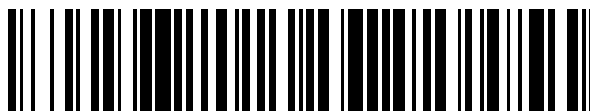


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 425**

51 Int. Cl.:

A61B 17/34 (2006.01)

A61M 25/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2005** **E 05823438 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014** **EP 1807009**

54 Título: **Cánula escalonada**

30 Prioridad:

05.10.2004 US 616238 P
04.01.2005 US 641551 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
13.03.2015

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (50.0%)
Genzyme Center 500 Kendall Street
Cambridge, MA 02142, US y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (50.0%)

72 Inventor/es:

BANKIEWICZ, KRZYSZTOF y
SOMMER, JURG M.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 531 425 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

Cánula escalonada

CAMPO TÉCNICO

5 Esta invención está en el sector de las cánulas. En particular, la invención se refiere a cánulas para el suministro de un material, por ejemplo un agente biológicamente activo, al sistema nervioso central y a sistemas que comprenden estas cánulas.

ANTECEDENTES

10 Las cánulas se pueden utilizar para suministrar materiales al sistema nervioso central (SNC) de un sujeto. Sin embargo, con los actuales diseños de cánula se debe tener cuidado para evitar el reflujo del material a lo largo del recorrido de inyección. Quereshi et al. (2000) *Neurosurgery* 46(3): 663-69. Incluso cuando se toman precauciones para minimizar el reflujo, tal como una retirada lenta de la cánula y la aplicación de presión al tejido a medida que se retira la cánula, el reflujo continúa siendo un problema.

15 Además, se puede perder una parte sustancial del material que está siendo suministrado debido a la exposición del material a la gran superficie específica de la parte interior de la cánula. En particular, la exposición a acero inoxidable puede provocar una pérdida sustancial del material a ser suministrado. Por ejemplo, diversos grupos han demostrado que se pierde una cantidad sustancial de preparaciones de vectores de adenovirus expuestas a superficies de acero inoxidable. Naimark et al. (2003) *Hum. Gene Ther.* 14:161-6; Tsui et al. (2001) *Mol. Ther.* 3:122-5; Marshall et al. (2000) *Mol. Ther.* 1(5 Pt 1): 423-9. El problema se agrava cuando se están suministrando volúmenes muy pequeños de material, debido a que cuanto menor sea el volumen, mayor será la relación de área superficial a volumen dentro de la cánula. Dado que el uso de pequeños volúmenes de material es particularmente deseable en situaciones en las que el material es caro o difícil de obtener, sería deseable disponer de dispositivos y métodos en los que se minimicen tanto el reflujo como la pérdida de material.

25 Por lo tanto, existe una necesidad de una cánula capaz de introducir materiales en el cerebro de un sujeto sin reflujo del material a lo largo del recorrido de la aguja. También existe una necesidad de diseños de cánula que reduzcan la pérdida de agentes a la o las superficies internas y, por consiguiente, puedan suministrar eficazmente pequeños volúmenes de material.

30 El documento US 2004/0092879 describe un aparato de introducción que incluye una vaina tubular y un dilatador que se extiende a través de la vaina. Una aguja está dispuesta de forma retráctil dentro del dilatador y al menos una parte de la aguja es flexible. El documento US 4978334 describe un aparato para proporcionar percutáneo o sin disección en una cavidad del cuerpo o vísceras huecas. Una aguja está fijada a una jeringa para la inserción dentro de la cavidad del cuerpo, y el funcionamiento de la jeringa confirma la ubicación adecuada de la aguja dentro de la cavidad. La aguja está fijada coaxialmente dentro de un dilatador que está coaxialmente fijado dentro de un tubo.

SUMARIO

35 La presente invención resuelve estos y otros problemas proporcionando diseños de cánula que reducen o eliminan de reflujo y/o la pérdida del material suministrado.

En un aspecto, la presente invención se refiere a cánulas para el suministro de agentes a un tejido diana en un animal. En algunas realizaciones, el tejido diana es el sistema nervioso central (*p. ej.*, el cerebro). En algunas realizaciones, el agente es un agente biológicamente activo.

40 En una realización, la cánula comprende un diseño de escalón externo en el que el diámetro de la cánula en contacto con el material a suministrar disminuye de una forma escalonada en los puntos definidos a lo largo de su longitud. Por lo tanto, en un aspecto, la invención incluye una cánula escalonada que tiene un diámetro exterior, un extremo distal, un extremo proximal y un lumen que se extiende entre los extremos proximal y distal, comprendiendo la cánula escalonada dos o más segmentos co-axialmente dispuestos, teniendo cada uno de los segmentos un diámetro exterior que define el diámetro exterior de la cánula, en donde el diámetro exterior de los segmentos es diferente.

45 En determinadas realizaciones, el diámetro exterior tiene la configuración de escalón, mientras que la superficie interior en contacto con el material no tiene la configuración de escalón.

En cualquiera de las realizaciones descritas en esta memoria, la disminución en el diámetro puede estar en una dirección de proximal a distal (es decir, el escalón en el extremo proximal de la cánula que tiene el mayor diámetro y

el escalón en el extremo distal que tiene el diámetro más pequeño). Puede haber cualquier número de escalones a lo largo del diámetro exterior, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o incluso más.

En cualquiera de las realizaciones descritas en esta memoria, el diámetro de los escalones puede aumentar en la misma cantidad escalón a escalón (es decir, la diferencia de diámetro entre escalones adyacentes es uniforme). Alternativamente, en cualquiera de las realizaciones descritas en esta memoria, la diferencia de diámetro de los escalones puede variar de un escalón a otro a lo largo de la longitud de la cánula. Además, en cualquiera de las realizaciones descritas en esta memoria, la distancia entre los escalones puede ser la misma o puede variar. En una realización, la cánula tiene la estructura y las dimensiones tal como se describen más adelante en el Ejemplo 1 y en referencia a las FIGS. 3A y/o 3B.

Las cánulas descritas en esta memoria pueden estar hechas de cualquier material, incluyendo metales, aleaciones de metales, polímeros o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, la cánula comprende un exterior de acero inoxidable con una superficie de acero no inoxidable que hace contacto con el producto a suministrar. Por ejemplo, la superficie del lumen de la cánula (que es el contacto con el material a suministrar) puede estar compuesta por un revestimiento polimérico sobre el acero inoxidable. Alternativamente, la cánula puede comprender, además, uno o más tubos que se extienden a través del lumen de la cánula, por ejemplo una tubuladura de sílice fundida encerrada en el manguito exterior de acero inoxidable de la cánula, de manera que, en uso, el producto contacta con la superficie interior de la tubuladura de sílice fundida en vez de con el acero inoxidable. Como se señaló anteriormente, la superficie en contacto con el material a ser suministrado puede o puede no tener una configuración escalonada. En aún otra realización, la cánula se construye como se muestra en las FIGS. 3A y 3B a partir de los materiales que se comentan más adelante.

En cualquiera de las cánulas descritas en esta memoria, la cánula puede comprender dos o más materiales. En determinadas realizaciones, una cánula de acero inoxidable rodea una tubuladura de sílice fundida, en la que la superficie en contacto con el material a suministrar es sílice de cuarzo. En otras realizaciones, un exterior de acero inoxidable rodea a una superficie interior de sílice fundida, en el que la superficie en contacto con el material a suministrar es sílice fundida. En una realización preferida, la cánula tiene la estructura, las dimensiones y está hecha de los materiales según se describe en Ejemplo 1 y se muestra en las FIGs. 3A y 3B.

En otro aspecto, la invención incluye un conjunto de cánula que comprende: cualquiera de las cánulas descritas en esta memoria y un depósito que comprende el uno o más materiales a ser suministrado a través de la cánula, estando el depósito operativamente conectado al lumen de la cánula. Al uno o más materiales (*p. ej.*, formulaciones potencialmente terapéuticas), también se les alude en esta memoria como "producto(s)". En determinadas realizaciones, el depósito comprende una jeringa. Además, en cualquiera de los sistemas o conjuntos descritos en esta memoria, la cánula y/o depósito puede estar operativamente unido a una o más bombas (*p. ej.*, bombas de jeringa). En determinadas realizaciones, las cánulas están unidas operativamente a la o las bombas a través de una tubuladura que se extiende a través del lumen de la cánula. En determinadas realizaciones, los sistemas descritos en esta memoria comprenden, además, un marco estereotáctico (véase, *p. ej.*, la FIG. 5).

Los materiales suministrados por estos sistemas pueden comprender uno o más agentes biológicamente activos (*p. ej.*, vectores AAV, proteínas, fármacos, etc.), colorantes, trazadores, marcadores, agentes de contraste o combinaciones de los mismos. Además de ello, los sistemas pueden ser utilizados para suministrar a cualquier parte del cuerpo, lo más preferiblemente al cerebro de un animal. En una realización, la invención proporciona una cánula que tiene un volumen de retención disminuido.

En otro aspecto, la divulgación incluye un método de suministrar uno o más materiales a una zona diana en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de colocar una cánula o un conjunto de cánula según se describe en esta memoria en la zona diana del sujeto; y suministrar el uno o más materiales a la zona diana a través de la cánula. En determinadas realizaciones, la zona diana está en el sistema nervioso central, por ejemplo, el cerebro.

Estas y otras realizaciones de la presente invención se les ocurrirán fácilmente a los expertos en la técnica en vista de la presente descripción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1** es una visión general de un sistema ilustrativo que comprende una cánula escalonada **2** según se describe en esta memoria. También se muestra una jeringa **4**, que está unida a la cánula **2** a través de una tubuladura de sílice fundida **1**, **3** en el interior de tubo **3** FEP Clase VI, y una bomba de jeringa **5**. La bomba de jeringa **5** está conectada a la tubuladura **3** a través del adaptador de compresión Luer **6**.

La **FIG. 2** es una vista lateral de otro sistema ilustrativo que comprende una cánula escalonada **10** ilustrativa tal como se describe en esta memoria. También se muestra una bomba de jeringa **16** y una jeringa **15**, que está unida a

la cánula **10** en un adaptador de compresión Luer **14** a través de una tubuladura de sílice fundida **12** que se extiende a través del lumen de una tubuladura **13** de FEP (Teflon) y la cánula **10**.

La **FIG. 3A** representa vistas laterales que muestran etapas ilustrativas implicadas en el montaje de un sub-conjunto de aguja de inyección (INSA) ilustrativo según se describe en esta memoria.

- 5 La **FIG. 3B-1 a 3B-6** son vistas laterales que representan diversas etapas implicadas en el montaje de un conjunto de aguja de inyección (INA) ilustrativo según se describe en esta memoria.

La **FIG. 4** representa una vista general de una bomba de jeringa ilustrativa Medfusion 2010i con una jeringa unida.

La **FIG. 5** es una vista general de una cánula ilustrativa según se describe en esta memoria unida a un marco estereotáctico para la administración de producto a un sujeto humano.

- 10 La **FIG. 6** es una vista general de otra cánula ilustrativa según se describe en esta memoria.

La **FIG. 7**, paneles A-D, representan resultados de la tinción inmunohistoquímica para L-aminoácido descarboxilasa aromática (AADC) en secciones de cerebro montado entero de monos utilizados en los experimentos descritos en el Ejemplo 2. Los cerebros se muestran en la sección coronal a través del sitio de infusión a las 5,5 semanas después de la infusión. Los paneles A, B, C y D representan los cuatro cerebros de monos diferentes analizados en el Ejemplo 2 [MR15102M (A), MR15109M (B), R23700M (C) y R211101M (D)]. Todos los hemisferios izquierdos recibieron infusión en rampa y todos los hemisferios derechos recibieron infusión no en rampa. La flecha negra indica la región del putamen.

La **FIG. 8**, paneles A y B, representan imágenes de gran aumento de la tinción inmunohistoquímica para AADC en el putamen del cerebro de un mono utilizado en los experimentos descritos en el Ejemplo 2 a las 5,5 semanas después de la infusión. En la FIG 8A se muestra una sección representativa del hemisferio que recibió una infusión en rampa y en la FIG. 8B se muestra una del hemisferio que recibió una infusión no en rampa. La barra de escala representa 100 μ m.

La **FIG. 9**, paneles A y B, representan secciones teñidas con hematoxilina y eosina (H y E) dentro del putamen de un animal representativo utilizado en los experimentos del Ejemplo 2, R211101M, con un aumento de 5X. El animal R211101M recibió una CED bilateral de AAV-hAADC-2 utilizando el proceso de infusión no en rampa en el hemisferio derecho (Fig. 9A) y el proceso de infusión en rampa en el hemisferio izquierdo (Fig. 9B). Las imágenes ilustran el área adyacente al recorrido de la cánula, y se tomaron al nivel del putamen medio-caudal. La barra de escala representa 400 μ m.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

30 La presente invención se refiere a nuevas cánulas para el suministro de materiales (p. ej., formulaciones que comprenden agentes potencialmente terapéuticos) a un tejido diana de un animal tal como el cerebro. Las cánulas descritas en esta memoria reducen en gran medida o eliminan el reflujo durante suministro de los materiales. A estos materiales se les alude en esta memoria generalmente como "producto". Más específicamente, la presente invención permite el suministro de producto a ubicaciones bien definidas dentro del cerebro de un sujeto con reflujo mínimo de producto a lo largo del recorrido de la aguja, con un volumen mínimo de retención y con mínimas pérdidas de producto a las superficies internas de la cánula.

En una realización de la presente invención, la cánula tiene un diseño en escalones, en la que el diámetro de la cánula disminuye de forma gradual en puntos definidos a lo largo de su longitud (desde la región proximal a la distal). Por lo tanto, en realizaciones preferidas, el diámetro más pequeño de la cánula se encuentra en la parte más distal de la cánula. Como se señaló anteriormente, este diseño en escalones reduce el reflujo de producto a lo largo del recorrido de la aguja. En una realización, la superficie exterior de la cánula comprende cinco segmentos que difieren en su diámetro exterior, formando cuatro escalones, y en otra realización tiene la estructura y las dimensiones que se comentan más adelante. La superficie de la cánula puede ser suave, como en la realización ilustrada en las FIGS 3A y 3B.

45 La FIG. 1 muestra una visión general de un sistema ilustrativo que comprende una cánula escalonada **2** con un exterior de acero inoxidable. Una tubuladura **1, 3** de sílice fundida se extiende a través del lumen de la cánula **2** y une la cánula **2** a la jeringa **4** a través del cubo y/o aguja roma **6** en la jeringa **4**. La jeringa **4** también está fijada a la bomba de jeringa **5** computarizada. La cánula incluye medios para reducir o eliminar el reflujo del material a ser suministrado, por ejemplo, tubuladura (p. ej., sílice fundida) que se extiende a través del lumen de la cánula escalonada y está en contacto con el material a ser suministrado.

La realización ilustrativa representada en la FIG. 1 muestra una cánula **2** que tiene un total de cuatro "escalones". Resultará evidente que los escalones más cercanos al extremo distal de la cánula son aquellos que penetran primero en el tejido diana, y, por consiguiente, el número de escalones que penetran en el tejido diana (p. ej., cerebro) dependerá de la profundidad de penetración necesaria para alcanzar ese objetivo en el sujeto animal. Con respecto al suministro al cerebro, el operario puede determinar fácilmente la profundidad apropiada de penetración, teniendo en cuenta tanto el tamaño del animal que esté siendo tratado como la ubicación dentro del cerebro a la que fije como objetivo.

Tal como se muestra en la FIG. 1, el diámetro exterior de la cánula **2** disminuye en cada escalón a lo largo de la longitud de la cánula, en una dirección de proximal a distal. Tal como se utiliza en esta memoria, proximal se refiere a puntos cercanos a la jeringa **4** desde los cuales se dispensa producto, y distal se refiere a puntos cercanos al punto de suministro final del producto (p. ej., el tejido diana).

La FIG. 1 representa una realización ilustrativa en la que los dos segmentos más proximales, que bordean el escalón más proximal, tienen aproximadamente la misma longitud, mientras que los cuatro segmentos más distales son de longitudes variables entre sí y de los dos segmentos más proximales. Por lo tanto, resultará evidente que algunos, todos o ninguno de los segmentos entre los escalones pueden tener la misma longitud que los otros segmentos.

Ejemplos no limitantes de materiales que se pueden utilizar para los diversos componentes de la cánula y/o sistemas que comprenden la cánula se muestran en la siguiente tabla:

Componente (en referencia a FIG. 1)	Parte	Fuente	Composición	Contacto con Producto
Tubuladura 1 en el extremo distal de la cánula	Tubuladura de sílice fundida en la punta	Polymicro	Sílice de cuarzo y revestimiento de poliimida	Sí; sólo la parte de sílice
Cánula 2	Tubuladura de acero de 23G a 15G	Ranfac	Acero inoxidable	No
Tubuladura 3* que conecta la cánula 2 a la jeringa 4	Tubuladura de sílice fundida	Polymicro	Sílice de cuarzo y revestimiento de poliimida	Sí; sólo la parte de sílice
Jeringa 4	Jeringa	BD	Polipropileno de Clase VII de USP	Sí
Bomba 5	Bomba	Medfusion	Múltiples materiales	No
Junta Luer 6	Aguja con cubo/roma Luer (aguja de 23 G x 1½)	BD	(Polipropileno de Clase VII de USP) e inoxidable	Sí
Juntas**	Juntas de cola	Locktight	Cianoacrilato	Sí

* Tubuladura de Clase VI de FEP con sílice fundida en interior. La tubuladura de FEP no tiene contacto con el producto

** entre **1** y **2**; entre **2** y **3**; entre **3** y **6**

La FIG 2 muestra una visión general de un sistema ilustrativo similar al mostrado en la FIG. 1. La realización mostrada en la FIG. 2 comprende una cánula escalonada **10** de acero inoxidable con una tubuladura **12** de sílice fundida que atraviesa el lumen de la cánula de acero inoxidable y que se extiende más allá del extremo distal de la cánula **10**. También se muestra en la FIG 2 una tubuladura (FEP) **13** que cubre la tubuladura **12** de sílice fundida, así como un adaptador de compresión Luer **14** de acero inoxidable y de 25 mm (1 pulgada) (23 ga) entre la tubuladura **12** de sílice fundida y la tubuladura de FEP **13**. El adaptador de compresión Luer **14** está conectado a una jeringa **15**, que a su vez está conectada a una bomba **16**.

Materiales ilustrativos y fuentes comerciales ilustrativas de estos materiales que se pueden utilizar en la fabricación de una realización tal como la mostrada en la FIG. 2 se recogen en la siguiente tabla:

Componente (nº de referencia en FIG. 2)	Fuente Comercial Ilustrativa	Composición	Contacto con Producto
Cánula 10	Ranfac	304 SS	No
Tubuladura 12 de sílice fundida	Polymicro Technologies	Sílice fundida con revestimiento de poliimida en el exterior	Sí
Tubuladura 13 de Teflon	Western Analytical Products	Teflon® (FEP)	No
Adaptador Luer 14	Upchurch Scientific	Polipropileno con ETFE	Sí
Jeringa 15	BD	Polipropileno	Sí
Bomba 16	Medfusion	N.D.	No

5 Como se muestra, en determinadas realizaciones, la tubuladura se extiende a través del lumen de la cánula y el o los productos a suministrar son suministrados a través de esta tubuladura. En realizaciones que contienen la tubuladura, la tubuladura puede estar al ras con el extremo distal de la cánula. Alternativamente, en realizaciones preferidas, la tubuladura se extiende desde el extremo distal de la cánula. En tales realizaciones, la magnitud a la que el tubo se extiende puede variar dependiendo de la aplicación. Generalmente, la tubuladura se extenderá desde aproximadamente 1 mm a aproximadamente 1 cm de la cánula (o cualquier longitud intermedia), más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mm (o cualquier longitud intermedia), y aún más preferiblemente de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 25 mm (o cualquier longitud intermedia, que incluye, pero no se limita a 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 10 mm, 11 mm, 12 mm, 13 mm, 14 mm, 15 mm, 16 mm, 17 mm, 18 mm, 19 mm, 20 mm, 21 mm, 22 mm, 23 mm, 24 mm o 25 mm). En una realización preferida, la tubuladura se extiende aproximadamente 10 mm más allá del extremo distal de la misma.

15 Como se muestra en las Figuras, la tubuladura que se extiende a través de la cánula puede tener uno o más revestimientos o materiales circundantes en una o más regiones, por ejemplo para proteger a la tubuladura en contacto con el producto a suministrar. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la tubuladura (p. ej., tubuladura de FEP (Teflon)) protege la porción de la tubuladura de sílice fundida que se extiende más allá del extremo proximal de la cánula de acero inoxidable. La tubuladura de sílice fundida puede estar conectada a la jeringa por cualquier medio adecuado, que incluye, pero no se limita a un adaptador de compresión Luer, y la jeringa es impulsada por una bomba de jeringa (manual, electrónica y/o computarizada). Resultará evidente que el tamaño de la jeringa puede ser seleccionado por el operario para suministrar la cantidad apropiada de producto o productos. Por lo tanto, se pueden utilizar jeringas de 1 mL, 2,5 mL, 5 mL, o incluso mayores.

25 En determinadas realizaciones, el adaptador de compresión Luer comprende un espaciador 23G de acero inoxidable de 25 mm (1 pulgada) entre la tubuladura de sílice fundida (interior) y la tubuladura de FEP (exterior). El espaciador opcional proporciona una rigidez mecánica al adaptador de compresión Luer y ayuda a sellar el hueco entre las tubuladuras interior y exterior cuando el casquillo está firmemente pegado utilizando adhesivo Loctite®. Este hueco debe ser llenado para evitar que el producto penetre en el espacio entre las tubuladuras interior y exterior a medida que se está administrando a un sujeto. Preferiblemente, el extremo proximal del espaciador representa la única superficie de contacto de acero inoxidable con el producto de los sistemas y cánulas descritos en esta memoria.

30 Esta superficie de contacto mínima de acero inoxidable con el producto puede ser eliminada, si se desea, mediante la aplicación de adhesivo Loctite® u otro revestimiento para cubrir el extremo expuesto de otra forma del espaciador, para proporcionar un sistema con absolutamente ningún contacto de acero inoxidable con el producto. Alternativamente, el espaciador puede estar formado por un material diferente.

35 La FIG. 3A representa etapas ilustrativas seleccionadas en la fabricación de una cánula escalonada según se describe en esta memoria. Véase, *también*, el Ejemplo 1. En particular, la cánula de diseño en escalones, que reduce el reflujo, puede ser ensamblada en el orden indicado por las flechas (de arriba a abajo), a saber, mediante la adición de componentes (**20, 22, 24, 26, 28, 30**) de diámetros crecientes. Por lo tanto, tal como se describe en el Ejemplo 1, segmentos de longitud variable se unen entre sí para formar el diseño en escalones.

40 Cuando la cánula está hecha de dos o más partes, las juntas no deben permitir que exista una fuga de los materiales de la cánula en el tejido diana, o viceversa (del tejido diana a la cánula). Por consiguiente, las juntas están preferiblemente selladas. Las juntas pueden ser sellados de una diversidad de maneras, que incluyen, pero no se limitan a soldadura (p. ej., soldadura por láser), adhesivos, selladores, calentamiento (p. ej., para polímeros termoplásticos) y combinaciones de los mismos. Resultará evidente que la naturaleza del sellado dependerá del material utilizado para hacer la cánula, por ejemplo la soldadura se puede utilizar para cánulas de acero inoxidable, mientras que el calentamiento se puede utilizar para polímeros termoplásticos.

Una cánula en escalones, según se describe en esta memoria, también se puede formar de una sola pieza integral, por ejemplo mediante moldeo por inyección de una cánula escalonada según se describe en esta memoria.

Las FIGs. 3B1-6 representan el montaje de una cánula escalonada ilustrativa según se describe en esta memoria. Como se ha descrito en el Ejemplo 1, la cánula escalonada **35**, mostrada en la FIG. 3A se prepara retirando el protector **32** de la aguja e insertando un componente **40** de la tubuladura interior a través de la cánula **35** hasta que se extienda desde los extremos de la cánula. (FIG. 3B-1). Para el componente **40** de la tubuladura interior se puede utilizar cualquier material, que incluye pero no se limita a una tubuladura de sílice fundida.

Como una alternativa a la tubuladura, resultará evidente que el interior de la cánula de acero **35** puede ser revestido con uno o más materiales que entran en contacto con el producto a suministrar, reduciendo así la pérdida del producto a la cánula de acero durante el suministro. Se conocen y se pueden utilizar diversas técnicas de revestimiento de materiales de acero inoxidable.

Opcionalmente, el adhesivo puede ser colocado en la tubuladura **40** de tal manera que la tubuladura se asegura a la aguja. Se puede utilizar cualquier adhesivo adecuado, por ejemplo, el adhesivo Loctite®. Preferiblemente, la resistencia de la unión del adhesivo es al menos aproximadamente 18 N (4 libras), más preferiblemente al menos aproximadamente 22 N (5 libras).

En la realización mostrada en la FIG. 3B, el protector **32** de la aguja puede ser reemplazado y un tramo previamente cortado de tubuladura **31** (p. ej., tubuladura de FEP) se puede extender sobre la tubuladura **40** de sílice fundida a través de la cánula **35** (Fig. 3B-2). La longitud de la tubuladura **31** exterior se puede determinar por la indicación y puede variar desde 25 cm a 4,6 m (10 pulgadas a 5 yardas) de longitud (o cualquier valor intermedio). Así, en determinadas realizaciones, la tubuladura exterior cubre la longitud completa de la tubuladura interior y se puede extender sobre la tubuladura interior. Alternativamente, en otras realizaciones, la tubuladura **31** exterior no se extiende completamente sobre la longitud de la tubuladura **40** interior (Fig. 3B-2). Se puede utilizar cualquier adhesivo adecuado para asegurar la tubuladura **31** exterior al conjunto, por ejemplo en los extremos de la tubuladura **31** exterior. La fuerza de unión del adhesivo es preferiblemente al menos aproximadamente 22 N (5 libras).

Tal como se muestra en la FIG. 3B-3, uno o más componentes espaciadores **47** se pueden insertar sobre la tubuladura interior y/o exterior **40**, **31**. El espaciador **47** puede estar hecho de cualquier material, incluidos metales, aleaciones de metales, polímeros y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, el espaciador **47** comprende acero inoxidable. El espaciador **47** puede ser de cualquier longitud, aunque es preferible que no se extienda sobre la aguja. Opcionalmente, puede incluirse un componente para ayudar a sellar los componentes del conjunto, por ejemplo un tramo de tubuladura retráctil de PVC **49**. Véase el Ejemplo 1 para las dimensiones ilustrativas de espacio y componentes de tubuladuras de PVC.

Posteriormente, el conjunto puede ser equipado con uno o más componentes que le permiten ser convenientemente unido a un depósito de suministro de producto. Por ejemplo, tal como se muestra en la FIG. 3B-4, un adaptador de compresión Luer hembra **50** de tamaño apropiado se desliza sobre un tramo de la tubuladura **31** exterior y un casquillo **51** se coloca sobre la tubuladura **31** exterior, preferiblemente de tal manera que quede al ras con el extremo de la tubuladura **31** exterior. Opcionalmente se puede aplicar adhesivo a uno o más de los componentes (p. ej., fuera del extremo de la tubuladura exterior antes del ajuste del casquillo en el extremo y/o para sellar las juntas entre la tubuladura interior, el espaciador, la tubuladura exterior y el casquillo).

Se puede eliminar el tramo de la tubuladura **40** interior que se extiende desde el casquillo **51**, por ejemplo al marcar la tubuladura y romperla o cortarla y el casquillo **51** montado en el interior del adaptador de compresión Luer **50** (Fig. 3B-5). La tubuladura de contracción **49** se puede calentar para sellar la junta. Finalmente, un adaptador de compresión Luer macho **55** se puede montar y ajustar sobre el adaptador de compresión Luer hembra **50** y el casquillo **51**.

Como se señaló anteriormente, las cánulas escalonadas descritas en esta memoria pueden hacerse de la diversidad de materiales que son fisiológicamente aceptables, que incluyen, pero no se limitan a metales, aleaciones de metales, polímeros, fibras orgánicas, fibras inorgánicas y/o combinaciones de los mismos. En realizaciones preferidas, la cánula comprende acero inoxidable (p. ej., 316SS o 304SS).

Opcionalmente, una superficie de contacto con el producto (p. ej., tubuladura o revestimiento) puede extenderse a través del lumen de la cánula. También se puede utilizar una diversidad de materiales para la superficie de contacto con el producto opcional, que incluyen, pero no se limitan a metales, aleaciones de metales, polímeros, fibras orgánicas, fibras inorgánicas y/o combinaciones de los mismos. Preferiblemente, la superficie de contacto con el producto no es de acero inoxidable. En este tipo de realizaciones, la cánula externa debe aún estar hecha de un material fisiológicamente compatible con el tejido diana, pero ya que no hay contacto con el producto, no tiene que ser compatible con el agente biológicamente activo o la formulación de producto. De manera similar, en realizaciones de este tipo, la tubuladura de FEP (Teflon) mostrada en las Figuras puede ser reemplazada por otra tubuladura, independientemente de que el material de la tubuladura sea compatible con la formulación de agente o producto biológicamente activo.

Por lo tanto, en una realización, la superficie de contacto con el producto de la cánula comprende o consiste en sílice fundida (p. ej., sílice de cuarzo y revestimiento de poliimida) (Polymicro, Phoenix, Arizona). El uso de sílice fundida para las superficies de contacto del producto reduce en gran medida las pérdidas de producto en comparación con las cánulas de la técnica anterior, en los que el producto está expuesto al acero inoxidable. De hecho, mientras que sólo el $59 \pm 14\%$ de un vector de virus adeno-asociado se recuperó de un dispositivo de inyección de la técnica anterior que había sido pre-lavado con el producto, $101 \pm 6\%$ se recuperó a partir de un dispositivo que comprende una cánula de la presente invención, incluso sin pre-lavado. Véase, el Ejemplo 2.

Un experto en la técnica se daría cuenta de que en las cánulas de la presente invención se pueden utilizar materiales que no sean de sílice fundida, siempre que tales materiales tengan la propiedad de bajas pérdidas del agente biológicamente activo en cuestión relacionadas con la superficie. En lugar de la tubuladura de sílice fundida se puede utilizar la tubuladura hecha de otros materiales o, alternativamente, el lumen de la cánula puede estar revestido con una sustancia para lograr sustancialmente el mismo resultado. El material óptimo a utilizar puede variar dependiendo de la naturaleza del agente biológicamente activo, y se puede determinar mediante experimentación.

Sería de esperar que el uso de tubuladuras con un diámetro interior (ID) pequeño tal como una tubuladura de sílice fundida con un ID de $100 \mu\text{m}$, redujera en lugar de aumentara la recuperación de la muestra debido a la relación incrementada de superficie a volumen. Quizás sorprendentemente, el uso de una tubuladura de sílice fundida de ID pequeño no provoca grandes pérdidas de los productos suministrados, por ejemplo, vectores AAV. Sin pretender estar limitados por la teoría, el resultado puede ser explicado por el caudal lineal incrementado que resulta cuando un caudal de suministro dada (volumen de producto suministrado por unidad de tiempo) se mantiene constante utilizando tubuladuras de ID más pequeño. Además, AAV parece tener poca afinidad por la superficie de la tubuladura de sílice fundida, lo cual puede explicar las bajas pérdidas.

La tubuladura de sílice fundida de pequeño ID utilizada en el Ejemplo 1 tiene la ventaja adicional de reducir el volumen de retención del sistema. Por ejemplo, un segmento de cuatro pies de largo de tubuladura de sílice fundida con un ID de $100 \mu\text{m}$ tiene un volumen del lumen inferior a $15 \mu\text{l}$. Volúmenes bajos de este tipo reducen el consumo de la muestra y reducen significativamente los residuos de la muestra debido al volumen de retención del sistema de suministro. Un desecho reducido de producto es particularmente valioso cuando el agente biológicamente activo es difícil y/o costoso de obtener, por ejemplo, muchas proteínas recombinantes o vectores de terapia génica.

La FIG. 4 representa una vista general de una bomba de jeringa ilustrativa que se puede utilizar en combinación con cánulas según se describe en esta memoria. Se muestran en la FIG. 4 la montura **60** de la jeringa, la abrazadera **62** de la jeringa, la muesca **64** de abrazadera de la jeringa (retén), la palanca de agarre **66**, el accionador **68** de la jeringa, el retenedor **70** del émbolo de la jeringa, la pantalla de cristal líquido **72** y el encendido/apagado **74**. Bombas de jeringa útiles en sistemas con las cánulas descritas en esta memoria están disponibles comercialmente, por ejemplo bajo el nombre Medfusion 2010i (Medex, Inc., Carlsbad, California).

La FIG. 5 representa una visión general de un sistema que incluye una cánula **70** según se ha descrito en esta memoria unida a un marco estereotáctico **72**. La cánula **70** también puede estar unida a una bomba de jeringa, por ejemplo a través de la tubuladura **74**. Marcos estereotácticos están disponibles comercialmente, por ejemplo los marcos estereotácticos Lexell (Ranfac Corp., Avon, Mass.).

En cualquiera de los sistemas descritos en esta memoria, la parte de contacto con el producto puede comprender sílice de cuarzo (tubuladura de sílice fundida en la cánula), polipropileno clase VII de USP (jeringa y cubos Luer), cianoacrilato (juntas encoladas) y acero inoxidable (espaciador 23G).

Típicamente, los sistemas descritos en esta memoria son capaces de suministrar el producto al cerebro con una exposición mucho menor al acero inoxidable que cuando se utilizan sistemas previamente descritos, en los que el producto está en contacto con el acero inoxidable a lo largo de algo o de toda la longitud de la cánula. Una exposición reducida del producto al acero inoxidable, según se proporciona en los dispositivos y sistemas de la presente invención, reduce pérdidas. Por ejemplo, la cánula ilustrada en la FIG. 3B-6, según se configura en el sistema ilustrado en la FIG. 1, tiene superficies de contacto con el producto que comprenden tubuladura de sílice fundida casi exclusivamente y una jeringa de polipropileno clase VII de USP. La única otra superficie de contacto es la junta de cola entre el extremo proximal de la tubuladura de sílice fundida y el cubo Luer de la jeringa, ubicación en la que el adhesivo de cianoacrilato contacta con el producto y la superficie en sección transversal del extremo proximal del separador de acero inoxidable. La exposición al acero en este sistema es mínima.

Las cánulas de la presente invención también pueden combinar el diseño en escalones y las superficies internas de contacto del producto con la sílice fundida para proporcionar una cánula mejorada con reflujo reducido, pérdidas reducidas de agente relacionadas con la superficie y volumen de retención reducido.

Las cánulas de la presente invención se pueden esterilizar utilizando técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, óxido de etileno estándar. Cánulas esterilizadas pueden estar opcionalmente empaquetadas individualmente en una bolsa de Tyvek®.

Agentes que pueden ser suministrados utilizando una cánula de la presente invención incluyen cualquier material que puede tener un efecto deseado en el tejido diana. Por ejemplo, los fármacos terapéuticos, proteínas, plásmidos o vectores de terapia génica pueden suministrarse al cerebro de un sujeto. También se pueden añadir agentes no terapéuticos tales como colorantes, trazadores, agentes de contraste y marcadores para fines de formación de imágenes, de diagnóstico o de investigación.

Por ejemplo, se han descrito sistemas de terapia génica retroviral. Véase, p. ej., la Patente de EE.UU. N° 5.219.740; Miller y Rosman, *BioTechniques* (1989) 7: 980-990; Miller, A.D., *Human Gene Therapy* (1990) 1: 5-14; Scarpa et al, *Virology* (1991) 180: 849-852; Burns et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90: 8033 - 8037; y Boris-Lawrie y Temin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* (1993) 3: 102-109. También se ha descrito un cierto número de vectores de adenovirus. Véase, p. ej., Patentes de EE.UU. N°s. 6.048.551, 6.306.652, Parks, R.J., *Clin. Genet.* (2000) 58: 1-11; Tsai et al., *Curr. Opin. Mol. Ther.* (2000) 2: 515-523.

Adicionalmente, diversos sistemas de vectores de virus adeno-asociado (AAV) se han desarrollado para el suministro de genes. Los vectores AAV pueden construirse fácilmente utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Véase, p. ej., las patentes de EE.UU. N°s 5.173.414 y 5.139.941; Publicaciones Internacionales N°s. WO 92/01070 (publicada el 23 de enero de 1992) y WO 93/03769 (publicada el 4 de marzo de 1993); Lebkowski et al., *Molec. Cell. Biol.* (1988) 8: 3988 - 3996; Vincent et al, *Vaccines* 90 (1990) (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B.J. *Current Opinion in Biotechnology* (1992) 3: 533-539; Muzyczka, N. *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* (1992) 158: 97-129; Kotin, R.M. *Human Gene Therapy* (1994) 5: 793-801; Shelling y Smith, *Gene Therapy* (1994) 1: 165-169; y Zhou et al., *J. Exp. Med.* (1994) 179: 1867-1875.

Las cánulas de la presente invención se pueden utilizar como parte de un sistema de suministro potenciado por convección (CED) para la administración al SNC. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 6.309.634 describe métodos de terapia génica en los que los agentes son suministrados a regiones del sistema nervioso central por CED. Utilizando el CED, vectores recombinantes se pueden suministrar a muchas células en grandes zonas del SNC. Además, los vectores suministrados expresan de manera eficiente transgenes en las células del SNC (p. ej., células gliales). Las cánulas de la presente invención se pueden utilizar con cualquier dispositivo de suministro potenciado por convección para el suministro de vectores recombinantes. En una realización, el dispositivo es una bomba osmótica o una bomba de infusión. Tanto las bombas osmóticas como las de infusión están disponibles comercialmente de una diversidad de proveedores, por ejemplo Alzet Corporation (Cupertino, California), Hamilton Corporation, o Alza, Inc. (Palo Alto, California).

Las cánulas de la presente invención también se pueden utilizar para la inyección directa u otros métodos de infusión, en lugar de CED.

El producto puede ser suministrado a un tejido diana en una diversidad de caudales, que incluyen pero no se limitan a 0,2, 0,5, 0,7, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 5,0, 10, 15 ó 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Con referencia a las realizaciones ilustradas en las FIGs 1A y 2A, caudales por encima de 10-20 $\mu\text{l}/\text{min}$ son difíciles de lograr utilizando una tubuladura de cuatro pies de sílice fundida con un ID de 100 μm debido a la excesiva contrapresión a caudales altos de este tipo. Esto no representa una limitación seria para los métodos de suministro por convección mejorados, pero se realizan preferiblemente a caudales relativamente bajos. Caudales inferiores a 0,2 $\mu\text{l}/\text{min}$ pueden ser difíciles de conseguir utilizando el sistema ilustrado en las FIGs. 1A y 2ª, porque la bomba carece de un ajuste lo suficientemente lento, pero un experto en la técnica sería capaz de utilizar una configuración diferente de bomba y/o de jeringa para lograr caudales bajos de este tipo.

El caudal y, por lo tanto, la presión del producto a medida que es suministrado al tejido diana, pueden ser aumentados, disminuidos, o se pueden mantener estables a lo largo del suministro. En una realización preferida, el caudal se mantiene sustancialmente constante a lo largo del suministro, en lugar de ser "incrementado" hasta una meseta.

Típicamente, un vector recombinante es suministrado a través de dispositivos CED como sigue. Una cánula mejorada de la presente invención se inserta en el tejido del SNC en el sujeto elegido. Están disponibles mapas estereotácticos y dispositivos de posicionamiento, por ejemplo de ASI Instruments, Warren, MI. El posicionamiento también puede llevarse a cabo mediante el uso de mapas anatómicos obtenidos mediante formación de imágenes por TC y/o MRI para ayudar a guiar el dispositivo de inyección hacia el objetivo elegido.

Los Ejemplos 2-5 describen el uso de una cánula de la presente invención para suministrar el gen que codifica hAADC al cerebro de seres humanos, ratas y primates no humanos. El suministro del gen hAADC puede ser útil en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (PD). La PD se caracteriza, en parte, por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra y una disminución grave de la dopamina en el putamen

(Hornykiewicz (1975) *Nat'l Inst. Drug Abuse Res Monogr. Ser.* (3): 13-21). La AADC es una enzima en la vía de la biosíntesis de dopamina que convierte L-dopa en dopamina. Estudios previos han demostrado que la transferencia del ADNc que codifica AADC humano al putamen de rata o de primates no humanos pueden reducir las dosis efectivas L-dopa en modelos animales de PD y, con ello, restaurar la dopamina estriatal a los niveles normales (Bankiewicz et al. (2000) *Exp. Neurol.* 164 (1): 2-14; Sánchez-Pernaute et al. (2001) *Mol. Ther.* 4(4): 324-30). En pacientes con PD humanos, sería de esperar que esta terapia redujera los requisitos de L-dopa y prolongara el tiempo durante el cual se observa el beneficio clínico del fármaco.

El Ejemplo 2, junto con las tablas y figuras asociadas, proporciona un protocolo y resultados experimentales para el suministro de un gen al cerebro de un primate utilizando una cánula de la presente invención (dispositivo clínico B). Viriones rAAV que codifican hAADC (AAV-hAADC-2) se infunden en el putamen de cuatro monos rhesus normales y la distribución de la expresión de AADC se determina mediante inmunohistoquímica. Se someten a ensayo dos protocolos de infusión: un proceso en rampa (aumento gradual lento en la tasa de 0.2 µL/min a 1 µL/min), y una infusión no en rampa a una velocidad constante de 1 µL/min. Los criterios de valoración primarios son una evaluación de la seguridad de los procesos de infusión y la evaluación de la expresión del transgen a las 5,5 semanas post-infusión.

Observaciones clínicas después de infusiones de vectores no revelan anomalías en la conducta durante el período de estudio. No se observan diferencias en la patología macroscópica, ya sea con el proceso de infusión en rampa o no en rampa. La histopatología es equiparable en ambos grupos, y revela sólo una reacción tisular inflamatoria localizada mínima a lo largo del recorrido de la aguja en respuesta a la colocación de la cánula y la infusión del vector. Además, la inmunohistoquímica con AADC demuestra que el vector se distribuye a lo largo del putamen, sin diferencia significativa en el volumen de inmunotinción con cualquiera de los procesos de infusión. Niveles de anticuerpos séricos contra el vector AAV2 exhibieron un incremento menor después de la infusión.

Los siguientes ejemplos se proporcionan simplemente para ilustrar realizaciones de la presente invención, y no para definir o limitar la invención.

EJEMPLO 1

PROCESOS DE MONTAJE Y EMPAQUETADO

A. Cánula Ilustrativa nº 1

Una cánula escalonada ilustrativa (tal como se muestra en las FIGs. 3A y 3B) se produjo como sigue.

Segmentos de tubuladura de acero inoxidable se cortaron en tramos y se soldaron utilizando un láser Lasag Nd:YAG o Neodimio YAG (granate de itrio y aluminio), un láser ultravioleta en la región de longitud de onda de 454 nm. La soldadura entre los segmentos 23G y 19G fue sometida a ensayo en cuanto a la ausencia de fugas y todas las juntas de soldadura se sometieron a ensayo para soportar una fuerza de tracción mínima de 44 N (10 libras). La soldadura entre los segmentos 23G y 19G debería estar libre de fugas para evitar que cualquier producto que pueda rebosar en el exterior de la aguja se introduzca en el lumen de la cánula. Por la misma razón, la junta de cola entre el extremo distal expuesto de la tubuladura de sílice fundida y las partes de tubuladura de acero de la cánula deberían ser estancas a los líquidos.

La aguja se pasivó y se limpió mediante ultrasonidos una vez completadas las etapas del láser. La tubuladura de sílice fundida se corta y se ensambla a la cánula de acero con pegamento de cianoacrilato. Un cubo de la aguja BD se une al extremo distal de la tubuladura para terminar el montaje. Antes del empaquetado, un protector de aguja de plástico se coloca sobre el extremo proximal de la cánula para proteger la punta y, a continuación, todo el conjunto se empaqueta en una bolsa Tyvek® previamente etiquetada para la esterilización.

El sub-conjunto de la aguja de inyección (INSA) fue montado deslizando una sucesión de segmentos de tubuladura de acero inoxidable sobre un segmento **20** de núcleo de la tubuladura (246 mm (9,67 pulgadas) de largo, 23 RW de corte, 0,635/0,648 (0,0250/0,0255) OD, 0,318/0,356 (0,0125/0,0140) ID, 0,152 (0,006) pared). FIG. 3A. Todas las dimensiones relacionadas con el diámetro interior (ID), el diámetro exterior (OD) y espesor de pared ("pared") de la tubuladura se proporcionan en mm (y pulgadas), con valores apareados X/Y que representan tolerancias mínimas y máximas.

Haciendo referencia ahora a la FIG. 3A, el segmento **22** (210 mm (8,28 pulgadas) de largo, 19 RW de corte, 1,05/1,08 (0,0415/0,0425) OD, 0,648/0,724 (0,0255/0,0285 ID, 0,191 (0,0075) pared) se colocó sobre el segmento de núcleo **20** para dejar 10 mm (0,390 pulgadas (10 mm) del núcleo que se extiende más allá del extremo distal final del segmento **22**.

El segmento **24** (160 mm (6,31 pulgadas) de largo, 17 RW de corte, 1,46/1,49 (0,0575/0,0585 OD, 1,03/1,10 (0,0405/0,0435) ID, 0,203 (0,008) pared) se colocó sobre los segmentos **20** y **22** para dejar 50,0 mm (1,970 pulgadas) de segmento **22** que se extiende más allá del extremo distal del segmento **24**. El segmento **26** (160 mm (6,31 pulgadas) de largo, 15 RW de corte, 1,82/1,84 (0,0715/0,0725) OD, 1,51/1,56 (0,0595/0,0615) ID, 0,152 (0,006) pared) se colocó sobre los segmentos **20**, **22**, **24** para dejar 50,0 mm (1,970 pulgadas) de segmento **22** que se extiende más allá del extremo distal del segmento **26**. El segmento **28** (160 mm (6,31 pulgadas) de largo, 2,18/2,21 (0,086/0,087) OD, 1,87/1,91 (0,0735/0,0750) ID, 0,152 (0,006) pared) se colocó sobre los segmentos **20**, **22**, **24**, **26** para dejar 50,0 mm (1,970 pulgadas) de segmento **22** que se extiende más allá del extremo distal del segmento **28**. El segmento **30** (40,1 mm (1,58 pulgadas) de largo, 2,74/2,79 (0,108/0,110) OD, 2,24/2,27 (0,0880/0,0895) ID, 0,254 (0,010) pared) se colocó sobre los segmentos **20**, **22**, **24**, **26**, **28** para dejar 180 mm (7,090) pulgadas de segmento **20** que se extiende más allá del extremo distal del segmento **30**.

Todos los componentes de fueron soldados con láser en su lugar. La costura de soldadura distal entre los segmentos **20** y **22** se hizo 100% estanca al aire, y el interior del segmento 1 se sometió a ensayo para asegurar que no había ninguna obstrucción (p. ej., utilizando un alambre o perno de retención de 0,305 mm (0,012 pulgadas) de diámetro). Todas las juntas de soldadura deben resistir una fuerza de tracción mínima de 44 N (10 libras).

Una vez ensamblado, el INSA se pasivó y se limpió mediante ultrasonidos como sigue: aluminio Oakite limpiado durante 10 minutos, enjuagado por pulverización con agua desionizada durante 7 minutos, enjuagado mediante ultrasonidos en alcohol, y secado al aire.

Un protector **32** de la aguja (230 mm (9,0 pulgadas) de largo, 3,96 (0,156) OD, 2,64/2,74 (0,104/0,108) ID, 0,635 (0,025) pared) se coloca sobre segmentos ensamblados **20**, **22**, **24**, **26**, **28**, **30** para dejar un segmento de 20 mm (0,8 pulgadas) de segmento **30** que se extiende más allá del extremo proximal de los segmentos ensamblados.

Los INSAs se inspeccionaron para estar libres de trazas de ácido y disolución de limpieza como sigue: retirar el protector **32** de la aguja, empapar en baño de alcohol, sustituir protector **32** de la aguja, soplar aire a través del extremo distal del protector **7** de la aguja, inspeccionar efluente líquido en el extremo proximal del segmento **20**, repetir hasta que todos los efluentes aparezcan como limpios.

El extremo distal de la INSA fue inspeccionado para asegurarse de que era recto.

La FIG. 3B ilustra el montaje de un conjunto de aguja de inyección ilustrativo según se describe en esta memoria. Tal como se muestra en la FIG. 3B-1, el protector **32** de la aguja se retiró del INSA **35** según se describe arriba, y un tramo **40** de tubuladura de sílice fundida se enhebró a través de la tubuladura **15** con núcleo 23G del INSA **35**, comenzando en el extremo proximal, hasta que se extendió aproximadamente 51 mm (2 pulgadas) más allá del extremo distal del INSA **35**. Adhesivo Loctite® (adhesivo Loctite® Prism® 4011, de baja viscosidad) se aplicó a la tubuladura **40** de sílice fundida expuesta, y luego se retiró la tubuladura de sílice fundida hasta que aproximadamente 25 mm (1 pulgada) permanecía más allá del extremo distal del INSA al tiempo que se hacía girar el INSA para distribuir uniformemente el adhesivo. La resistencia de la unión de la unión adhesiva es al menos 22 N (5 libras). La tubuladura de sílice fundida expuesta se recorta de manera que 10 mm (0,390 pulgadas) permanecían extendidos desde el extremo distal del INSA, y se reemplazó el protector **32** de la aguja.

Se preparó un tramo de 122 cm (48 pulgadas) de tubuladura **31** de FEP (Teflon) (1,6 mm (1/16 pulgadas) OD, 0,76 mm (0,030) ID) y ambos extremos se sumergieron en imprimación Loctite® (imprimación Loctite® 7701) y se secó al aire. El extremo proximal de la tubuladura **40** de sílice fundida se enhebró a través de la tubuladura de FEP. Adhesivo Loctite® se aplicó al extremo proximal del INSA. El extremo distal de la tubuladura **31** de FEP fue empujado rápidamente sobre el extremo de la aguja del INSA. La resistencia de la unión de la unión adhesiva es al menos 18 N (4 libras).

Tal como se muestra en la FIG. 3B-3, un espaciador **47** de acero inoxidable 23G (25 mm (1 pulgada) de largo, 23 RW) se colocó sobre la tubuladura **40** de sílice fundida. Adhesivo Loctite® se aplicó a la parte exterior de la tubuladura **40** de sílice fundida y hacia el exterior del espaciador **47**, y el espaciador **47** se insertó en el extremo proximal de la tubuladura **31** de FEP hasta que los extremos proximales quedaron al ras. Un segmento de 13 mm (0,5 pulgadas) de largo de tubuladura retráctil **49** de PVC 13,18 (0,125) ID se deslizó sobre el extremo proximal de la tubuladura **31** de FEP.

Tal como se representa en la FIG. 3B-4, a continuación un adaptador de compresión Luer hembra **50** de 1,6 mm (1/16 pulgada) se deslizó sobre el extremo proximal de la tubuladura **31** de FEP y se colocó un casquillo **51** aproximadamente 25 mm (1 pulgada) sobre el extremo proximal de la tubuladura **31** de FEP. Adhesivo Loctite® se aplica a la parte exterior la tubuladura **31** de FEP y el casquillo **51** se empujó para colocar el extremo proximal del casquillo al ras con el extremo proximal la tubuladura **31** de FEP. Se aplica adhesivo Loctite® para sellar las juntas entre la tubuladura **40** de sílice fundida, el espaciador **47**, la tubuladura **31** de FEP y el casquillo **51**.

La tubuladura **40** de sílice fundida restante, que se extiende proximalmente más allá del casquillo **51** se marcó y se desprendió. Como se muestra en la FIG. 3B-5, el casquillo **51** se asentó entonces ajustadamente en el adaptador de compresión Luer **50** (fuerza de tracción mínima de 13 N (3 libras)) y la tubuladura **49** de contracción por calor se contrajo luego por calor sobre la junta entre el extremo proximal del INSA **35** y la tubuladura **31** de FEP.

- 5 El conjunto se sometió a ensayo para determinar fugas de aire, y una tapa **55** Luer macho se añadió al adaptador de compresión **50**. (FIG. 3B-6).

El INA ensamblado puede entonces ser empaquetado y sellado en una bolsa Tyvek® (4x580 mm (4x23 pulgadas)) con una etiqueta, y se coloca en una caja etiquetada para su almacenamiento o envío.

- 10 Aunque la tubuladura **31** estaba hecha de Teflón FEP, un experto en la técnica reconoce que se puede utilizar cualquier material adecuado para tubuladuras, o la tubuladura se podría omitir por completo. La tubuladura **31** de FEP se incluyó como una protección para la tubuladura **40** de sílice fundida, y para ayudar a asegurarse de que la tubuladura de sílice fundida muy delgada era visible a los operarios del sistema. Ninguna de estas funciones es esencial. Además, debido a que la tubuladura de FEP no entra en contacto con la tubuladura de productos de otros materiales, puede ser utilizada sin tener en cuenta la biocompatibilidad.

- 15 La cánula acabado, producida según se describe en esta memoria comprende cinco capas de tubuladura de acero inoxidable a lo largo de 160 mm (6,31 pulgadas) de su longitud (p. ej., el tramo que comprende el elemento de tubuladura **28**), con un diámetro interno de 0,318-0,356 mm (0,0125 - 0,0140 pulgadas) y un diámetro exterior de 2,18 a 2,21 mm (0,086 a 0,087 pulgadas). Esta cánula tiene una rigidez sustancial a lo largo de este segmento, lo que impide la flexión de la cánula a medida que se inserta en el tejido diana (p. ej., el cerebro). Además, una sexta capa de tubuladura de acero **30** añade incluso una mayor resistencia a la cánula a lo largo de un segmento de 40,1 mm (1,58 pulgadas), que impide que la cánula sea aplastada o deformada cuando se monta en un marco estereotáctico durante el uso tal como se ilustra en la FIG. 5.

B. Cánula Ilustrativa nº 2

- 25 Otra cánula se produjo de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 1A. Tal como se muestra en la FIG. 6, la cánula **80** se compone de cuatro capas de acero quirúrgico 304 fusionadas entre sí mediante soldadura láser en un diseño en escalones, terminando en una tubuladura de calibre 30. La cánula de acero (aproximadamente 24,6 cm de un extremo a otro, incluyendo la punta de la aguja) está revestida con sílice fundida de 100 µm de diámetro interior **82** que también forma la punta del dispositivo de suministro al extenderse 1 cm más allá del acero. Aproximadamente 1,2 metros (122 cm) de sílice fundida adicional **82** cubiertos con una tubuladura de Teflon **84** se conectan a un cubo Luer **86**. Se sella un espaciador **88** de 25 mm (1 pulgada) de calibre 30 entre la sílice fundida y la tubuladura de Teflon y se fija al cubo Luer con pegamento de cianoacrilato de calidad médica.

EJEMPLO 2

SUMINISTRO DE VECTORES VIRALES RECOMBINANTES QUE CODIFICAN AADC AL CEREBRO DE PRIMATES

- 35 Vector recombinante AAV que codifica AADC humano (AAV-hAADC-2) se preparó y se suministró al putamen de monos rhesus como sigue.

Producción de Vector Recombinante

- 40 AAV2 recombinante se generó por un protocolo de transfección triple (Matsushita et al. (1998) *Gene Ther.* 5(7):938-45). En síntesis, después de la expansión de las células del banco de células de trabajo HEK 293 a través de una serie artículos de cultivo desechables en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10% y glutamina 2 mM, las células fueron co-transfectadas con tres plásmidos (pAAV-hAADC-2, pHLP 19 y pladeno5). El clon del vector de rAAV-hAADC-2 es el mismo que el descrito previamente (Sanftner et al. (2004) *Mol. Ther.* 9(3):403-9). Los plásmidos pHLP 19 y pladeno5 se describen más detalladamente en las patentes de EE.UU. N°s. 5.139.941; 5.622.856; 6.001.650 y 6.004.797.

- 45 Después de un tiempo de transfección apropiado, se reemplazó el medio que contenía el reactivo de transfección con medio libre de suero y las células se incubaron adicionalmente para permitir la producción del vector. Las células se recogieron, se concentraron por centrifugación y se lisaron mediante un método de congelación/descongelación para liberar el vector AAV-hAADC-2. Después de la centrifugación para eliminar los restos celulares, el lisado se trató con Benzonase®, cloruro de calcio, y se precipitó con polietilenglicol. El vector se purificó mediante dos ciclos de ultracentrifugación en gradiente isopícnico en cloruro de cesio. AAV-2-hAADC se concentró y se diafiltró con solución salina tamponada (PBS) estéril que contenía 5% de sorbitol. Se añadió Poloxamer 188™ (al 0,001%), el material se filtra (0,22 µm) en condiciones estériles y se almacena congelado a
- 50

-70°C. La pureza del vector se evaluó mediante SDS-PAGE. El vector rAAV2 purificado, utilizado en este estudio, mostró sólo VP1, VP2 y VP3 mediante tinción con plata de geles SDS-PAGE. El título se determinó mediante análisis Q-PCR en tiempo real de genomas de vectores.

Procesos Quirúrgicos

En cada uno de los monos se realizó una formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) antes de la cirugía para identificar coordenadas estereotácticas (basado en la estructura anatómica del putamen). Dos sitios fueron fijados como objetivo en cada uno de los hemisferios con un sitio centrado en el putamen rostral y un segundo en el putamen caudal. Monos rhesus adultos ($n = 4$) se inmovilizaron con una mezcla de ketamina (Ketaset®, 10 mg/kg, inyección intramuscular) y Valium® (0,5 mg/kg, inyección intravenosa), se intubaron y se prepararon para la cirugía. Fluidos isotónicos fueron suministrados por vía intravenosa a razón de 2 mL/kg/h. La anestesia fue inducida con isoflurano (Aerane®, Omeda PPD, Inc., Liberty, Nueva Jersey) al 5% v/v, y después se mantuvo al 1%-3% v/v durante la duración de la cirugía. La cabeza del animal se colocó en un marco estereotáctico compatible con MRI. La temperatura del núcleo se mantuvo con una manta de agua circulante mientras que el electrocardiograma, la frecuencia cardíaca, la saturación de oxígeno y la temperatura corporal se monitorizan continuamente durante el proceso. Se practicaron agujeros de trépano en el cráneo con un taladro dental para exponer zonas de la duramadre justo por encima de los sitios diana. AAV-hAADC-2 fue infundido mediante CED (Lieberman et al (1995) *J. Neurosurg.* 82(6): 1021-9; Bankiewicz et al. (2000) *Exp. Neurol.* 164(1):2-14). Cada uno de los monos recibió un total de 3×10^{11} vg en 200 μ L repartidas en cuatro sitios (50 μ L por sitio con dos sitios por hemisferio). Cánulas de infusión fueron guiadas manualmente al putamen en cada uno de los hemisferios del cerebro, y los animales recibieron infusiones bilaterales (es decir, infusiones secuenciales a los sitios rostral y caudal en los dos hemisferios) de AAV-hAADC-2 ($1,5 \times 10^{12}$ vg/ml) a velocidades de infusión de 0,2 μ L/min (10 min), 0,5 μ L/min (10 min), 0,8 μ L/min (10 min) y 1 μ L/min (35 min) para el hemisferio izquierdo y un caudal constante de 1 μ L/min (50 min) para el hemisferio derecho. Las coordenadas de estereotáctica real para cada uno de los animales eran: MR15101M putamen rostral AP: 18, ML: $\pm 10,5$, DV: 20, putamen caudal AP: 15, ML: ± 13 , DV: 20, R211101M putamen rostral AP: 24, ML: $\pm 12,5$, DV: 20, putamen caudal AP: 21, ML: $\pm 13,5$, DV: 20, MR15109M putamen rostral AP: 12, ML: ± 13 , DV: 20, putamen caudal AP: 15, ML: ± 12 , DV: 20, R23700M putamen rostral AP: 21, ML: $\pm 13,5$, DV: 21, putamen caudal AP: 24, ML: $\pm 12,5$, DV: 20. Aproximadamente 10 minutos después de la infusión, se retiraron las cánulas, los sitios de las heridas se cerraron, y el mono se controló para la recuperación de la anestesia y luego regresó a su jaula para continuar las observaciones.

Histología e inmunohistoquímica

Para los estudios histológicos, los animales fueron perfundidos a través de infusión de solución salina intracardíaca, seguido de formalina tamponada neutra (NBF) al 10%. Los cerebros se extrajeron después y se cortaron en rodajas en un molde en bloques coronales (8-10 mm). Los bloques de cerebro recogidos fueron fijados por inmersión en fijador de NBF al 10%. Los bloques de tejido fueron transferidos 2-3 días después de la fijación en concentraciones ascendentes de PBS/disolución de sacarosa (al 10, 20 y 30%) durante un período de 3-5 días. Los cerebros se congelaron en un baño de isopentano, se enfriaron en hielo seco y se cortaron en serie en secciones coronales de un espesor de 40 μ m en un criostato. Cada décima sección se tiñó con soluciones de hematoxilina y eosina (H y E) (Richard Allen Scientific, Kalamazoo, MI) para el análisis histopatológico. La inmunohistoquímica se llevó a cabo en secciones libremente flotantes con un anticuerpo primario específico para AADC (Chemicon, Temecula, CA, 1:1.500). Las secciones se incubaron en peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 min para inactivar las peroxidasas endógenas. Tras el bloque de la unión no específica con suero normal de cabra al 10%, las secciones se incubaron en anticuerpo primario durante la noche a temperatura ambiente, luego con un anticuerpo IgG anti-conejo biotinilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA, 1:300) con peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina (Vector Laboratories, 1:300) a temperatura ambiente, ambos durante 1 h. El complejo se visualizó con 3-3'-diaminobencidina (DAB, Vector Laboratories) y peróxido de hidrógeno. Las secciones se montaron en portaobjetos Superfrost Plus® (Brain Research Laboratories, Newton, MA), se secaron, se deshidrataron en series de etanol ascendentes, se aclararon en xileno y se montaron con Cytoseal-XYL (Richardson Allen Scientific, Kalamazoo, MI). La distribución anterior-a-posterior de inmunotinción de hAADC se determinó por la fórmula ($n \times 10 \times 40 \mu\text{m}$), en donde n es el número de secciones de células hAADC-positivas, 40 μ m es el espesor de la sección, y se examinó cada décima sección. El volumen de distribución fue estimado en las secciones de serie (cada décima), teñidas para AADC con el método de estereología basado en el diseño Fractionador Óptico-Disector Óptico bajo un aumento 63X en un microscopio Zeiss equipado con una cámara de vídeo y software de estereología StereoInvestigator™ (MicroBrightfield, Williston, VT). CEE es $< 5\%$ para cada uno de los grupos. Los resultados se presentan como media $\pm$ DE desviación estándar. El ensayo t de Student se utilizó para medir la significancia estadística.

PCR Cuantitativa en Tiempo Real

El vector AAV-hAADC-2 utilizado en este estudio contiene el ADNc diana AADC humano. Los cebadores de la Q-PCR en tiempo real y la sonda se reasocian a los exones 2 y 3 del gen AADC, que abarcan un intrón no presente en la secuencia del vector, minimizando con ello la amplificación del ADN genómico. La Q-PCR en tiempo real se

estandariza con ADN de plásmido linearizado que contiene el inserto de vector y los genomas de vector se cuantificaron como se ha descrito previamente (Sommer et al. (2003) *Mol. Ther.* 7(1): 122-8).

Titulación Neutralizante del Anticuerpo AAV

El título de anticuerpo neutralizante (NAb) de suero o plasma se determinó *in vitro* en un ensayo basado en células. Un número definido de partículas de vector AAV2 que codifica un gen informador de β galactosidasa (AAV2-LacZ) se incubó con suero de ensayo durante 1 h a 37°C antes de la adición de la mezcla a células HEK-293 próximas a la confluencia en placas de 96 pocillos. La transducción de AAV2 control (100%) se definió como la cantidad de actividad de β -galactosidasa medida en cultivo de 24 h después de la transducción con AAV2-LacZ en presencia de suero normal de ratón (NMS). Se realizó una dilución en serie medio-log del suero de ensayo en NMS para determinar la dilución más alta de suero de ensayo que resulta en una inhibición de 50% o más de la expresión de β -galactosidasa. Cada una de las series de dilución se sometió a ensayo por triplicado. Un plasma de referencia con un título de virus AAV2 neutralizante bien definido se ejecutó en cada uno de los ensayos y se utilizó un control negativo (sólo NMS) para determinar el fondo del ensayo. El título de NAb se definió como las dos diluciones que enmarcan el nivel de inhibición del 50%, p. ej., 1:100 a 1:316.

ELISA de Puenteo

Placas de titulación (96 pocillos) se revistieron con partículas de AAV2 y luego se incubaron con la muestra de ensayo (suero o plasma). Las placas se lavaron y después se incubaron con partículas de AAV2 biotinilado, que fueron detectadas luego con estreptavidina conjugada con HRP. Las partículas de AAV2 biotiniladas sólo pueden ser capturadas por anticuerpos multivalentes que forman un puente entre dos partículas de AAV2. Una señal de fondo no específica muy baja en este ensayo permitió el ensayo de diluciones sin diluir o bajas de artículos de ensayo, y el ensayo tiene una sensibilidad más alta que un ELISA clásico, en el que el anticuerpo primario en la muestra de ensayo es detectado mediante un anticuerpo secundario conjugado con enzima. El ensayo de puenteo permite comparaciones directas de títulos entre diferentes especies y clases de anticuerpos. El ensayo se estandarizó con cantidades conocidas de anticuerpo monoclonal de ratón purificado "A20" que reconoce AAV2 (Grimm et al., 1998). El límite de cuantificación de este ensayo era de aproximadamente 15 ng/mL de anticuerpo anti-AAV2. Muestras humanas con un título NAb de 1:100 contenían entre 1 y 10 μ g/mL de anticuerpo equivalente a A20. La variabilidad media entre ensayos para 65 muestras humanas que se sometieron a ensayos replicados por este ensayo era de 23%.

Diseño Experimental

Vectores AAV2 recombinantes transducen eficazmente el tejido del cerebro, pero los niveles de transducción disminuyen significativamente en presencia de títulos de anticuerpos de alta neutralización (NAb) ($> 1:1200$). (Sanftner et al (2004) *Mol. Ther.* 9(3):403-9). Por lo tanto, cuatro monos rhesus macho con títulos NAb de $\leq 1:100$ fueron seleccionados para infusiones de AAV2 (Tabla 1). Escaneos de MRI se realizaron antes del suministro AAV2 para determinar las coordenadas estereotácticas para la administración del vector. A los animales se les infundieron bilateralmente $1,5 \times 10^{11}$ vg de AAV-hAADC-2 en dos infusiones de 50 μ L ($7,5 \times 10^{10}$ vg/sitio) en cada uno de los hemisferios ($3,0 \times 10^{11}$ vg/cerebro). Caudales de infusión ascendentes (rampa) de 0,2 μ L/min (10 min), 0,5 μ L/min (10 min.), 0,8 μ L/min (10 min) y 1 μ L/min (35 min) se utilizaron para los hemisferios izquierdos, mientras que un caudal constante de 1 μ L/min durante 50 min (no rampa) se utilizó para los hemisferios derechos. Los animales fueron controlados durante 5,5 semanas, un periodo de tiempo satisfactorio para que la expresión de hAADC se volviera relativamente estable. Criterios de valoración primarios incluían la expresión de AADC según se determina por las evaluaciones de inmunohistoquímica y de seguridad según se determina mediante observaciones clínicas y la histopatología. Además, muestras de suero, recogidas en la línea base y al final del estudio se sometieron a ensayo para determinar la presencia tanto de anticuerpos neutralizantes como totales contra AAV.

TABLA 1

TÍTULOS DE ANTICUERPOS (NAB) DE SUERO ANTI-AAV Y PUENTE DE DATOS ELISA

ID de primate no humano	Muestra	Título de NAb	ELISA de puenteo (μ g/mL de Ab anti-AAV)
MR15102M	Pre-tratamiento	1:1 – 1,3:1 1:3.1 – 1:10	0,036
	Post-tratamiento	1:1 – 1,3:1 1:3.1 – 1:10	0,24 $\pm$ 0,08
MR15109M	Pre-tratamiento	1:3,1 – 1:10 1:3.1 – 1:10	Por debajo de Detección ($< 0,015$)
	Post-tratamiento	1:3,1 – 1:10	0,43 $\pm$ 0,35

		1:3.1 – 1:10	
R211101M	Pre-tratamiento	1:1 – 1:3,1 1:1 – 1:3,1	0,11
	Pos-tratamiento	1:31 – 1:100 1:10 – 1:31	0,63 ± 0,07
R23700M	Pre-tratamiento	1:10 – 1:31 1:31 – 1:100	0,24
	Post-tratamiento	1:31 – 1:100 1:100 – 1:316	1,3 ± 0,7

Desarrollo de Dispositivos de Infusión y Recuperación de Vector

Un dispositivo de infusión prototipo para uso humano ("Dispositivo Clínico A" o CDA) se componía de una cánula de 25 cm de acero inoxidable, hecho para ajustarse a un marco estereotáctico Leksell® estándar. La cánula CDA se componía de cuatro capas escalonadas de una tubuladura de acero inoxidable de grado médico para proporcionar rigidez y reducir al mínimo el volumen de retención interno. La cánula de acero CDA se conectó a una jeringa a través de 1,2 metros de tubuladura de Teflon®. Estudios de recuperación de vector a caudales de hasta 1 µL/min revelan que el 90% del producto vectorial se adsorbía al dispositivo (Tabla 2), a pesar de Poloxamer 188 al 0,01% incluido como un tensioactivo en la formulación del producto. Un lavado de 1 h del dispositivo con el vector mejora la recuperación subsiguiente, pero la pérdida de vector era todavía de aproximadamente 40%. El ensayo adicional en cuanto a la absorción de vector incluía el ensayo de cánulas de acero inoxidable escalonadas en el que el producto contacta con diferentes materiales de tubuladuras a caudales de ≤1 µL/min.

(Ejemplo 1A y 1B). Se observó una excelente recuperación del vector para cánulas que comprenden sílice fundida, Tygon® y tubuladura de silicona en contacto con el vector AAV. Otros materiales tales como acero, Teflon (PTFE y FEP) y poliimida fijaban cantidades significativas de vector.

TABLA 2

RECUPERACIÓN DE VECTOR: DISPOSITIVO PRECLÍNICO, DISPOSITIVO CLÍNICO A Y DISPOSITIVO CLÍNICO B

	Dispositivo Preclínico	Dispositivo Clínico A	Dispositivo Clínico B
Superficies de contacto con el producto	Sílice fusionada, Teflon®, polipropileno (acoplamiento Luer)	Acero inoxidable Nº 304, Teflon®, polipropileno (cierre y jeringa Luer)	Sílice fusionada, polipropileno (Luer y jeringa)
Volumen de retención interno	variable	350 µL	12 µL
Recuperación de vector tras volumen de lavado ≤ 50 µL (± DE)	63 ± 16%	9 ± 4%	101 ± 6%
Recuperación de vector tras 500 µL de lavado a 8 µL/min (± DE)	No hecho	60 ± 15%	No hecho

Gran parte de la pérdida de vector sólo se observó a caudales bajos. Por ejemplo, en tubuladuras de Teflon, la pérdida de vector era inversamente proporcional al caudal lineal. El noventa por ciento del vector se perdió a 1 µL/min (4 mm/min a lo largo de 1,2 metros de tubuladura), mientras que la recuperación aceptable de vector (> 80%) se podía alcanzar en la misma tubuladura a caudales por encima de 100 µL/min. Con el fin de maximizar el caudal lineal y para eliminar todo contacto del vector con las superficies de Teflon y acero, todo el núcleo del dispositivo clínico fue revestido con sílice fundida de diámetro interior 100 µm (Ejemplo 1B, FIG. 6). En este dispositivo ("Dispositivo Clínico B", o CDB), la cánula de acero rodea a la sílice fundida para proporcionar rigidez, y la sílice fundida se extiende 10 mm más allá de la punta de la cánula de acero (FIG. 6). Se incluyen dos escalones externos cerca de la punta de la aguja para minimizar el potencial de reflujo a lo largo del recorrido de la aguja. 1,2 metros adicionales sílice fundida conectan la cánula de CDB a un cubo Luer y están cubiertos por tubuladura de Teflon sólo para proporcionar protección. El CDB fue fabricado y montado de acuerdo con cGMP y fue esterilizado terminalmente mediante gas de óxido de etileno.

La recuperación cuantitativa de vector se evaluó a través de las infusiones simuladas con dispositivos preclínicos y clínicos. Para el dispositivo preclínico, 400 µL de la disolución de vector se retiraron del extremo distal en un tramo de tubuladura de Teflon que, a continuación, se acopló a una cánula de 7 cm compuesta de sílice fundida rodeada por una pieza de 4 cm de tubuladura de acero de calibre 27. Después de llenar la cánula a 100 µL/min, se dispensó un lavado adicional de 20 µL antes de recoger vector para los ensayos de recuperación. Se recogieron cuatro

muestras de dos dispositivos a caudales de 0,2 a 1,0 $\mu\text{L}/\text{min}$ (proceso en rampa) con una bomba de jeringa programable.

Tal como se muestra en la Tabla 2, la recuperación media del vector de los dispositivos preclínicos en estas condiciones era de $63 \pm 16\%$ ($\pm$ DE). Para los dispositivos clínicos, el vector AAV-2-hADC se diluyó a 5×10^{11} vg/mL, se cargó en jeringas y se fijó a los dispositivos. Después del llenado, el Dispositivo Clínico A se lavó con 500 μL de la disolución de vector a razón de 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ (62,5 min), mientras que el Dispositivo Clínico B se lavó con un total de 50 μL de la disolución de vector a razón de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ (12,5 min). Dos partes alícuotas secuenciales de 50 μL se recogieron de tres conjuntos de cada uno de los dispositivos a caudales de 0,2 a 1,0 $\mu\text{L}/\text{min}$. La concentración de vector en cada una de las muestras se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR).

La recuperación para el Dispositivo Clínico A era sólo $60 \pm 15\%$ después del extenso lavado durante una hora, mientras que se observó una recuperación completa de vector ($101 \pm 6\%$) para el Dispositivo Clínico B. La potencia de las muestras de vector recuperadas del Dispositivo Clínico B se confirmó mediante la determinación del título infeccioso (véase, Zhen et al. (2004) *Hum. Gene Ther.* 15(7):709-715. No se observó disminución significativa alguna en la actividad específica (unidades infecciosas/vg).

15 *Inmunohistoquímica y Cuantificación de la Expresión de hADC In-Vivo*

El análisis inmunohistoquímico de la expresión de hADC se realizó en cada uno de los hemisferios del cerebro a las 5,5 semanas post-infusión de AAV-hADC-2 para determinar si la distribución de vectores era diferente después de la infusión en rampa frente a no-en rampa con el Dispositivo Clínico B. Todos los monos exhibieron una expresión de hADC en el putamen. Secciones en serie fueron examinadas por microscopía de campo claro para células hADC-positivas. El volumen de distribución y la dispersión Anterior-Posterior (A-P) de células transgen hADC-positivas se determinaron para todos los animales.

La FIG. 7 muestra la tinción inmunohistoquímica para el transgen hADC en secciones transversales a lo largo del sitio de infusión. Las imágenes son de montajes completos de secciones de los animales MR15102M (A), MR15109M (B), R23700M (C) y R211101M (D). Las secciones están orientadas desde una vista caudal con el hemisferio derecho en el lado derecho de la imagen y el hemisferio izquierdo en el lado izquierdo de la imagen. En todos los animales, la expresión del transgen fue localizada en el putamen. No se detectó expresión de hADC alguna en las regiones corticales, excepto en línea directa con el recorrido de la infusión tal como se ilustra en la FIG. 7B. No se observó diferencia en el número de células hADC-positivas o intensidad de la tinción de hADC en una comparación de los hemisferios derecho e izquierdo.

Una imagen de mayor aumento de la zona de infusión del putamen en un animal representativo del hemisferio izquierdo que recibió la infusión en rampa (FIG. 8A) o el hemisferio derecho que recibió la infusión no en rampa (FIG. 8B) ilustra la expresión del transgen hADC en neuronas espinosas medianas. La tinción inmunohistoquímica para la expresión de hADC se observó en todos (8/8) los hemisferios infundidos. La administración de AAV-hADC-2 resultó en una buena expresión y cobertura del putamen con una distribución similar de AAV-hADC-2, ya sea con el proceso de infusión en rampa (hemisferio izquierdo) o no en rampa (hemisferio derecho).

La cuantificación del volumen estimado de la distribución de hADC en secciones en serie teñidas con anticuerpo anti-hADC se realizó con el software de estereología Stereoinvestigator™ (Microbrightfield, Williston, VT). La distribución anterior-posterior (A-P), una medida unidimensional de la distribución de rostral a caudal, y el volumen de inmunotinción de hADC se determinaron por separado para cada uno de los hemisferios de los cuatro primates no humanos tratados con AAV (Tabla 3). La distribución media A-P y el volumen medio para el hemisferio del lado derecho o del lado izquierdo se basaron en cada caso en cuatro hemisferios. La distribución media de A-P para el hemisferio izquierdo (suministro en rampa) fue $9.600 \mu\text{m} \pm 2.422 \mu\text{m}$ (DE) y el volumen medio era de $238 \text{ mm}^3 \pm 121 \text{ mm}^3$. La distribución media de A-P para el hemisferio derecho (suministro no en rampa) fue $9.606 \mu\text{m} \pm 2.037 \mu\text{m}$ y el volumen medio era de $284 \text{ mm}^3 \pm 55 \text{ mm}^3$. No hubo diferencia significativa alguna en el volumen medio o la distribución media de A-P entre en rampa o no en rampa mediante el ensayo t de Student no pareado una ($P = 0,9973$ para la comparación de la distribución A-P y $P = 0,5187$ para la comparación volumen de propagación). La infusión no en rampa no dio lugar a reflujo alguno del vector a lo largo del recorrido de la cánula o una disminución en la distribución de hADC derivado de transgen. La falta de reflujo también puede ser en parte debido al diseño de múltiples escalones de la cánula.

TABLA 3

DISTANCIA DE PROPAGACIÓN ANTERIOR-A-POSTERIOR (A-P) Y VOLUMEN DE PROPAGACIÓN DE AADC EN PRIMATES NO HUMANOS INFUNDIDOS CON AAV-hAADC-2

(Infusión no en rampa) derecha ID del animal	Distribución A-P (µm)	Volumen de propagación (mm ³)
MR15109	8.822	272,1
R23700M	12.400	346,5
R211101M	9.600	301,5
MR15102M	7.600	214,4
Media del hemisferio derecho (infusión no en rampa)	9.606	283,6
Desviación estándar	2.037	55,4
(Infusión no en rampa) izquierda ID del animal	Distribución A-P (µm)	Volumen de propagación (mm ³)
MR15109	8.400	110,2
R23700M	12.800	402,3
R211101M	10.000	217,3
MR15102M	7.200	222,2
Media del hemisferio izquierdo (infusión en rampa)	9.600	238,0
Desviación estándar	2.422	121,1

5 Histopatología

El análisis histopatológico de secciones en serie teñidas con H y E se realizó en todos los animales para determinar el efecto de la colocación de la cánula y la infusión de AAV-hAADC-2 con el suministro ya sea en rampa o no en rampa. La FIG. 9 muestra secciones teñidas con H y E dentro del putamen de un animal representativo, R211101M, con un aumento 5X. El animal R211101M recibió CED bilateral de AAV-hAADC-2 mediante el proceso de infusión no en rampa en el hemisferio derecho (Panel A) y el proceso de infusión en rampa en el hemisferio izquierdo (Panel B). Las imágenes ilustran la zona adyacente al recorrido de la cánula al nivel del putamen medio-caudal. Todos los portaobjetos teñidos con H y E fueron revisados por un neuropatólogo (Pathology Associates Inc.), desconocedor de las condiciones de tratamiento. Se observó alguna infiltración celular mononuclear en el putamen con manguitos perivasculares leves. Los dos putámenes contenían unos pocos vasos sanguíneos infiltrados y una infiltración del parénquima leve. El aspecto histopatológico de los hemisferios derecho e izquierdo era similar, con una ligera reacción inflamatoria del tejido en el sitio de infusión.

Desarrollo de anticuerpos neutralizantes

Títulos de anticuerpos neutralizantes (NAb) y títulos de anticuerpos totales a la cápsida de AAV se determinaron para muestras de suero recogidas antes de la infusión de vector, y en el momento de la necropsia. Aumentos leves en los niveles de anticuerpos anti-AAV fueron detectados mediante el ELISA de puenteo en todos los animales después de la infusión bilateral de AAV-hAADC-2 (Tabla 1). Los resultados de dos ensayos de NAb se muestran en la Tabla 1. El ELISA de puenteo está estandarizado con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-AAV2. Se muestra el promedio de los dos resultados para las muestras de post-tratamiento y se muestra un único resultado para las muestras de pre-tratamiento. El animal (R23700M) con el más alto título de anticuerpos séricos neutralizantes (1:10 a 1:100) antes del tratamiento tiene un aumento de anticuerpos post-tratamiento a 1:31 - 1:316 el Día 42. Este animal tenía una distribución del transgen hAADC similar cuando se comparaba con los otros animales y, por lo tanto, no hubo inhibición aparente de la propagación del vector asociado con el título más alto.

Observaciones clínicas

Los monos fueron evaluados diariamente en cuanto a síntomas clínicos, consumo de alimentos y peso corporal. Observaciones clínicas diarias post-quirúrgicas indicaban que los animales toleraban bien el proceso CED y no mostraban cambios de conducta. No hubo síntomas clínicos ni cambios en el peso corporal relacionados con el tratamiento con AAV-hAADC-2. Las observaciones realizadas durante el período post-tratamiento eran similares a las observadas comúnmente en los monos rhesus alojados en el laboratorio que se someten a procesos quirúrgicos similares.

35 Resultados

Una forma de realización de la cánula de la presente invención se sometió a ensayo para evaluar su capacidad de suministrar de manera efectiva el vector de rAAV a cerebro de primates, que puede servir como un modelo para la administración de vectores de rAAV terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson en un sujeto humano. Infusiones simuladas, diseñadas para someter a ensayo el suministro de vector estableció que esencialmente el 100% de la dosis prevista se puede suministrar con una cánula según se describe en esta memoria, preferiblemente evitando el contacto del vector con Teflon o con superficies de acero.

La administración estereotáctica de AAV-hAADC-2 en el putamen de cuatro primates no humanos se realizó mediante comparación de un proceso de infusión en rampa (aumento gradual de la tasa de infusión) frente uno no en rampa (tasa constante). La expresión de hAADC era detectable por inmunohistoquímica y se distribuyó ampliamente en el putamen. La cuantificación estereológica del volumen de hAADC derivado de transgen demostró una distribución similar en los hemisferios que reciben cualquiera de los procesos de infusión. Además de ello, el caudal constante no dio lugar a depósitos excesivos de vector a lo largo del recorrido de la aguja. El análisis histopatológico reveló sólo una ligera reacción inflamatoria del tejido localizada en la zona del recorrido de inserción de la cánula, lo que sugiere no existe una preocupación sobre la seguridad. No había ninguna diferencia aparente en el grado de infiltración celular o inflamación entre el putamen izquierdo y derecho (es decir, infusión en rampa frente a no en rampa). No se vieron observaciones clínicas anormales después de la cirugía y la infusión intraputamenal en ningún animal.

Además de los parámetros del dispositivo y de la infusión, otra consideración importante para el suministro eficaz de genes mediado por AAV en cualquier compartimiento es la potencial neutralización por anticuerpos anti-AAV. Hay una amplia gama de títulos de anticuerpos neutralizantes AAV pre-existentes en seres humanos (Blacklow et al. (1968) *J. Natl. Cancer Inst.* 40(2):319-27) que tienen el potencial de afectar negativamente a la eficacia de las técnicas de terapia génica. Cualquier enfoque de terapia génica mediada por AAV debe anticipar este tipo de obstáculos.

Por ejemplo, en un sistema modelo utilizando ratones SCID en el que se podían establecer títulos de anticuerpos neutralizantes AAV2 humanos en diversos niveles, se observó que títulos <1:10 impactaban significativamente en la transducción de hígado de AAV-Factor IX después de administración intravenosa (Scallan et al. (2004) *American Society of Gene Therapy*, Minneapolis, MN, Resumen N° 753 S286). Se asumió que el suministro de AAV2 al putamen está menos sujeto a la neutralización por anticuerpos circulantes debido al estado inmune privilegiado del SNC. De hecho, los estudios realizados en ratas pre-inmunizadas sistémicamente con AAV2 y luego infundidas de modo intra-estriatal confirmó una protección significativa frente a la neutralización con una disminución en la transducción observada sólo cuando los títulos de NAb excedían 1:1200 (Sanftner et al (2004) *Mol. Ther.* 9(3):403-9).

Los experimentos descritos en esta memoria utilizaban animales con títulos de NAb pre-existentes que oscilan desde 1:1 a 1:100 con el fin de excluir los anticuerpos neutralizantes como una variable de confusión, y estos títulos no tienen impacto aparente alguno en la expresión de hAADC en el putamen. Además de ello, los títulos post-infusión aumentaron sólo ligeramente después de la administración del vector, afirmando con ello el suministro de genes bien fijados como objetivo y mínimamente disruptivo con las actuales condiciones del dispositivo y de infusión. Estos resultados también sugieren que infusiones intra-estriatales repetidas de AAV2 pueden ser factibles en pacientes humanos.

En resumen, la infusión no en rampa de AAV-hAADC-2 a putamen de mono a través de un dispositivo de infusión de la presente invención (Dispositivo Clínico B) fue bien tolerada. La expresión y distribución del transgen (hAADC) en el putamen eran equiparables a condiciones de flujo ascendente más complicados y que consumen mucho tiempo. Dado que la terapia génica de enfermedades neurodegenerativas y otros trastornos del SNC es un campo en expansión (Tinsley y Eriksson (2004) *Acta Neurol. Scand.* 109(1):1-8), los presentes resultados sugieren que el diseño de Dispositivo Clínico B representa un avance importante en la metodología para este campo. Es probable que los parámetros del dispositivo y la infusión de la presente invención sean aplicables al suministro estriatal de AAV2 en pacientes con PD, y también para fijar como objetivo diferentes sitios anatómicos, suministrar una variedad de fármacos o agentes de terapia génica y tratar una variedad de indicaciones clínicas del SNC.

Los Ejemplos pretenden ilustrar la invención y no limitan por sus detalles el alcance de las reivindicaciones de la invención. Aunque se describen realizaciones ilustrativas preferidas de la presente invención, resultará evidente para un experto en la técnica que se pueden realizar diversos cambios y modificaciones en la misma sin apartarse de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una cánula escalonada (2) para suministrar un material al sistema nervioso central, teniendo la cánula escalonada un diámetro exterior, un extremo distal, un extremo proximal y un lumen que se extiende entre los extremos proximal y distal, comprendiendo la cánula escalonada dos o más segmentos co-axialmente dispuestos, teniendo cada uno de los segmentos un diámetro exterior que define el diámetro exterior de la cánula, en donde el diámetro exterior de los segmentos es diferente, caracterizada por que una superficie de la cánula que entra en contacto con el material a suministrar es de sílice fundida.
2. La cánula escalonada de la reivindicación 1, en donde la cánula contiene el material a suministrar.
3. La cánula escalonada de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la cánula comprende dos, tres, cuatro, cinco o seis segmentos dispuestos co-axialmente.
4. La cánula escalonada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el diámetro exterior de los segmentos disminuye desde el extremo proximal al extremo distal de la cánula.
5. La cánula escalonada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el diámetro interior de la cánula es constante.
6. La cánula escalonada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la cánula comprende, además, uno o más componentes tubulares (1, 3) que se extienden a través del lumen de la cánula.
7. La cánula escalonada de la reivindicación 6, en donde al menos un componente tubular comprende una tubuladura de sílice fundida.
8. La cánula escalonada de la reivindicación 7, en donde la cánula comprende, además, una tubuladura de FEP dispuesta alrededor de la tubuladura de sílice fundida.
9. La cánula escalonada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde uno o más segmentos comprenden acero inoxidable.
10. La cánula escalonada de la reivindicación 9, en donde el lumen de uno o más segmentos de acero inoxidable está revestido con uno o más polímeros.
11. La cánula escalonada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la cánula comprende cinco segmentos de acero inoxidable.
12. La cánula escalonada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde al menos un componente tubular se extiende de 1 mm a 10 mm del extremo distal de la cánula.
13. La cánula escalonada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el material a suministrar comprende un vector AAV.
14. Un conjunto de cánula, que comprende:
 - una cánula (2) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13; y
 - un depósito que comprende un vector AAV a suministrar a través de la cánula, en donde el depósito está operativamente conectado al lumen de la cánula.
15. El conjunto de cánula de la reivindicación 14, en donde el depósito comprende una jeringa (4).
16. El conjunto de cánula de la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en donde el conjunto de cánula comprende, además, una bomba (5) que está operativamente conectada a la jeringa.
17. El conjunto de cánula de la reivindicación 16, en donde la bomba es programable.
18. El conjunto de cánula de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en donde el depósito está operativamente enlazado a la tubuladura que se que se extiende a través del lumen de la cánula.

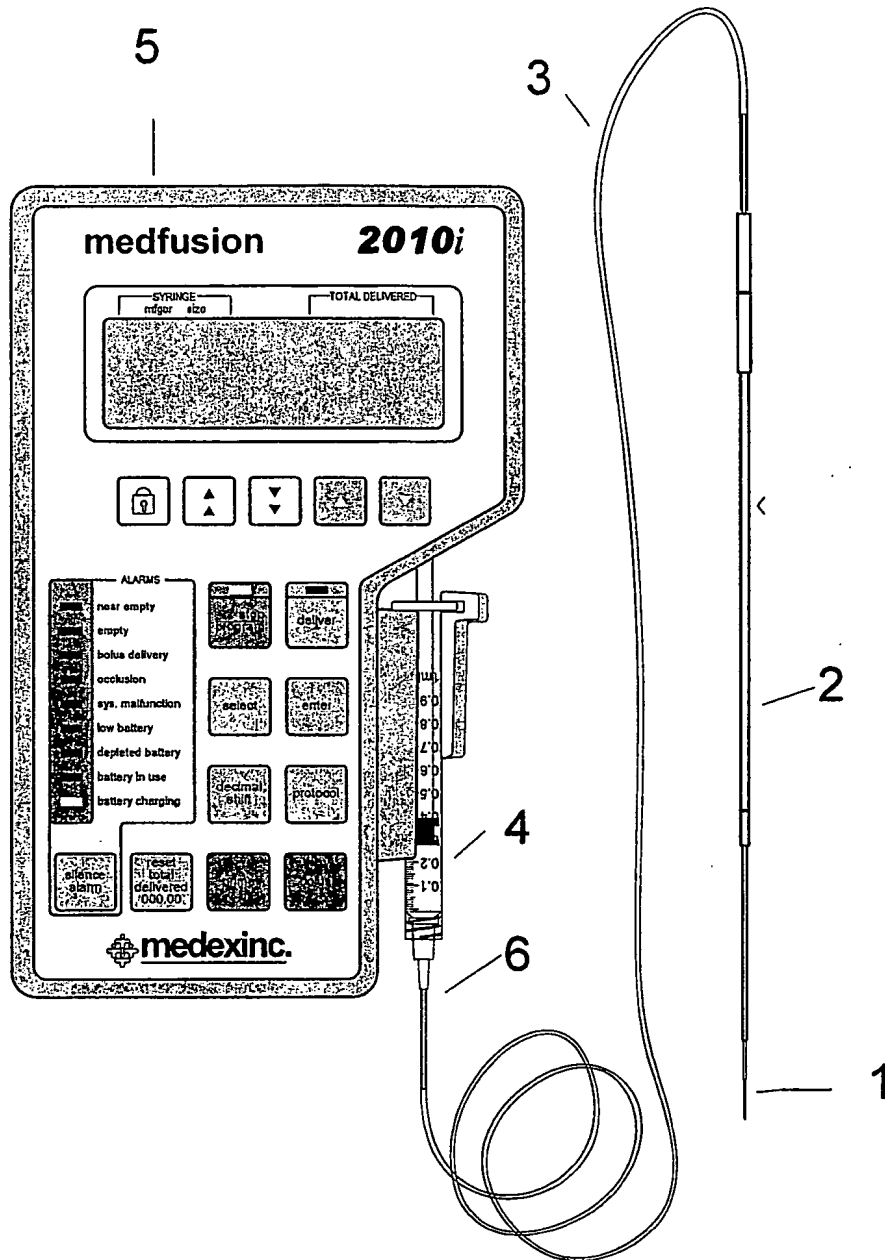


FIG. 1

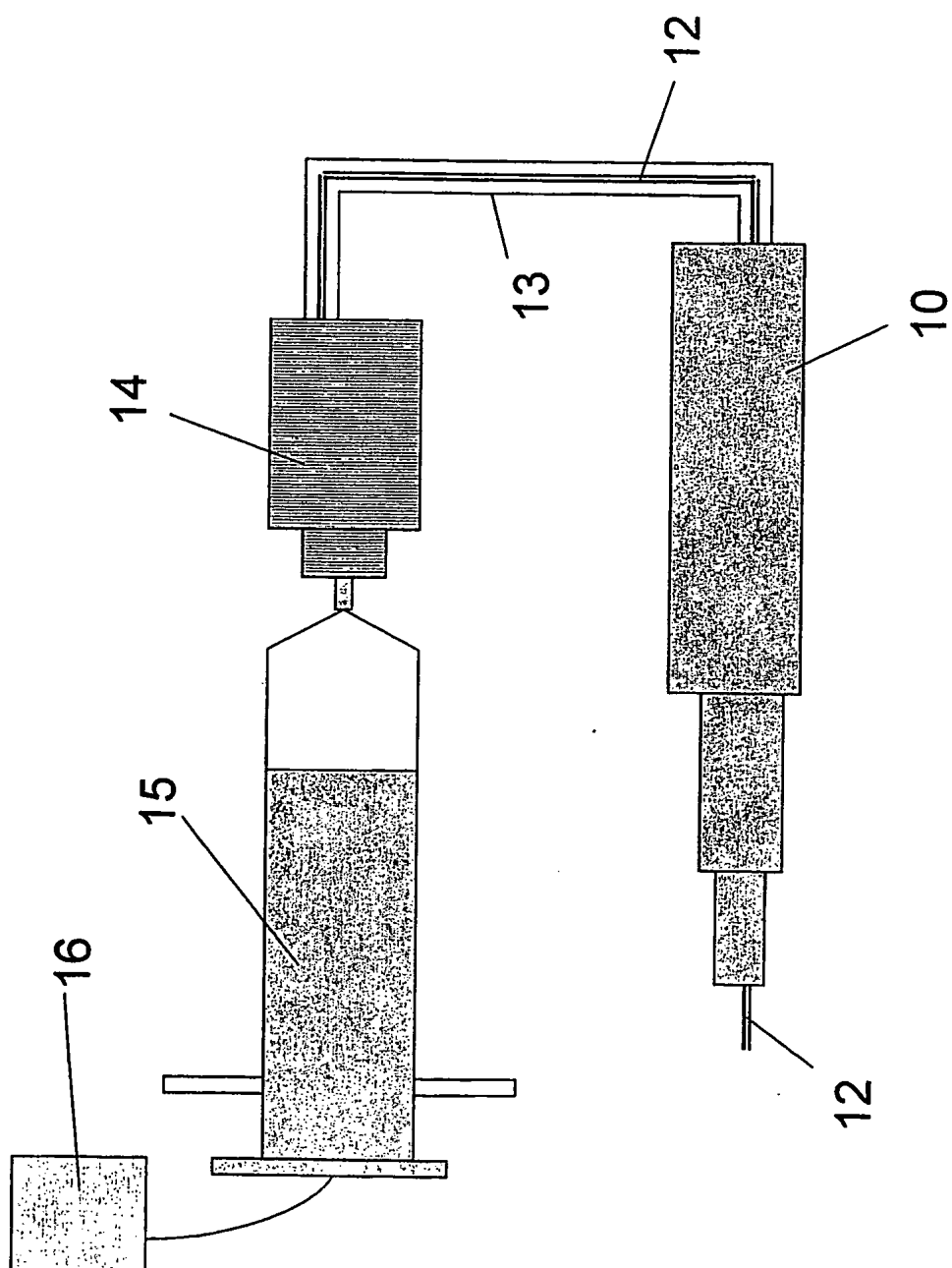


FIG. 2

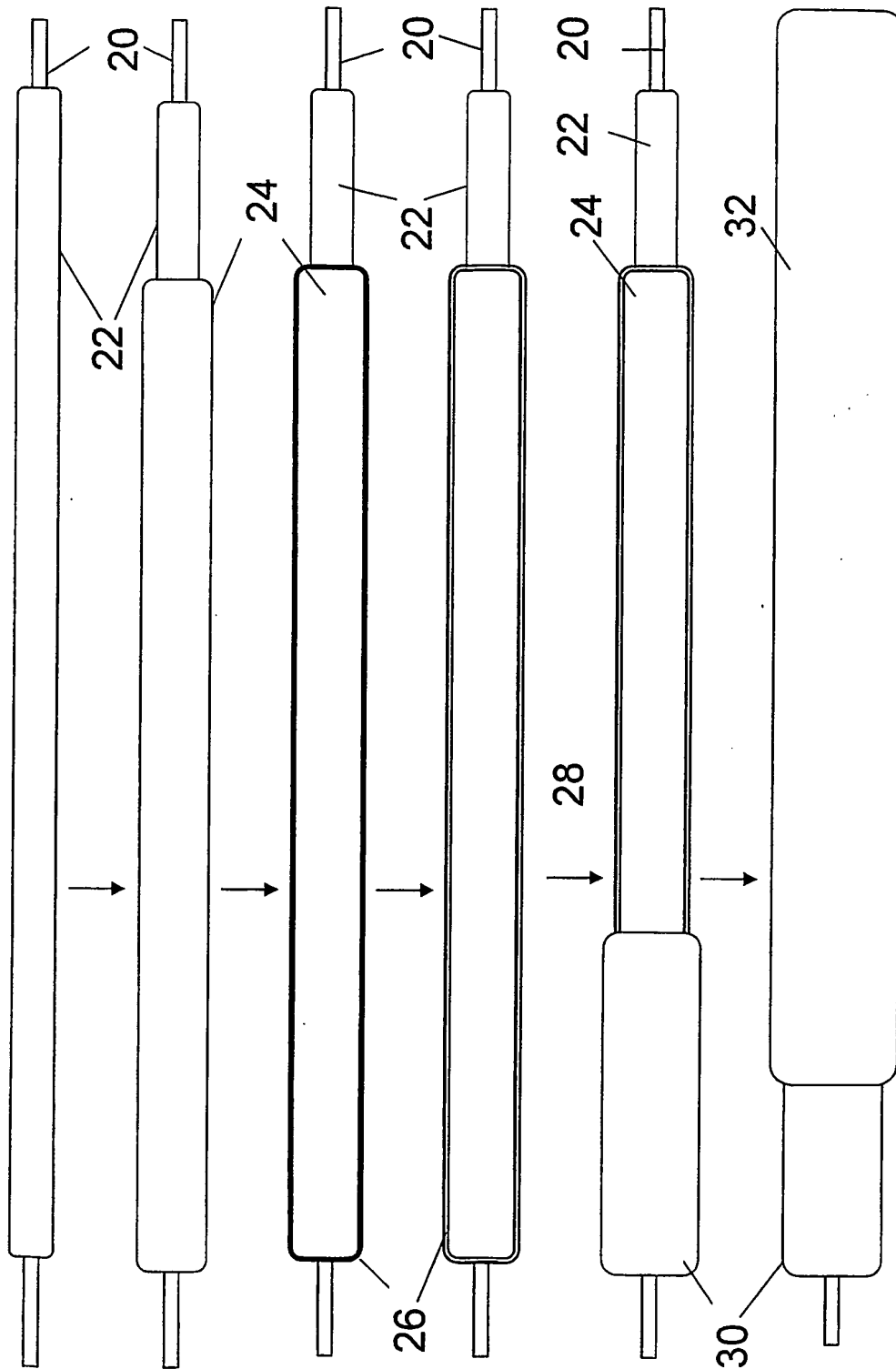


FIG. 3A

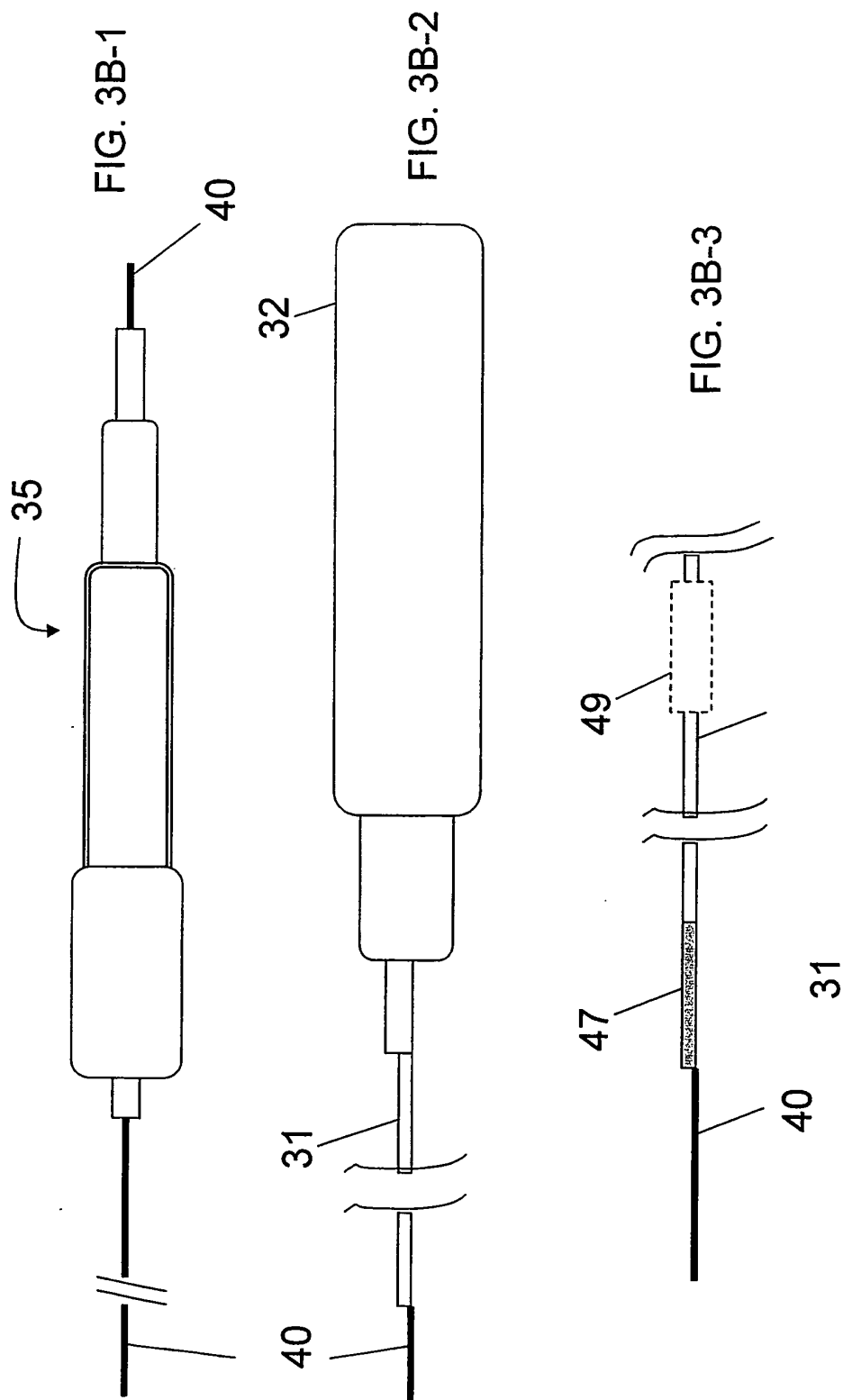


FIG. 3B

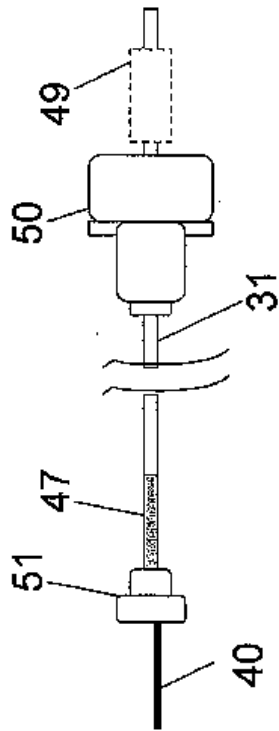


FIG. 3B-4

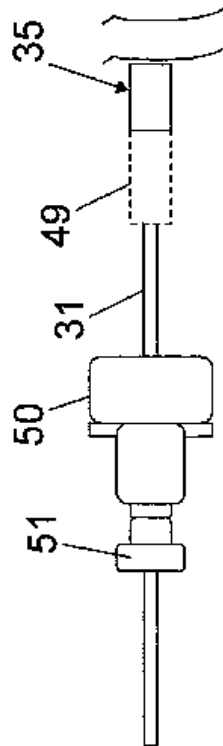


FIG. 3B-5

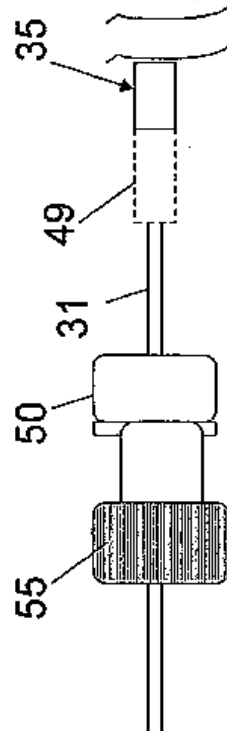


FIG. 3B-6

FIG. 3B (cont.)

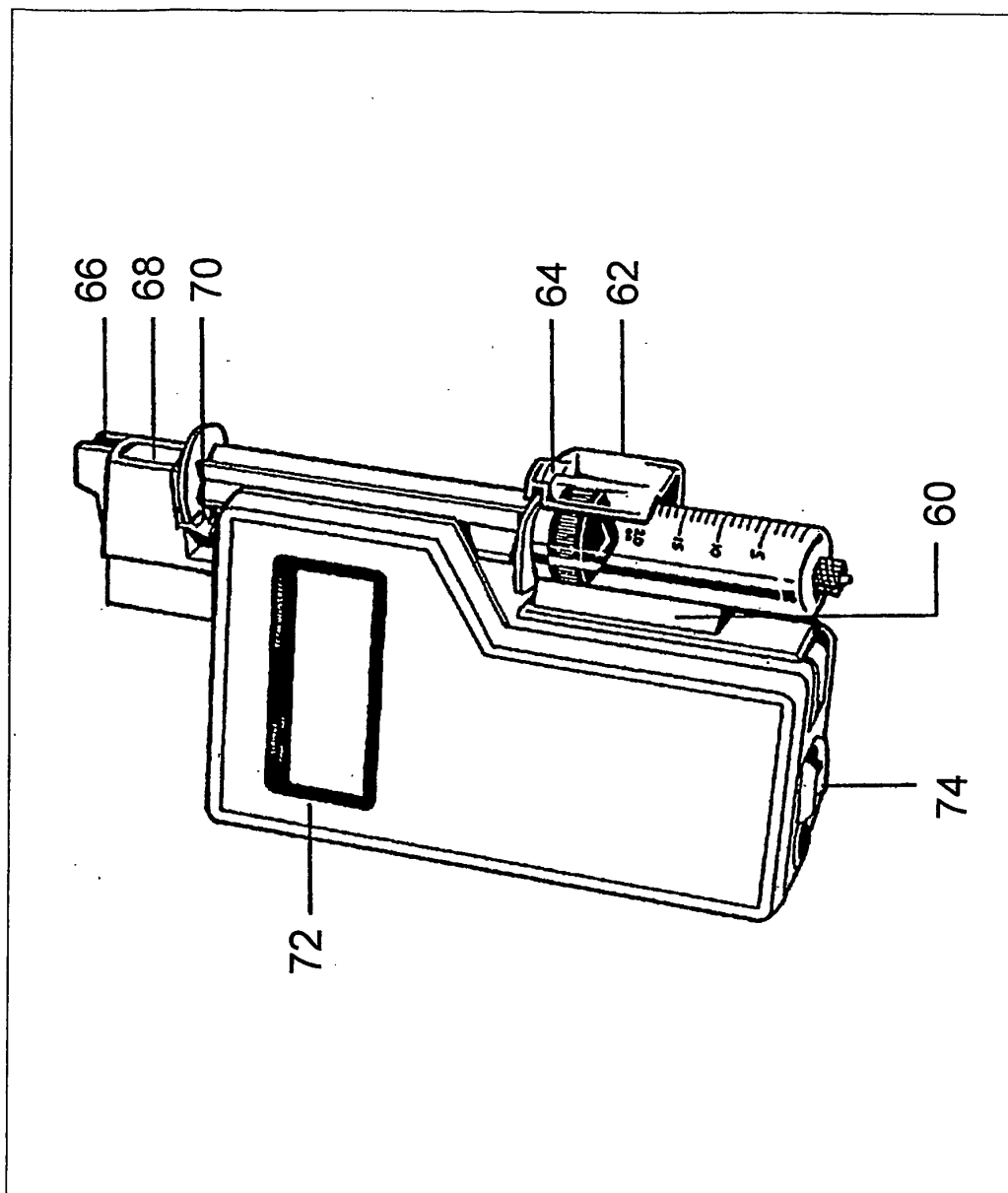


FIG. 4

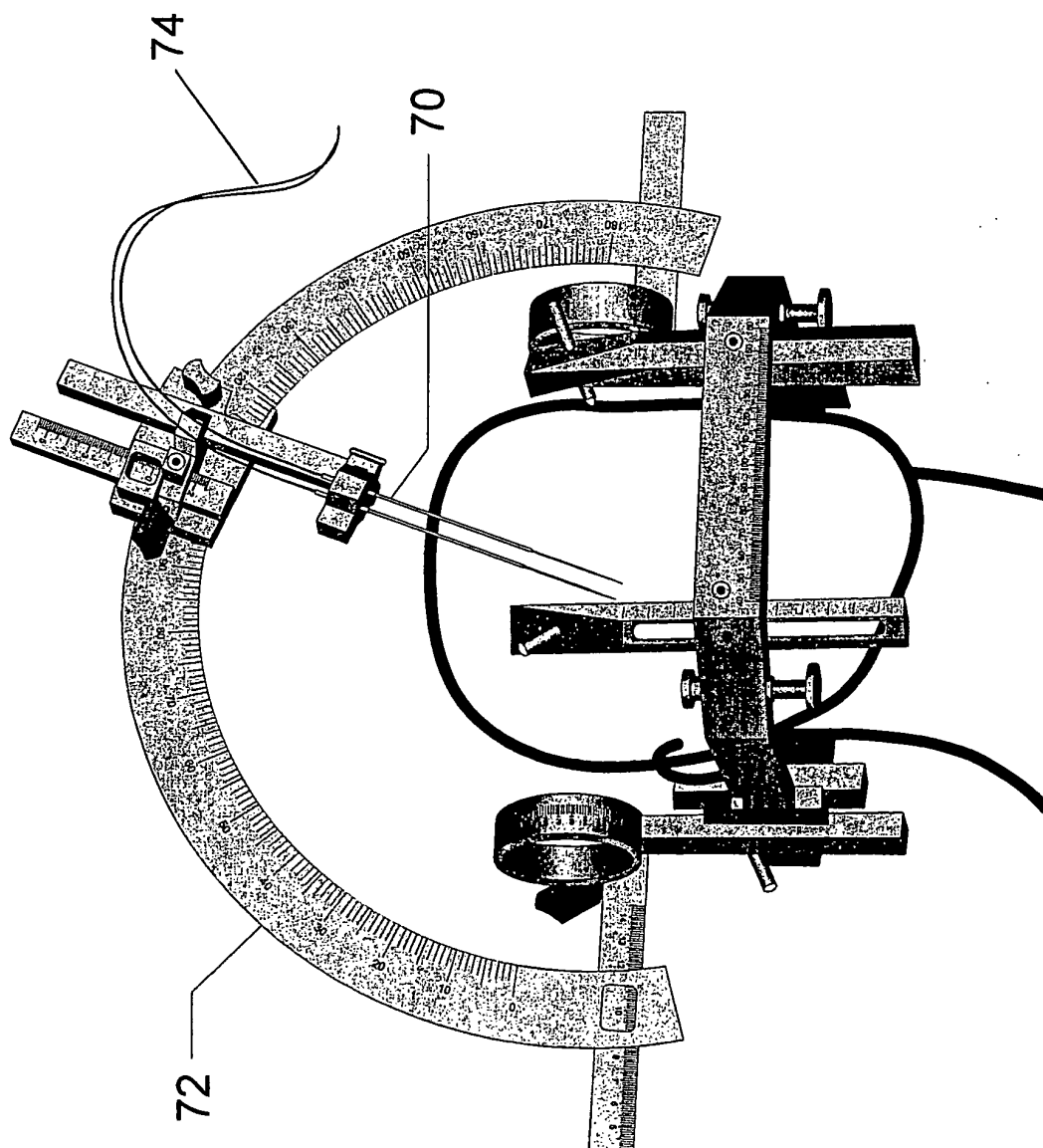


FIG. 5

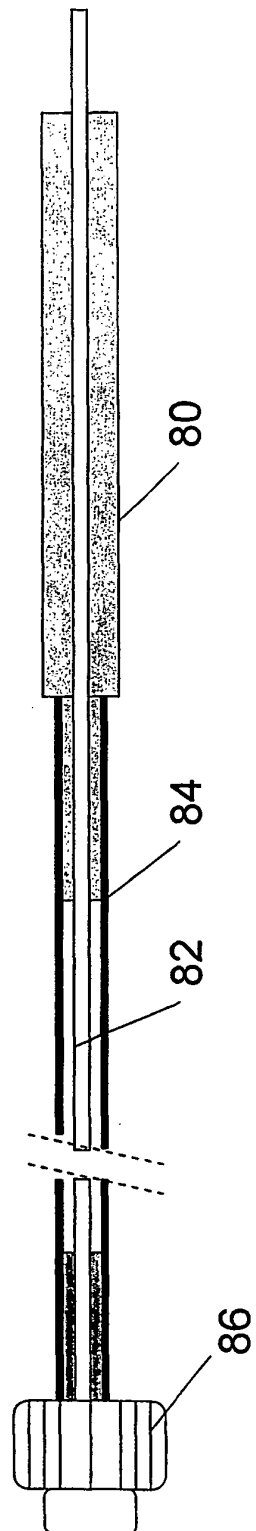


FIG. 6

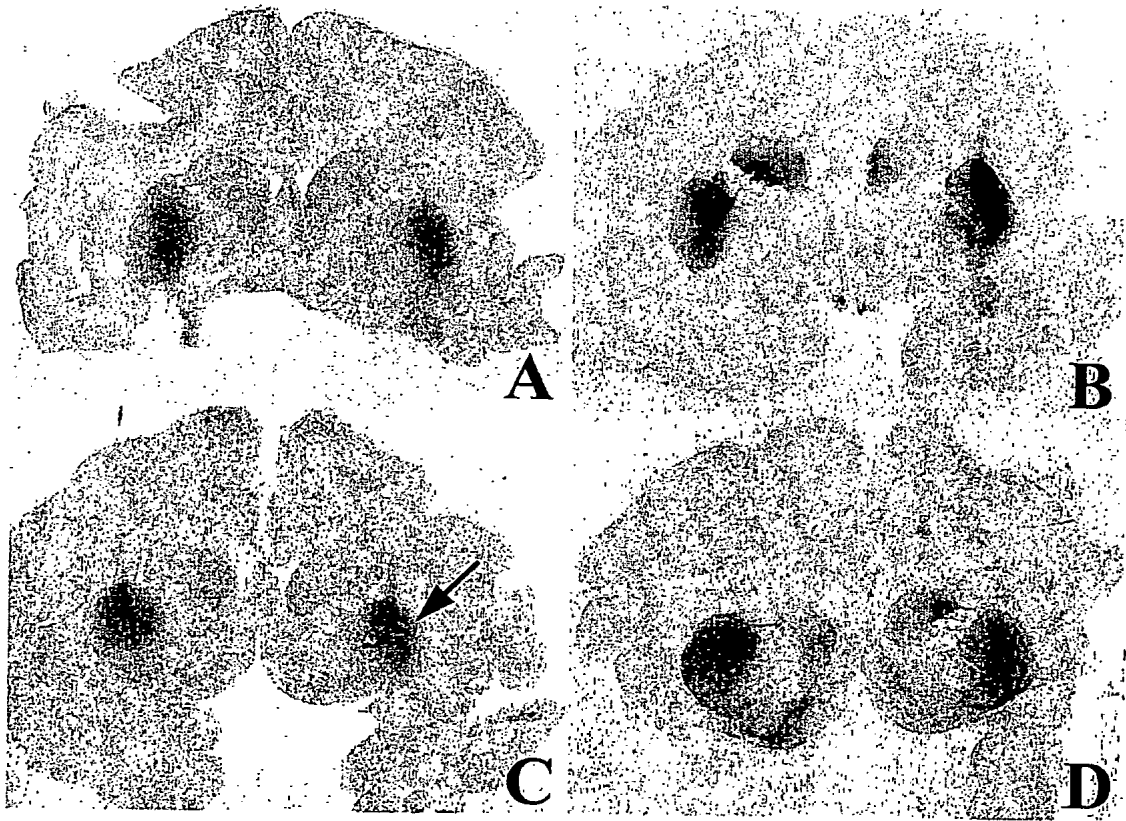


FIG. 7

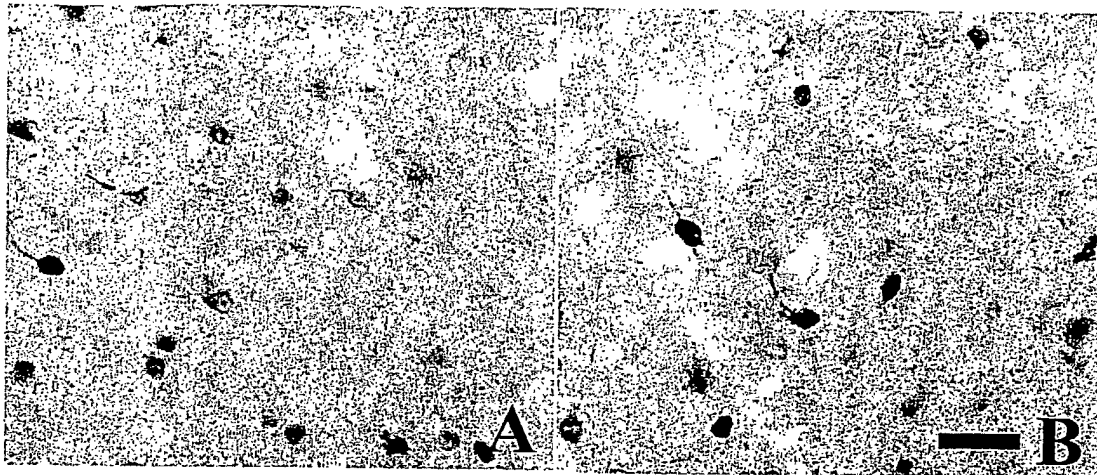


FIG. 8



FIG. 9