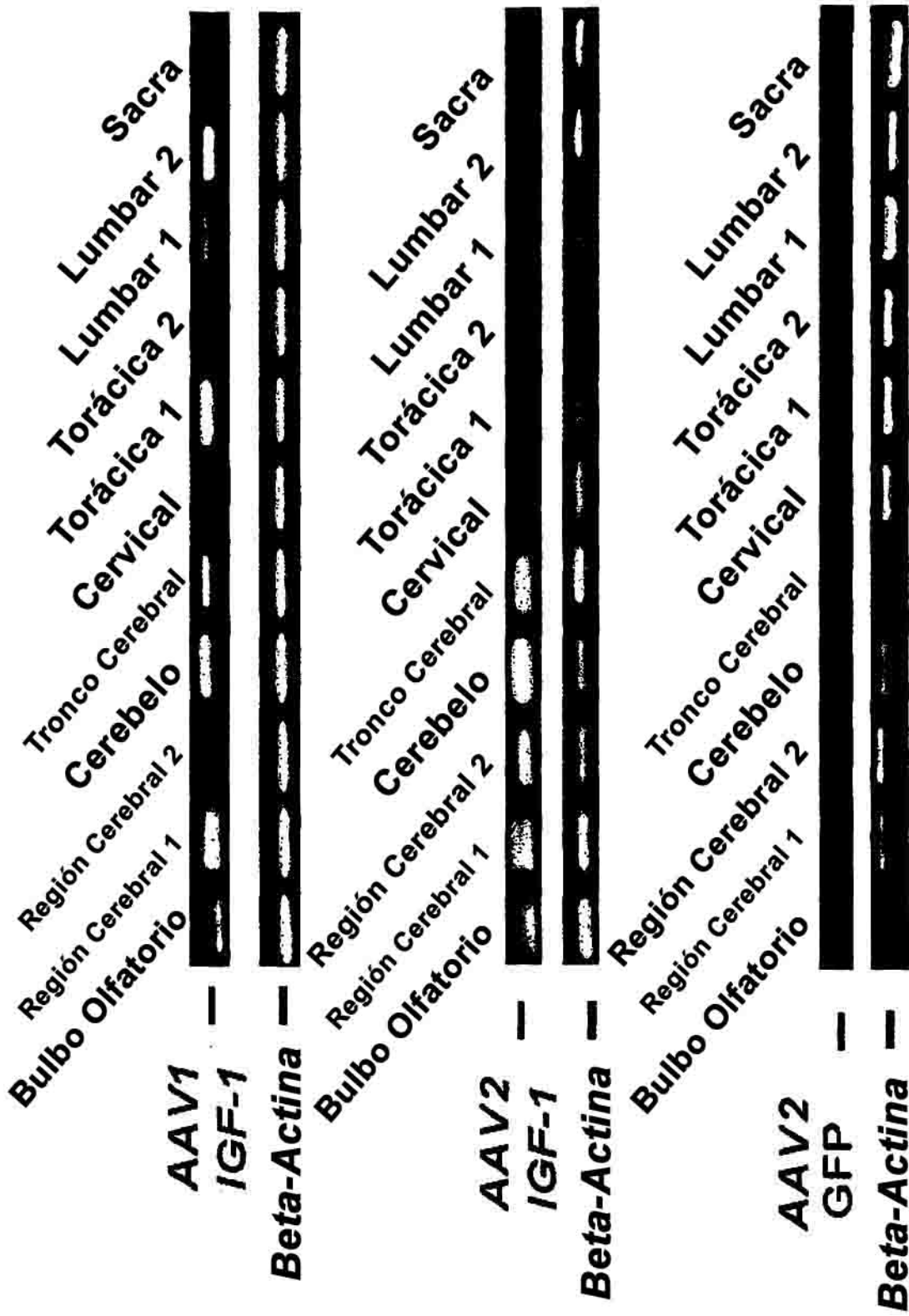


Figura 18

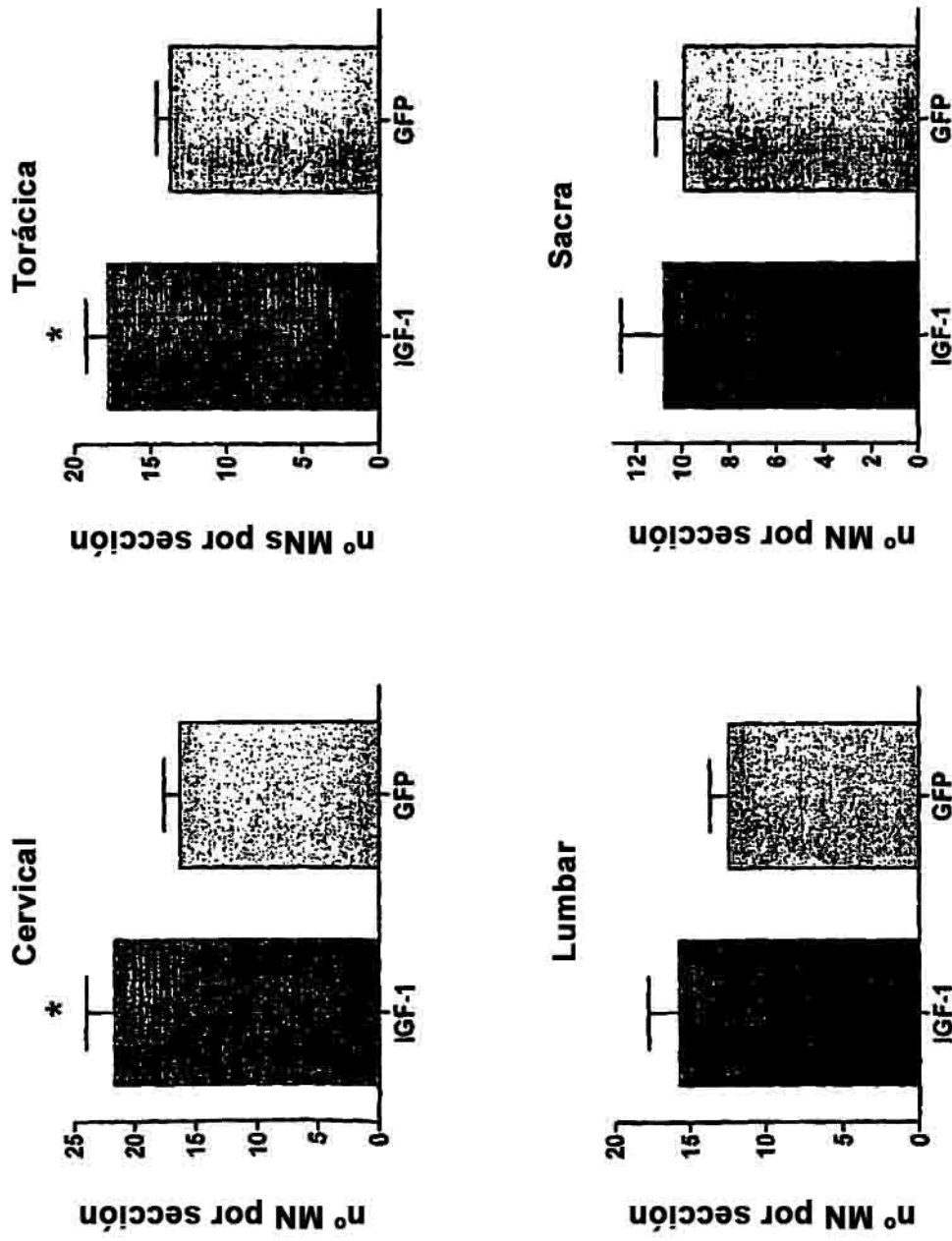


Figura 19

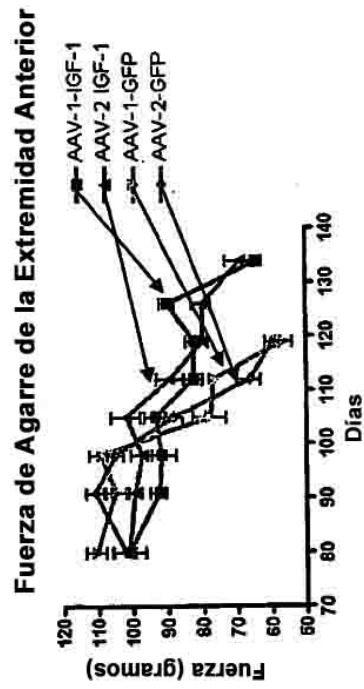
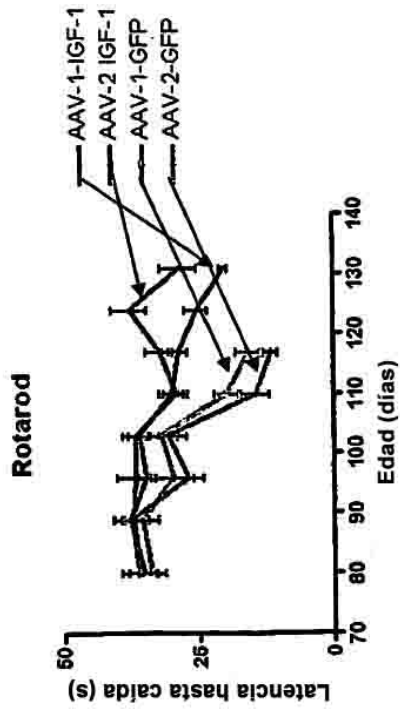
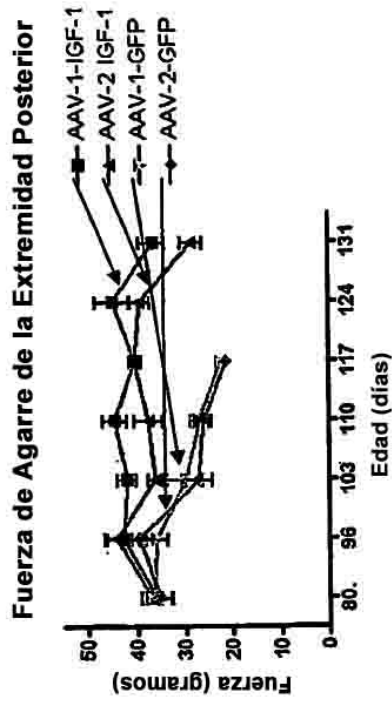
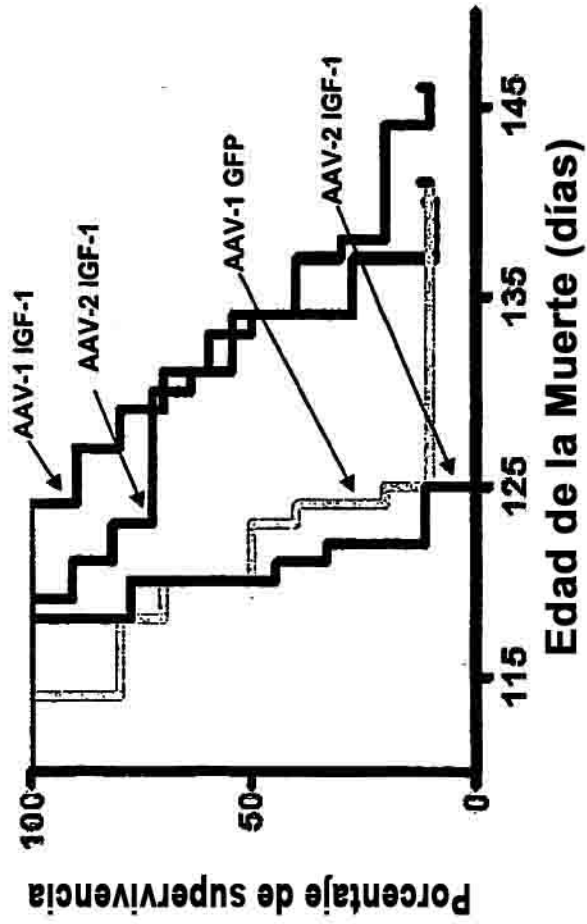


Figura 20



**Supervivencia Promedio**

**AAV1-GFP: 121 días      AAV1-IGF-1: 133,5 días**

**AAV2-GFP: 120 días      AAC2-IGF-1: 134 días**

Figura 21

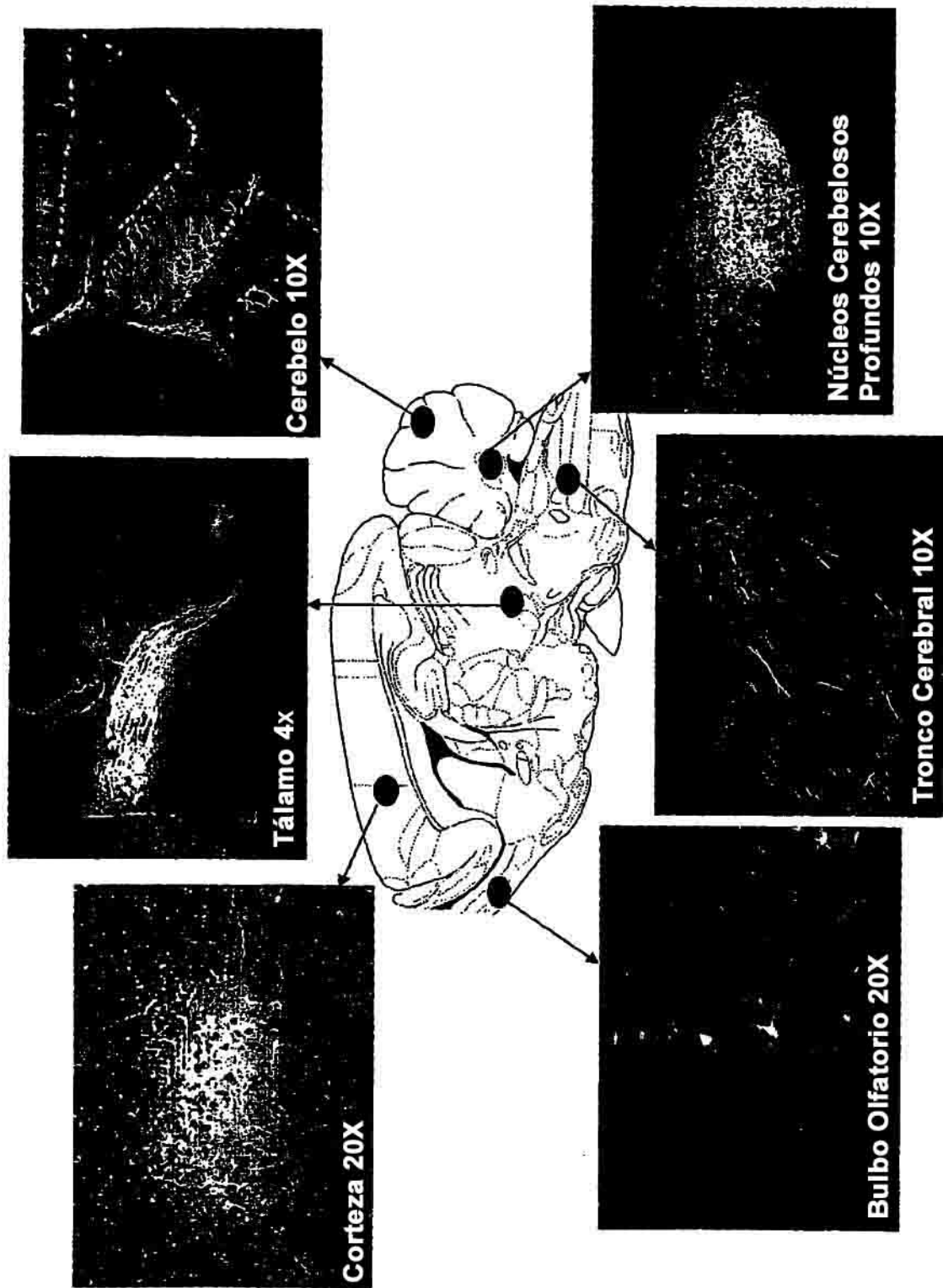


Figura 22