

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 791**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2011 E 11727743 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2575894**

54 Título: **Administración de vectores lentivirales al cerebro**

30 Prioridad:

28.04.2011 GB 201107184

12.01.2011 GB 201100502

28.05.2010 GB 201009052

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

28.05.2015

73 Titular/es:

**OXFORD BIOMEDICA (UK) LTD (100.0%)
Medawar Center Robert Robinson Avenue The
Oxford Science Park
Oxford OX4 4GA, GB**

72 Inventor/es:

**WIDDOWSON, PETER;
RALPH, SCOTT y
MITROPHANOUS, KYRIACOS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 536 791 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

Administración de vectores lentivirales al cerebro

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un vector lentiviral para la administración al cerebro para su uso en el tratamiento de una afección neurológica. El vector lentiviral se administra directamente al cerebro por infusión continua usando un dispositivo de administración de perforación estrecha con un número reducido de puntos de depósito en comparación con los métodos previos.

Antecedentes a la invención

Se conocen enfoques basados en virus para tratar diversas enfermedades neurológicas, mediante la introducción de genes terapéuticos para transducir células neuronales y/o de soporte. Por ejemplo, se ha desarrollado un producto de vector lentiviral multicistrónico, ProSavin[®], para tratar enfermedad de Parkinson. ProSavin[®] media en la producción de dopamina intraestriatal transduciendo en células de no dopamina los genes para L-aminoácido aromático descarboxilasa, tirosina hidroxilasa y GTP ciclohidrolasa 1 (Azzouz et al. (2002) J Neurosci,22: 10302-10312).

Métodos previos de administración de vectores lentivirales han introducido los vectores en regiones específicas dentro del cerebro mediante múltiples depósitos de pequeño volumen a una baja velocidad de flujo discontinua para garantizar la transducción suficiente de células diana sobre una amplia área (Azzouz et al. (2002) J Neurosci 22: 10302-10312). Por ejemplo, ProSavin[®] se administra usando múltiples tramos (hasta 5 por hemisferio) usando un método de administración escalonada que implica múltiples depósitos del vector a lo largo de cada tramo (Jarraya et al. (2009) Sci Transl Med 14: 1(2) 2-4).

Un enfoque tal requiere planificación pre-quirúrgica compleja para determinar el posicionamiento de los tramos de cánula y cirugía que requiere mucho tiempo, con un elevado riesgo de hemorragia y otras complicaciones quirúrgicas asociadas al uso de múltiples tramos de cánulas para introducir el vector.

Así, existe la necesidad de métodos de administración mejorados para tales vectores lentivirales.

Hay informes de uso de administración potenciada por convección (CED) como un método eficaz de administración de agentes terapéuticos, que incluye nanopartículas de magemita, liposomas y vectores virales pequeños, tales como vectores de virus adeno-asociados (AAV), en el cerebro (Lieberman et al. (1985) J. Neurosurg. 82:1021-1029; Bankiewicz et al. (2000) Exp. Neurol. 164:2-14; Cunningham et al. (2000) Cell Transplant 9:585-594; Nguyen et al. (2001) Neuroreport 12:1961-1964; Mamot et al. (2004) J Neurooncol. 68:1-9; Hadaczek et al. (2006) Hum. Gene Ther 17:291-302 y Perlstein et al. (2008) Neuro-Oncol 10:153-161). Usando un infundido presurizado, se ha informado que la distribución de partículas y macromoléculas a través del espacio perivascular se potencia por encima de la alcanzada por la difusión sola (Chen et al. (2004) J. Neurosurg. 101:314-322 y Hadaczek et al. (2009) Hum. Gene Ther 20:229-237).

CED usa un gradiente de presión establecida en la punta de un catéter de infusión que inicialmente crea flujo global que "empuja" el agente terapéutico a través del espacio entre las células del cerebro.

Aunque hay informes de uso satisfactorio de CED para administrar AAV pequeños (Bankiewicz et al. (2000) Exp. Neurol. 164:2-14; Cunningham et al. (2000) Cell Transplant 9:585-594; y Hadaczek et al. (2009) Hum. Gene Ther 20:229-237), estos hallazgos tienen poco impacto sobre la administración de vectores lentivirales, debido a que se ha calculado que el espacio intracelular en el cerebro es entre 38 y 64 nm (Thorne y Nicholson (2006) PNAS 104; 5567-5572), mientras que el diámetro típico de los lentivirus es aproximadamente 100 nm, normalmente aproximadamente cuatro veces mayor que los vectores de AAV (Fields Virolog, quinta edición (2007) Eds. Knipe and Howley. Lippincott Williams and Wilkins). Los vectores de AAV son virus no envueltos con un diámetro de aproximadamente 18-26 nm y son considerablemente más pequeños que el espacio intracelular calculado.

La consideración del tropismo celular (Davidson et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 97, PP. 3428-3432; Azzouz et al. (2002) J Neurosci 22:10302-10312 y Eschemacher et al. (2004) Exp Med 90:61-69) es un factor importante cuando se cambia la administración de vector, ya que dianas neuronales u otras celulares pueden comprometerse significativamente cuando los vectores se administran de una forma acelerada. Además, la respuesta inmunológica relativa a la administración de vector central también puede alterarse cuando se modifica la metodología para la administración quirúrgica en regiones del cerebro específicas.

Descripción de las figuras

Figura 1. Tinción para anti-β-galactosidasa en putamen de primate no humano tras la administración de 50 μl de suspensión del vector VAIE-LacZ usando (A) 5 tramos de aguja, administrando cada uno 10 μl en 3 puntos con una

aguja de acero inoxidable Hamilton de calibre 23 (B) una infusión única a 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ mediante una cánula de sílice fundida de calibre 28 o (C) infusión de 50 μl de tampón de formulación TSSM solo mediante una cánula de sílice fundida de calibre 28 a 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. Esta figura ilustra la diseminación medio-lateral superior y dorsoventral del vector de VAIE en el putamen tras la administración usando una infusión única (B) en comparación con el método establecido de 5 tramos de aguja (A) en el que el vector está más confinado a la proximidad del tramo de inyección. Las imágenes de gran aumento indican la morfología neuronal de las células transducidas con VAIE que es similar con ambos métodos de administración. La inyección del tampón TSSM proporciona un control negativo para la tinción histológica.

5
10
Figura 2. Estimación del volumen de distribución de vector en putamen de primate no humano usando métodos de estereología tras la administración de 50 μl de suspensión del vector VAIE-LacZ usando diferentes métodos de administración.

15
20
Los datos ilustran que la administración de vector usando una infusión única mediante una cánula de sílice fundida de calibre 28 a una velocidad de flujo constante de tanto 1 como 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ media en la distribución mejorada del vector en el putamen en comparación con el método de administración de 5 tramos usando una aguja de calibre 23 y jeringa. La mayor velocidad de flujo de 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ demostró un mayor volumen de distribución del vector con la infusión única que la tasa más lenta. La administración de vector usando una infusión única con la aguja de calibre 23 y jeringa produjeron un menor volumen de distribución del vector que ambos métodos descritos anteriormente que indica que el calibre de la aguja es crítico para conseguir una distribución del vector mejorada en el cerebro.

25
Figura 3. Fotomicrografías de bajo aumento que muestran tinción positiva para CD68 de microglía activada en secciones que recibieron 50 μl de suspensión del vector VAIE-LacZ usando (A) 5 tramos de aguja con una aguja de acero inoxidable Hamilton de calibre 23 o (B) una infusión única mediante una cánula de sílice fundida de calibre 28. Esta figura ilustra que para ambos métodos de administración la respuesta inflamatoria es local y está confinada al área del tramo de la aguja.

Resumen de aspectos de la invención

30
Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que, a pesar del tamaño de vectores lentivirales con respecto al espacio extracelular, es posible modificar el método de administración discontinuo de múltiples tramos descrito para ProSavin[®], aumentar el volumen administrado por tramo y la velocidad de flujo de infusión para vectores lentivirales que a su vez produce un mayor volumen de diseminación del vector dentro del cerebro.

35
40
Usando un vector lentiviral basado en el virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que expresa el gen indicador β -galactosidasa (VAIE-LacZ), han mostrado que una infusión única continua de este vector lentiviral genéticamente modificado se distribuye eficazmente dentro del putamen de macacos cinomolgos. Aunque la diseminación del vector en el eje rostro-caudal del putamen fue marginalmente inferior a usar el enfoque múltiple de 5 tramos de aguja previamente descrito para diseminar manualmente la distribución del vector, la distribución del vector en los ejes medio-lateral y dorso-ventral con el paradigma de una infusión única continua fue mejor que el enfoque de múltiples depósitos de 5 tramos. Además, el volumen total de distribución del vector en el cerebro fue casi 2 veces mayor con una infusión única continua en comparación con el método de múltiples depósitos de cinco tramos.

45
50
A pesar del elevado volumen y la elevada velocidad de flujo de administración, el sistema de infusión continua no produjo daño neuronal abierto en la región de diseminación del vector y ninguna evidencia de daño a la barrera hematoencefálica. Los animales no mostraron ningún signo de toxicidad mayor o respuestas inflamatorias abiertas y no se observaron signos clínicos anormales o alteraciones motoras. Esto es sorprendente, dado el tamaño relativamente grande de los vectores lentivirales. Además, hubo menos evidencia de retroflujo a lo largo de la superficie externa de la cánula de infusión del que se había observado previamente con la aguja de calibre 23 usando el enfoque de 5 tramos.

55
Esto muestra que, a diferencia de las expectativas en vista de su gran tamaño, en vez de requerir una infusión discontinua lenta (múltiples depósitos) de volúmenes pequeños, pueden “empujarse” grandes volúmenes de vectores lentivirales a través de la matriz neuronal entre las células usando convección de fluido sin causar signos obvios de daño al tejido y produciendo distribución del vector superior dentro del área diana.

60
Esto produce una reducción en el número de tramos requeridos para administrar un volumen dado de infundido. Así, el aumento de la velocidad de flujo y los elevados volúmenes que pueden administrarse reducen tanto el tiempo de cirugía como los riesgos asociados a la colocación de muchos sitios de cánula, además de permitir la administración de mayores dosis de vector lentiviral.

65
También se encontró que una cánula de calibre estrecho produjo un mejor volumen de distribución del vector que una cánula de perforación ancha. Se cree que esto es debido al reducido retroflujo con la cánula de calibre estrecho y un aumento en la presión de la cánula más estrecha que potencia la distribución del vector. El retroflujo puede ser un problema clave cuando se administra un terapéutico a presión, debido a que si se produce retroflujo, una

cantidad significativa de vector podría perderse en el tramo de cánula y no estaría disponible para la administración al área diana.

Así, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un vector lentiviral para la administración al putamen para su uso en el tratamiento de una afección neurológica, en el que una composición que comprende el vector lentiviral se administra directamente al putamen por infusión continua usando una cánula y en el que entre 10-600 μ l de la composición de vector se administran por tramo a una velocidad de flujo de al menos 2 μ l/min, y en el que el vector lentiviral se administra usando una cánula con una perforación equivalente a o más estrecha de aproximadamente 28 de calibre.

La velocidad de flujo puede ser constante o aumentar durante la infusión del vector lentiviral.

El vector puede ser un vector de virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), por ejemplo, un vector de VAIE que comprende secuencias de nucleótidos que codifican tirosina hidroxilasa, GTP-ciclohidrolasa 1 y el aminoácido aromático DOPA descarboxilasa.

El vector lentiviral puede administrarse mediante un único tramo de cánula por hemisferio.

La infusión puede tener un volumen de aproximadamente 50 μ l.

La velocidad de flujo a la que el vector se administra puede estar entre 2-6 μ l/min, por ejemplo, aproximadamente 3 μ l/min.

El vector lentiviral puede ser para tratar enfermedad de Parkinson.

En un segundo aspecto se proporciona un kit para administrar un vector lentiviral según el primer aspecto de la invención directamente al cerebro del sujeto, que comprende una o más cánulas, en el que la(s) cánula(s) tiene/n aproximadamente 28 de calibre o más estrechas, y en el que, en uso, una composición que comprende el vector lentiviral se administra directamente al putamen por infusión continua usando la cánula y en el que se administran entre 10-600 μ l de composición de vector por tramo a una velocidad de flujo de al menos 2 μ l/min.

Las cánulas pueden estar precargadas con la composición de vector lentiviral a un volumen de entre 10 y 600 μ l.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un vector lentiviral para la administración al cerebro.

Vectores lentivirales

El vector lentiviral según la presente invención puede derivarse de o puede ser derivable de cualquier lentivirus adecuado. Una partícula lentiviral recombinante puede transducir una célula diana con un nucleótido de interés (NOI). Una vez dentro de la célula, el genoma del ARN de la partícula de vector se transcribe de forma inversa en ADN y se integra en el genoma de la célula diana.

Los vectores lentivirales son parte de un grupo mayor de vectores retrovirales. Una lista detallada de lentivirus puede encontrarse en Coffin et al. (1997) "Retroviruses" Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 758-763). En resumen, los lentivirus pueden dividirse en grupos de primate y no de primate. Ejemplos de lentivirus de primate incluyen, pero no se limitan a: el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causante del síndrome de autoinmunodeficiencia humana (SIDA) y el virus de la inmunodeficiencia simia (VIS). El grupo lentiviral no de primate incluye el prototipo "virus lento" virus de Visna/Maedi (VVM), además del virus de la artritis-encefalitis caprina (VAEC) relacionado, virus de la anemia infecciosa equina (VAIE) y los más recientemente descritos el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) y el virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB).

Los lentivirus se diferencian de otros miembros de la familia de los retrovirus en que los lentivirus tienen la capacidad para infectar tanto células en división como no en división (Lewis et al. (1992) EMBO J 11(8):3053-3058) y Lewis y Emerman (1994) J Virol 68 (1):510-516). A diferencia, otros retrovirus - tales como el VLM - son incapaces de infectar células no en división o lentamente en división tales como aquellas que constituyen, por ejemplo, tejido de músculo, cerebro, pulmón e hígado.

Un vector lentiviral, como se usa en el presente documento, es un vector que comprende al menos una parte componente derivable de un lentivirus. Preferentemente, esa parte componente participa en los mecanismos biológicos por los que el vector infecta células, expresa genes o se replica.

La estructura básica de los genomas del retrovirus y lentivirus comparten muchas características comunes tales como una LTR en 5' y una LTR en 3', entre o dentro de las cuales que se localizan una señal de encapsidación para permitir que el genoma se encapside, un primer sitio de unión, sitios de integración para permitir la integración en un

genoma de la célula huésped y genes *gag*, *pol* y *env* que codifican los componentes de encapsidación - estos son polipéptidos requeridos para el ensamblaje de partículas virales. Los lentivirus tienen características adicionales, tales como secuencias *rev* y RRE en VIH, que permiten la exportación eficaz de transcritos de ARN del provirus integrado del núcleo al citoplasma de una célula diana infectada.

5 En el provirus, los genes virales están flanqueados en ambos extremos por regiones llamadas repeticiones terminales largas (LTR). Las LTR son responsables de la integración proviral, y transcripción. Las LTR también sirven de secuencias potenciadoras-promotoras y pueden controlar la expresión de los genes virales.

10 Las propias LTR son secuencias idénticas que pueden dividirse en tres elementos, que se llaman U3, R y U5. U3 se deriva de la secuencia única para el extremo de 3' del ARN. R se deriva de una secuencia repetida en ambos extremos del ARN y U5 se deriva de la secuencia única para el extremo 5' del ARN. Los tamaños de los tres elementos pueden variar considerablemente entre virus diferentes.

15 En un genoma de vector lentiviral defectuoso, *gag*, *pol* y *env* pueden estar ausentes o ser no funcionales. Las regiones R en ambos extremos del ARN son secuencias repetidas. U5 y U3 representan secuencias únicas en los extremos 5' y 3' del genoma del ARN, respectivamente.

20 En un vector lentiviral típico de la presente invención, al menos parte de una o más regiones codificantes de proteínas esenciales para la replicación puede eliminarse del virus. Esto hace que el vector viral sea defectuoso en la replicación. También pueden sustituirse porciones del genoma viral por un NOI con el fin de generar un vector que comprenda un NOI que puede transducir una célula huésped no en división diana y/o integrar su genoma en un genoma del huésped.

25 En una realización, los vectores lentivirales son vectores no integrantes como se describe en el documento WO 2007/071994.

30 En otra realización, los vectores tienen la capacidad de administrar una secuencia que está libre o que carece de ARN viral. En otra realización, un dominio de unión heterólogo (heterólogo a *gag*) localizado sobre el ARN va a administrarse y puede usarse un dominio de unión relacionado sobre *gag* o *pol* para garantizar la encapsidación del ARN que va a administrarse. Ambos de estos vectores se describen en el documento WO 2007/072056.

35 El vector lentiviral puede ser un vector "no de primate", es decir, derivado de un virus que no infecta principalmente primates, especialmente seres humanos.

40 Los ejemplos de lentivirus no de primate pueden ser cualquier miembro de la familia de lentiviridae que no infecta naturalmente un primate y pueden incluir un virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), un virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB), un virus de la artritis-encefalitis caprina (VAEC), un virus de Maedi-Visna (VMV) o un virus de la anemia infecciosa equina (VAIE).

45 En una realización particularmente preferida, el vector viral se deriva de VAIE. El VAIE tiene la estructura genómica más simple de los lentivirus y se prefiere particularmente para su uso en la presente invención. Además de los genes *gag*, *pol* y *env*, VAIE codifica otros tres genes: *tat*, *rev* y *S2*. *Tat* actúa de un activador de la transcripción de la LTR viral (Derse y Newbold (1993) *Virology* 194(2):530-536 y Maury et al. (1994) *Virology* 200(2):632-642) y *Rev* regula y coordina la expresión de genes virales mediante elementos de respuesta a *rev* (RRE) (Martarano et al. (1994) *J Virol* 68(5):3102-3111). Se cree que los mecanismos de acción de estas dos proteínas son ampliamente similares a los mecanismos análogos en los virus de primate (Martarano et al. (1994) *J Virol* 68(5):3102-3111). La función de *S2* es desconocida. Además, se ha identificado una proteína de VAIE, Ttm, que está codificada por el primer exón de *tat* cortado y empalmado con la secuencia codificante de *env* al inicio de la proteína transmembrana.

50 Vectores preferidos de la presente invención son vectores lentivirales recombinantes.

55 El término "vector lentiviral recombinante" se refiere a un vector con información genética lentiviral suficiente para permitir la encapsidación de un genoma de ARN, en presencia de componentes de encapsidación, en una partícula viral que puede infectar una célula diana. La infección de la célula diana puede incluir transcripción inversa e integración en el genoma de la célula diana. El vector lentiviral recombinante lleva secuencias codificantes no virales que van a administrarse por el vector a la célula diana. Un vector lentiviral recombinante es incapaz de replicación independiente para producir partículas lentivirales infecciosas dentro de la célula diana final. Normalmente, el vector lentiviral recombinante carece de un gen *gag-pol* y/o *env* funcional y/u otros genes esenciales para la replicación. El vector de la presente invención puede configurarse como un vector de intrón fraccionado. Un vector de intrón fraccionado se describe en la solicitud de patente PCT WO 99/15683.

60 Preferentemente, el vector lentiviral recombinante de la presente invención tiene un genoma viral mínimo.

65 Como se usa en el presente documento, el término "genoma viral mínimo" significa que el vector viral se ha manipulado para eliminar los elementos no esenciales y para retener los elementos esenciales con el fin de

proporcionar la funcionalidad requerida para infectar, transducir y administrar una secuencia de nucleótidos de interés a una célula huésped diana. Más detalles de esta estrategia pueden encontrarse en el documento de los presentes inventores WO 98/17815.

5 En una realización de la presente invención, el vector es un vector auto-inactivante.

A modo de ejemplo, se han construido vectores retrovirales auto-inactivantes delecionando los potenciadores transcripcionales o los potenciadores y promotor en la región U3 de LTR en 3'. Después de una ronda de transcripción inversa e integración del vector, estos cambios se copian en ambas de las LTR en 5' y 3' que producen un provirus transcripcionalmente inactivo (Yu et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83:3194-3198; Dougherty y Temin et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:1197-1201; Hawley (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:2406-2410 y Yee et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:9564-9568). Sin embargo, cualquier promotor interno a las LTR en tales vectores será todavía transcripcionalmente activo. Esta estrategia se ha empleado para eliminar efectos de los potenciadores y promotores en las LTR virales sobre la transcripción de genes internamente dispuestos. Tales efectos incluyen elevada transcripción (Jolly et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:1855-1872) o supresión de la transcripción (Emerman y Temin (1984) Cell 39:449-467). Esta estrategia también puede usarse para eliminar la transcripción en la dirección 3' de LTR en 3' en ADN genómico (Herman y Coffin (1987) Science 236:845-848). Esto es de especial preocupación en la terapia génica humana en la que es de importancia crítica para prevenir la activación accidental de un oncógeno endógeno.

Sin embargo, el vector plasmídico usado para producir el genoma viral dentro de una célula huésped/ célula de encapsidación también incluirá secuencias de control reguladoras de la transcripción operativamente ligadas al genoma lentiviral para dirigir la transcripción del genoma en una célula huésped/ célula de encapsidación. Estas secuencias reguladoras pueden ser las secuencias naturales asociadas a la secuencia lentiviral transcrita, es decir, la región U3 en 5', o pueden ser un promotor heterólogo tal como otro promotor viral, por ejemplo, un promotor del CMV. Algunos genomas lentivirales requieren secuencias adicionales para la producción eficaz de virus. Por ejemplo, en el caso del VIH, la secuencia de *rev* y RRE están preferentemente incluidas. Sin embargo, el requisito de *rev* y RRE puede reducirse o eliminarse por optimización de codones. Más detalles de esta estrategia pueden encontrarse en el documento WO 01/79518. También se conocen secuencias alternativas que realizan la misma función que el sistema *rev*/RRE. Por ejemplo, un análogo funcional del sistema *rev*/RRE se encuentra en el virus del mono Mason Pfizer. Esto se conoce como el elemento de transporte constitutivo (CTE) y comprende una secuencia tipo RRE en el genoma que se cree que interacciona con un factor en la célula infectada. El factor celular puede entenderse como un análogo de *rev*. Así, puede usarse CTE como una alternativa al sistema *rev*/RRE. Cualquier otro equivalente funcional que sea conocido o esté disponible puede ser relevante para la invención. Por ejemplo, también se sabe que la proteína Rex de HTLV-I puede sustituir funcionalmente a la proteína Rev del VIH-1. También se sabe que Rev y Rex tienen efectos similares a IRE-BP.

En una realización particularmente preferida, el vector lentiviral según la presente invención consiste en un vector lentiviral mínimo auto-inactivante derivado del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que preferentemente codifica tres enzimas que participan en la ruta sintética de la dopamina. Las proteínas codificadas por un vector tal pueden comprender una forma truncada del gen tirosina hidroxilasa (TH*) humana (que carece de 160 aminoácidos del extremo N que participan en la regulación de la retroalimentación de TH), el gen humano L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) y GTP-ciclohidrolasa 1 (GTP-CH1). El vector puede producirse por la transfección transitoria de células (por ejemplo, células HEK293T) con tres plásmidos, que codifican: (1) el genoma del vector del VAIE recombinante ProSavin® (Oxford BioMedica plc, Oxford UK) (pONYK1-ORT, documento WO 02/29065 y Farley et al. (2007) J. Gen. Med. 9:345-356); (2) el vector de expresión *gag/pol* de VAIE sintético (pESGPK, documentos WO 01/79518 y WO 05/29065) y (3) el vector de expresión de la envuelta del VEV-G (pHGK)

Secuencia de encapsidación

Como se utiliza dentro del contexto de la presente invención, el término "señal de encapsidación", que se denomina indistintamente "secuencia de encapsidación" o "psi", se usa en referencia a la secuencia que actúa en cis no codificante requerida para la encapsidación de hebras de ARN lentiviral durante la formación de partículas virales. En VIH-1, esta secuencia se ha mapeado en los sitios que se extienden en la dirección 5' desde el sitio donante de corte y empalme principal (SD) hasta al menos el codón de iniciación de gag.

Como se usa en el presente documento, el término "señal de encapsidación extendida" o "secuencia de encapsidación extendida" se refiere al uso de secuencias alrededor de la secuencia psi con extensión adicional en el gen gag. La inclusión de estas secuencias de encapsidación adicionales puede aumentar la eficiencia de inserción del ARN de vector en partículas virales.

Pseudotipado

Preferentemente, el vector lentiviral según la presente invención se ha pseudotipado. A este respecto, el pseudotipado puede conferir una o más ventajas. Por ejemplo, con los vectores lentivirales, el producto del gen *env* en los vectores basados en el VIH limitaría estos vectores a infectar solo células que expresan una proteína llamada

CD4. Pero si el gen *env* en estos vectores se ha sustituido con secuencias de *env* de otros virus de ARN, entonces puede tener un espectro infeccioso más amplio (Verma y Somia (1997) Nature 389(6648):239-242). A modo de ejemplo, Miller et al. pseudotiparon un vector MoMLV con la envuelta del retrovirus anfitriónico 4070A (Mol. Cell. Biol. 5:431-437), otros colaboradores han pseudotipado un vector lentiviral basado en el VIH con la glucoproteína del VEV (Verma y Somia (1997) Nature 389(6648):239-242).

En otra alternativa, la proteína Env puede ser una proteína Env modificada tal como una proteína Env mutante o manipulada. Las modificaciones pueden hacerse o seleccionarse para introducir la capacidad de elección de diana o para reducir la toxicidad o para otro fin (Marin et al. (1996) J Virol 70(5):2957-2962; Nilson et al. (1996) Gene Ther 3(4):280-286; y Fielding et al. (1998) Blood 91(5):1802-1809 y referencias citadas en su interior).

El vector puede pseudotiparse, por ejemplo, con un gen que codifica al menos parte de la proteína G de la rabia o la proteína VEV-G.

VEV-G:

La proteína de la envuelta (G) del virus de la estomatitis vesicular (VEV), un rhabdovirus, es una proteína de la envuelta que se ha mostrado que es capaz de pseudotipar ciertos retrovirus que incluyen lentivirus.

Su capacidad para pseudotipar vectores retrovirales basados en MoMLV en ausencia de cualquier retroproteína de la envuelta vírica se mostró por primera vez por Emi y col. (1991) J. Virol. 65:1202-1207. El documento WO 94/294440 enseña que los vectores retrovirales pueden pseudotiparse satisfactoriamente con VEV-G. Estos vectores de VEV-G pseudotipados pueden usarse para transducir una amplia variedad de células de mamífero. Más recientemente, Abe et al. (1998) J. Virol 72(8): 6356-6361 enseñan que las partículas retrovirales no infecciosas pueden hacerse infecciosas mediante la adición de VEV-G.

Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037 pseudotiparon satisfactoriamente el retrovirus VLM con VEV-G y esto produjo un vector que tenía un intervalo de huéspedes alterado en comparación con el VLM en su forma nativa. Se ha mostrado que los vectores pseudotipados con VEV-G infectan no solo células de mamífero, sino también líneas celulares derivadas de peces, reptiles e insectos (Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037). También han mostrado que es más eficaz que las envueltas anfitriónicas tradicionales para una variedad de líneas celulares (Yee y col. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9564-9568 y Emi et al. (1991) J. Virol. 65:1202-1207). La proteína del VEV-G también puede usarse para pseudotipar ciertos lentivirus y retrovirus debido a que su cola citoplásmica puede interactuar con los núcleos retrovirales.

La provisión de una envuelta de pseudotipado no lentiviral tal como la proteína VEV-G proporciona la ventaja de que las partículas de vector pueden concentrarse a un alto título sin pérdida de infectividad (Akina et al. (1996) J. Virol. 70:2581-2585). Las proteínas de la envuelta de lentivirus y retrovirus son evidentemente incapaces de resistir a las fuerzas de cizallamiento durante la ultracentrifugación, probablemente debido a que consisten en dos subunidades no covalentemente ligadas. La interacción entre las subunidades puede romperse por la centrifugación. En comparación, la glucoproteína del VEV está compuesta por una única unidad. Por tanto, el pseudotipado de la proteína del VEV-G puede ofrecer posibles ventajas.

El documento WO 00/52188 describe la generación de vectores retrovirales y lentivirales pseudotipados, de líneas celulares productoras estables, que tienen la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VEV-G) como proteína de la envuelta viral asociada a la membrana, y proporciona una secuencia de gen para la proteína del VEV-G.

Virus del río Ross

Se ha usado la envuelta viral del río Ross para pseudotipar un vector lentiviral no de primate (VIF) y tras la administración sistémica transdujo predominantemente el hígado (Kang et al. (2002) J Virol 76(18):9378-9388). Se informó que la eficiencia era 20 veces superior a la obtenida con el vector pseudotipado por VEV-G, y provocó menos citotoxicidad como se mide por niveles en suero de enzimas del hígado sugerentes de hepatotoxicidad.

El virus del río Ross (VRR) es un alfavirus propagado por mosquitos que es endémico y epidémico en regiones tropicales y templadas de Australia. Las tasas de anticuerpo en las poblaciones normales en la zona costera templada tienden a ser bajas (6 % al 15 %), aunque la sero-prevalencia alcanza del 27 al 37 % en las planicies del sistema del río del valle de Murray. De 1979 a 1980, el virus del río Ross se volvió endémico en las islas del Pacífico. La enfermedad no es contagiosa entre seres humanos y nunca es mortal, siendo el primer síntoma el dolor de articulaciones con fatiga y letargo en aproximadamente la mitad de los pacientes (Fields Virology, quinta edición (2007) Eds. Knipe y Howley. Lippincott Williams and Wilkins).

Baculovirus GP64

Se ha mostrado que la proteína del baculovirus GP64 es una alternativa atractiva a VEV-G para vectores virales usados en la producción a gran escala del virus de título alto requerido para aplicaciones clínicas y comerciales

(Kumar M, Bradow BP, Zimmerberg J (2003) Hum. Gene Ther. 14(1):67-77). En comparación con los vectores pseudotipados con VEV-G, los vectores pseudotipados con GP64 tienen un amplio tropismo similar y títulos nativos similares. Debido a que la expresión de GP64 no destruye células, pueden generarse líneas celulares basadas en 293T que expresan constitutivamente GP64.

5 *G de la rabia*

En la presente invención, el vector puede pseudotiparse con al menos una parte de una proteína G de la rabia o un mutante, variante, homólogo o fragmento de la misma.

10 Las enseñanzas sobre la proteína G de la rabia, además de mutantes de la misma, pueden encontrarse en el documento WO 99/61639 y también en Rose et al. (1982) J. Virol. 43:361-364, Hanham et al. (1993) J. Virol. 67:530-542; Tuffereau et al. (1998) J. Virol. 72:1085-1091, Kucera et al. (1985) J. Virol. 55:158-162; Dietzschold et al. (1983) PNAS 80:70-74; Seif et al. (1985) J. Virol. 53:926-934; Coulon et al. (1998) J. Virol. 72:273-278; Tuffereau et al. (1998) J. Virol. 72:1085-10910; Burger et al. (1991) J. Gen. Virol. 72:359-367; Gaudin et al. (1995) J. Virol. 69:5528-5534; Benmansour et al. (1991) J. Virol. 65:4198-4203; Luo et al. (1998) Microbiol. Immunol. 42:187-193; Coll (1997) Arch. Virol. 142:2089-2097; Luo et al. (1997) Virus Res. 51:35-41; Luo et al. (1998) Microbiol. Immunol. 42:187-193; Coll (1995) Arch. Virol. 140:827-851; Tuchiya et al. (1992) Virus Res. 25:1-13; Morimoto et al. (1992) Virology 189:203-216; Gaudin et al. (1992) Virology 187:627-632; Whitt et al. (1991) Virology 185:681-688; Dietzschold et al. (1978) J. Gen. Virol. 40:131-139; Dietzschold et al. (1978) Dev. Biol. Stand. 40:45-55; Dietzschold et al. (1977) J. Virol. 23:286-293 y Otvos et al. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1224:68-76. También se describe una proteína G de la rabia en el documento EP 0445625.

25 *Envueltas alternativas*

Otras envueltas que pueden usarse para pseudotipar vectores lentivirales incluyen Mokola, Ébola, 4070A y VCML (virus de la coriomeningitis linfocítica).

30 Se han propuesto vectores retrovirales y lentivirales como sistema de administración para la transferencia de un nucleótido de interés (NOI) *in vivo* a uno o más sitios de interés.

Los productos de expresión codificados por los NOI pueden ser proteínas que son secretadas de la célula. Alternativamente, los productos de expresión de NOI no son secretados y son activos dentro de la célula.

35 El o cada NOI puede ser profilácticamente, terapéuticamente y/o diagnósticamente relevante para un trastorno neurológico. NOI adecuados incluyen, pero no se limitan a: secuencias que codifican enzimas, citocinas, quimiocinas, hormonas, anticuerpos, moléculas antioxidantes, moléculas similares a inmunoglobulina manipuladas, un anticuerpo monocatenario, proteínas de fusión, moléculas co-estimulantes inmunitarias, moléculas inmunomoduladoras, ARN antisentido, microARN, ARNhp, ARNip, ribozimas, un mutante negativo de transdominio de una proteína diana, una toxina, una toxina condicional, un antígeno, una proteína supresora de tumores y factores de crecimiento, proteínas de la membrana, proteínas vasoactivas y péptidos, proteínas antivirales y ribozimas, y derivados de los mismos (tales como con un grupo indicador asociado). Los NOI también pueden codificar enzimas activantes de pro-fármacos.

45 En la presente invención, los NOI pueden ser, por ejemplo, una secuencia de ARN/ADN sintética, una secuencia de ARN/ADN recombinante (es decir, preparada usando técnicas de ADN recombinante), una secuencia de ADNc o una secuencia de ADN genómica parcial.

50 El NOI puede ser útil en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, por ejemplo, enfermedad de Parkinson.

El NOI puede codificar una enzima o enzimas que participan en la síntesis o almacenamiento de dopamina. Por ejemplo, la enzima puede ser una o más de las siguientes: tirosina hidroxilasa (TH), GTP-ciclohidrolasa 1 (GTP-CH1) y/o el aminoácido aromático Dopa descarboxilasa (AADC). Están disponibles las secuencias de los tres genes: números de acceso X05290, U19523 y M76180, respectivamente.

55 Alternativamente, los NOI pueden codificar el transportador 2 de monoamina vesicular (VMAT2, número de acceso L23205.1). El genoma viral puede comprender un NOI que codifica AADC y un NOI que codifica VMA 2. Un genoma tal puede usarse en el tratamiento de enfermedad de Parkinson, en particular conjuntamente con la administración periférica de L-DOPA.

60 Alternativamente, el NOI puede codificar un factor de crecimiento que puede bloquear o inhibir la degeneración en el sistema nigroestriatal o que previene la muerte de neuronas positivas para TH, o que estimula la regeneración y recuperación funcional. Por ejemplo, los NOI pueden codificar factor neurotrófico derivado de líneas de células de la glía (GDNF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento de persefina, factor de crecimiento de artemina, o factor de crecimiento de neurturina, factor neurotrófico ciliar (CNTF), neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4 (NT-4), neurotrofina pantrópica, factor de crecimiento de

fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), interleucina-1 beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor 2 de crecimiento de insulina, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C/VEGF-2, VEGF-D, VEGF-E, PDGF-A, PDGF-B, hetero- y homo-dímeros de PDGF-A y PDGF-B, y otros factores neurotróficos relacionados o sin relacionar. El vector lentiviral puede comprender uno o más de estos NOI que codifican factores neurotróficos.

El NOI puede también codificar una proteína antiangiogénica o proteínas antiangiogénicas seleccionadas del grupo que consiste en angiostatina, endostatina; factor 4 de plaquetas, factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF), restina, interferón-alfa, proteína inducible por interferón, gro-beta y tubedown-1, interleucina (IL)-1, IL-12, ácido retinoico, anticuerpos anti-VEGF, aptámeros, oligonucleótidos antisentido, ARNip, trombospondina, proteínas del receptor de VEGF tales como aquellas descritas en los documentos US 5.952.199 y US 6.100.071, y anticuerpos anti-receptor de VEGF.

El NOI puede codificar toda o parte de la proteína de interés ("POI"), o un mutante, homólogo o variante de la misma. Por ejemplo, el NOI puede codificar un fragmento de la POI que puede funcionar *in vivo* en una forma análoga a la proteína natural.

Uno de los NOI puede comprender una forma truncada del gen TH, que carece del dominio regulador. Un NOI tal evita la inhibición de la retroalimentación por dopamina que puede limitar la expresión de la enzima de longitud completa.

El término "mutante" incluye POI que incluyen una o más variaciones de aminoácidos de la secuencia no mutada. Por ejemplo, un mutante puede comprender una o más adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. Un mutante puede producirse naturalmente, o puede crearse artificialmente (por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio).

Aquí, el término "homólogo" significa una entidad que tiene una cierta homología con el NOI, o que codifica una proteína que tiene un grado de homología con la POI. Aquí, el término "homología" puede equipararse a "identidad".

En el presente contexto, una secuencia homóloga puede ser al menos el 75, 85 o el 90 % idéntica, o al menos el 95 o el 98 % idéntica, a la secuencia objeto al nivel de aminoácido o nucleótido. Normalmente, los homólogos comprenderán o codificarán los mismos sitios activos, etc., que la secuencia objeto.

Pueden usarse varios NOI en combinación. Si el vector lentiviral comprende dos o más NOI, con el fin de que se expresen ambos NOI, puede haber dos o más unidades de transcripción dentro del genoma del vector, una para cada NOI. Sin embargo, es evidente de la bibliografía que los vectores retrovirales alcanzan los mayores títulos y las propiedades de expresión génica más potentes si se mantienen genéticamente simples, de manera que es preferible usar uno o más sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) para iniciar la traducción de la segunda (y posteriores) secuencia(s) codificante(s) en un mensajero poli-cistrónico (Adam et al. 1991 J. Virol. 65:4985). Un ejemplo de tales vectores se describe en el documento WO 02/29605.

Composición farmacéutica

El vector lentiviral de la presente invención puede proporcionarse en forma de una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede usarse para tratar un individuo por terapia génica, en la que la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del vector lentiviral.

La preparación viral puede concentrarse por ultracentrifugación. El documento WO 2009/153563 describe métodos para el procesamiento en la dirección 3' de vectores lentivirales. La composición farmacéutica resultante puede tener al menos 10⁷ U.T./ml, por ejemplo, de 10⁷ a 10⁹ U.T./ml, o al menos 10⁹ U.T./ml (el título se expresa en unidades de transducción por ml (U.T./ml) como se valora en un patrón D17 de líneas celulares HEK293T).

La composición farmacéutica puede usarse para tratar un ser humano o animal, por ejemplo, un sujeto animal primate o un sujeto animal de compañía.

La composición puede comprender opcionalmente un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como (o además del) vehículo, excipiente o diluyente cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento, agente solubilizante adecuado y otros agentes de vehículo que pueden ayudar o aumentar la entrada viral en el sitio diana (tal como, por ejemplo, un sistema de administración de lípidos).

Enfermedades

El vector lentiviral usado en la presente invención es para su uso en el tratamiento de una afección neurológica. Por ejemplo, el vector puede ser útil para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas.

Enfermedades que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a: enfermedad de Parkinson; esclerosis lateral
 5 amiotrófica (enfermedad de las neuronas motoras); enfermedad de Huntington y trastornos del movimiento, tales
 como ataxia de Friedreich, ataxia cerebelosa, distonías, trastornos del movimiento repetitivos, síndrome de las
 piernas inquietas, temblor y mioclonos; enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Pick; accidente cerebrovascular;
 epilepsia focal y generalizada o idiopática; dolor crónico, que incluye parestesias, dolor de espalda y neuropatía
 10 diabética; tumores cerebrales; síndrome de fatiga crónica; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) y CJD de
 variante; leucodistrofias, que incluyen enfermedad de Tay-Sachs y enfermedad de Wilson; cambios en la presión
 intracraneal; cefaleas en brotes y migraña; esclerosis múltiple; trastornos crónicos de la alimentación que incluyen
 trastorno de Prader-Willi; esquizofrenia; trastornos afectivos; manía y trastornos del sueño que incluyen apnea del
 sueño.

En particular, la presente invención es útil en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Parkinson.

15 Es probable que el tratamiento por terapia génica con vectores que pueden administrar, por ejemplo, TH, GTP-CH1
 y opcionalmente AADC o AADC y VMAT2 sea particularmente útil para las etapas avanzadas de pacientes con EP
 que no responden significativamente al tratamiento con L-dopa. También puede ser útil el tratamiento usando AADC
 o AADC y VMAT2, en combinación con L-dopa administrada periféricamente para pacientes con EA de etapa
 20 avanzada.

Administración

El vector lentiviral usado en la presente invención se administra al cerebro mediante inyección en el putamen
 caudado.

25 El vector puede administrarse mediante uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más tramos por hemisferio.

El término cánula como se usa en el presente documento debe incluir cánulas, catéteres, aguja o cualquier otro
 dispositivo adecuado para la administración de terapéuticos directamente al cerebro. Los documentos WO
 30 2008/100930, WO 2008/144585 y WO 2009/101397 describen aquellas cánulas que podrían usarse.

En un sistema de administración previamente descrito para un vector lentiviral (Jarraya et al. (2009) Sci Transl Med
 14: 1(2) 2-4), la composición de vector se administró en una forma discontinua o "puntual", administrando una
 35 alícuota (4 µl) en el fondo del tramo, sacando la aguja un poco, luego administrando una segunda alícuota (3 µl) y
 sacando la aguja un poco más (segunda vez); a continuación administrando una tercera alícuota (3 µl); así las
 alícuotas se habían depositado en 3 puntos a lo largo de cada tramo de aguja administrando un total de 10 µl.

Desventajas asociadas a este sistema incluyen el hecho de que es muy lento y requiere mucho trabajo, y que, como
 40 hay 5 tramos de aguja por hemisferio con 3 sitios de administración por tramo, hay quince posibles sitios para daño
 e inflamación del tejido en cada hemisferio. Debido a esto, no es posible aumentar la dosis de vector administrado a
 cada hemisferio usando este método de administración de vector ya que aumentaría el tiempo de cirugía
 significativamente.

En el método descrito en el presente documento, el vector puede administrarse en un punto de depósito para cada
 45 tramo y pueden administrarse volúmenes más grandes mediante cada tramo. En el método descrito en el presente
 documento, la composición de vector se infunde continuamente. La administración continua en un punto único vence
 las desventajas mencionadas anteriormente a propósito del sistema previo. Usando este método, pueden
 administrarse mayores dosis de vector a cada hemisferio dentro de un tiempo de cirugía práctico.

50 El término "infusión continua" significa que la infusión de la composición de vector no se detiene y la aguja no se
 mueve durante la administración. Para una cánula dada, el volumen entero de la composición de vector que va a
 administrarse se administra en un único punto de depósito y en un "bolo".

Durante la infusión continua, la velocidad de flujo de la composición de vector puede ser sustancialmente constante,
 55 aumentarse gradualmente o aumentarse de un modo escalonado.

Administración "directamente al cerebro" significa que el vector lentiviral se administra directamente al tejido cerebral
 usando un procedimiento invasivo tal como inyección. El vector lentiviral puede administrarse al putamen, por
 ejemplo, el putamen motor.

60 Durante la administración, el volumen de vector lentiviral administrado mediante cada tramo de cánula puede ser 10-
 600 µl, o pueden administrarse aproximadamente 40-200 µl por tramo. Pueden usarse uno a seis tramos para cada
 hemisferio.

El vector puede administrarse usando una cánula de perforación suficientemente estrecha para prevenir el retroflujo sustancial de la composición de vector. Por ejemplo, la cánula puede ser de una perforación tal que menos del 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de la composición de vector fluya de nuevo a la aguja durante o después de la administración.

5 El vector puede administrarse usando una cánula que tiene una salida igual o más estrecha en diámetro de aproximadamente 28 de calibre. El dispositivo puede tener una salida superior a 33 de calibre.

El diámetro interno de la cánula puede ser inferior a 0,25, 0,2 ó 0,15 mm.

10 En el presente documento se describe un método para mejorar la distribución de un vector lentiviral en los ejes medio-lateral y dorso-ventral del putamen cuando se administra directamente al cerebro de un sujeto, administrando el vector lentiviral usando una infusión continua para cada tramo de cánula.

15 La adaptación de un método existente con el fin de mejorar la distribución del vector lentiviral en los ejes medio-lateral y dorso-ventral del putamen y para permitir el aumento de dosis puede implicar cualquiera o todos de los siguientes:

- (i) reducción en el número de puntos de depósito por tramo;
- (ii) usar infusión continua de la composición de vector lentiviral;
- (iii) crear y/o mantener un gradiente de presión durante la infusión intersticial;
- 20 (iv) usar una mayor velocidad de flujo; y/o
- (v) administrar un mayor volumen.

25 Normalmente, se administra un vector lentiviral usando una cánula u otro dispositivo de inyección que se inserta en el tejido de cerebro en el sujeto elegido. Cuando se administra ProSavin[®] para el tratamiento de enfermedad de Parkinson, el estriado es un área adecuada del cerebro para elegir como diana. Otras áreas serían adecuadas para el tratamiento de otros trastornos neurológicos. Un experto en la materia podría determinar fácilmente qué área general del SNC sería una diana apropiada. Están disponibles mapas y dispositivos de posicionamiento estereotáctico. El posicionamiento también puede realizarse usando mapas anatómicos obtenidos por TC y/u obtención de imágenes de RM del cerebro del sujeto para ayudar a guiar el dispositivo de inyección al área diana elegida.

30

Convección de fluidos

35 En un sistema de administración previamente descrito para un vector lentiviral (Jarraya *et al.* (2009) como antes), la composición de vector se penetró en el parénquima cerebral por difusión. La difusión depende del gradiente de concentración libre junto con la difusividad del agente. La dispersión por difusión puede producir mala penetración, particularmente para agentes de alto peso molecular tales como vectores lentivirales.

40 La difusión de terapéuticos dentro del espacio extracelular es necesaria para permitir que tales terapéuticos accedan a tejidos diana tales como células neuronales y de la glía. Thorne y Nicholson (Thorne y Nicholson (2006) PNAS 104; 5567-5572) han determinado que el espacio extracelular normal es entre 38 y 64 nm. Sugieren que los sistemas de administración de nanopartículas superiores a 100 nm serán demasiado grandes para atravesar el espacio extracelular normal. Como se ha establecido anteriormente, los vectores lentivirales son sistemas de administración de nanopartículas basadas en virus con diámetros de aproximadamente 100 nm.

45

En el método descrito en el presente documento, la disolución de vector lentiviral se dispersa por convección de fluidos. Se realiza infusión intersticial usando una alta velocidad de flujo que los inventores han mostrado que potencia enormemente la distribución del vector lentiviral.

50 La velocidad de flujo puede mantenerse en un estado estacionario durante la infusión continua del vector, o puede aumentarse con el fin de mantener la presión de convección (véase más adelante). Un gradiente de presión creciente puede aumentarse, por ejemplo, continuamente o puede seguir un procedimiento en rampa caracterizado por varios aumentos escalonados pequeños de velocidad de flujo durante la infusión continua.

55 La presión del fluido puede mantenerse, aumentarse o disminuirse gradualmente durante la administración usando sistemas conocidos en la técnica, tales como una bomba osmótica programable, de infusión u otra bomba conocida para un experto en la materia.

60 La alta velocidad de flujo se mantiene durante el proceso de infusión entero, administrando el volumen de vector completo (por ejemplo, 10 a 600 μ l).

65 La presión de infusión es una función de la velocidad de flujo, viscosidad de la preparación de vector lentiviral y tamaño de la cánula. La presión de infusión debe seleccionarse de forma que proporcione un gradiente de presión suficiente para potenciar la distribución del vector lentiviral, pero insuficiente para a) producir un daño significativo al tejido que rodea el sitio de administración; y/o b) producir un "retro-flujo" y fuga de la disolución fuera del tramo de la cánula.

En el método descrito en el presente documento, el vector lentiviral puede infundirse en el cerebro a una velocidad de flujo de al menos 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, o entre 2-6 $\mu\text{l}/\text{min}$, entre 2-4 $\mu\text{l}/\text{min}$ o entre 2,5-3,5 $\mu\text{l}/\text{min}$. El vector lentiviral puede infundirse en el cerebro a una velocidad de flujo de aproximadamente 3 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Durante la infusión, la presión de convección (que es la diferencia entre la presión de infusión y la presión intracraneal) puede disminuir a medida que aumenta el volumen total administrado. Con el fin de mantener la presión de convección, la velocidad de flujo puede aumentarse continuamente durante la administración. Si se emplea un sistema tal, las velocidades de flujo mencionados en el párrafo precedente pueden representar las velocidades de flujo de partida.

KIT

La presente invención también proporciona un kit para administrar un vector lentiviral directamente al cerebro del sujeto, que comprende una a doce cánulas. Las cánulas pueden reutilizarse durante múltiples tramos para cada paciente o puede usarse una cánula nueva para cada tramo.

El vector puede administrarse, por ejemplo, usando una cánula o catéter o una aguja (tal como una aguja Hamilton). El término cánula, como se usa en el presente documento, debe incluir cánulas, catéteres, aguja o cualquier otro dispositivo adecuado para la administración de terapéuticos directamente al cerebro. Los documentos WO 2008/100930, WO 2008/144585 y WO 2009/101397 describen aquellas cánulas que podrían usarse.

La cánula puede estar precargada con la composición de vector lentiviral. La cánula puede cebarse antes de posicionarla dentro del cerebro.

El dispositivo de administración puede, por ejemplo, ser una jeringa Hamilton de calibre 28 de acero inoxidable o una cánula de infusión de calibre 28 de sílice fundida.

Si el kit es para su uso en un método empleando un tramo de administración por hemisferio, la cánula puede, por ejemplo, ser capaz de administrar entre aproximadamente 40 μl , 100 μl , 150 μl , 200 μl , 300 μl , 400 μl , 500 μl y 600 μl del vector lentiviral. Si el kit es para su uso en un método empleando dos tramos de administración por hemisferio, el kit puede comprender cuatro cánulas. Alternativamente, puede reutilizarse una única cánula para cada tramo, o puede usarse una cánula para administrar vector a cada hemisferio, en cuyo caso se llenaría con la composición de vector lentiviral y se cebaría antes de cada inserción en el área diana.

La cánula también puede preconectarse o adaptarse para la conexión a un dispositivo de infusión tal como una bomba descrita anteriormente. Alternativamente, la cánula puede unirse a sistemas conocidos para la administración de vector, tal como una jeringa que está controlada por una microbomba tal como aquellas distribuidas por World Precision Instruments, o el sistema de microinyector (Kopf, EE.UU.). Un sistema de administración tal puede ser adecuado para su uso con un marco estereotáctico.

En otro aspecto descrito en el presente documento, los dispositivos de administración de perforación estrecha usados a propósito del método descrito en el presente documento pueden implantarse en un sujeto, para permanecer durante un periodo de tiempo sustancial que se prolonga al menos varias horas a días o más, permitiendo así que la infusión de vector tenga lugar fuera de una sala de operaciones. Puede ser deseable que tales dispositivos sean suficientemente flexibles de manera que puedan asegurarse con un dispositivo de fijación para prevenir el movimiento lejos de la diana sin dañar el sistema de infusión de la cánula. También se desea que tales dispositivos puedan ser visualizados para confirmar la localización en el cerebro y para garantizar que el catéter no se ha movido de la diana en ningún punto.

Los dispositivos de administración de perforación estrecha adecuados para su uso como se describen en el presente documento pueden tener un diámetro suficientemente pequeño en el extremo de infusión distal para minimizar el traumatismo del tejido local, con un espacio muerto muy pequeño, aunque con la resistencia de un catéter más largo para prevenir la rotura y permitir la fijación, y con la capacidad para visualizar el catéter por obtención de imágenes.

Como se conocerá para aquellos expertos en la materia, hay varios dispositivos de administración de perforación estrecha que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención (por ejemplo, véase el dispositivo de administración descrito en el documento WO 2007/044023).

El dispositivo de infusión de perforación estrecha descrito en el presente documento está opcionalmente unido a la cabeza del sujeto. Posibles métodos de fijación incluyen, pero no se limitan a, fijación al cráneo cerca del agujero de trépano con una placa metálica, tal como una placa de titanio, fijación con un sistema de tapa de plástico situado dentro del agujero de trépano, o externalización a través del cuero cabelludo y sutura del catéter guía al cuero cabelludo.

El kit también puede comprender instrucciones para almacenamiento y/o uso.

La invención se describirá ahora adicionalmente mediante ejemplos, que pretenden servir para ayudar a un experto habitual en la materia a llevar a cabo la invención y no pretenden de ningún modo limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

5 Ejemplo 1 – Comparación de la distribución de un vector lentiviral en el putamen tras a) administración convencional y b) administración usando un sitio único y una alta velocidad de flujo

10 La administración de suspensión del vector VAIE-LacZ usando la técnica previamente descrita (50 µl de volumen total de vector administrado al putamen mediante 5 tramos de aguja usando una jeringa Hamilton y aguja de calibre 23, administrando cada una 10 µl por tramo (mediante tres depósitos) proporcionó una diseminación moderada de vector en el eje dorso-ventral del putamen que alcanzó entre el 40 y el 50 % de la profundidad de esta estructura cerebral (Fig. 1).

15 La diseminación del vector en el eje medio-lateral fue muy inferior a con el eje dorso-ventral, diseminándose el vector solo aproximadamente 1-2 mm en el mayor punto. Sin embargo, debido al posicionamiento de los cinco tramos de aguja a lo largo el eje del putamen, la diseminación del vector a lo largo del eje rostro-caudal fue aproximadamente 7,8 mm en ambos de los dos hemisferios que se administraron con vector por este paradigma.

20 A diferencia, el usar el método de la presente invención (infundiendo los 50 µl enteros de suspensión de vector en un sitio en el putamen mediante la aguja de calibre 23 con una jeringa Hamilton o usando una cánula de sílice fundida de calibre 28 a tanto 1 como 3 µl/min) produjo diseminación mejorada del vector en el eje medio-lateral y dorso-ventral en comparación con la pauta de cinco tramos, observándose el mayor grado de la diseminación con la cánula de calibre 28 a velocidades de flujo de tanto 1 como 3 µl/min.

25 La administración de vector de 50 µl de vector usando un único tramo de administración con el dispositivo de cánula de calibre 28 produjo una diseminación rostro-caudal similar a aquella con el paradigma de cinco tramos a ambas velocidades de flujo (diseminación de 6,2-8,6 mm para la cánula de calibre 28 y diseminación de 7,8 mm con la velocidad de flujo de cinco tramos y discontinua). Se observó una menor diseminación rostro-caudal con una infusión única usando la aguja de calibre 23 y la jeringa Hamilton (diseminación de 5,0-6,2 mm).

30 Cuando se comparó el volumen total de distribución del vector se encontró sorprendentemente que la administración única de 50 µl de vector usando un dispositivo de administración de calibre 23 fue inferior al método de administración de cinco tramos. Incluso más sorprendente, el dispositivo de administración de calibre 28 dio un mayor volumen de distribución del vector que el método de cinco tramos superior a dos veces el volumen con la mayor velocidad de flujo. Se pensó al menos parcialmente que este aumento en volumen resultó del retroflujo reducido de vector a lo largo del tramo de la aguja usando este dispositivo de administración de perforación estrecha.

35 En general, estas observaciones estuvieron de acuerdo con la diseminación de vector uniforme de la punta del dispositivo cuando se realizó una infusión única con la cánula de calibre 28. En cambio, con el enfoque de administración de 5 tramos y a menor grado con la infusión única usando la aguja de calibre 23 y jeringa, la distribución de vector estuvo más confinada al área directamente alrededor del tramo de la aguja. No hubo evidencia de daño a tejido neuronal de alrededor o rotura de la barrera hematoencefálica como resultado de las infusiones en todos los grupos. También se evaluó una cánula de plástico de calibre de 33, pero se consideró demasiado flexible para usarse para cirugía rutinaria que posiblemente contribuye al fallo del cirujano en colocar la cánula en el sitio correcto dentro del putamen. La cánula de sílice fundida de calibre 28 produjo una diseminación de vector similar usando ambas velocidades de flujo (1 ó 3 µl/min). La cánula de calibre 28 de calibre más fino produjo menos cicatrización que la aguja Hamilton de calibre 23. Se tiñeron doblemente un número similar de células (>90 %) para β-galactosidasa y para NeuN independientemente del paradigma de administración, confirmando la elección de diana neuronal del vector en todos los casos.

40 La respuesta inflamatoria local a la infusión del vector VAIE-LacZ se evaluó en este estudio por evaluación histológica de los marcadores inflamatorios CD4 y CD8 (linfocitos T) y CD68 (microglía activada). Se observó tinción positiva para cada uno de los marcadores en la proximidad del tramo de la aguja para todos los métodos de administración y dispositivos de inyección; sin embargo, hubo muy poca respuesta inflamatoria asociada al vector y no se observaron diferencias entre los métodos de administración. Este resultado indica que no hay elevada respuesta inflamatoria asociada a la administración de vector usando una infusión única a un mayor flujo.

45 No se observaron toxicidad abierta o signos clínicos anormales para la administración de vector en ninguno de los estudios animales. Los animales no mostraron ninguna actividad locomotora o comportamiento anormal y se observó que se alimentaron normalmente.

Tabla 1. Resumen de la distribución del vector usando diferentes parámetros de administración de vector

Parámetros de administración	Propagación rostro-caudal de vector (mm)
50 µl administrados mediante 5 tramos usando una jeringa Hamilton de calibre 23, 1 µl/min	7,8 y 7,8
Infusión única de 50 µl usando una jeringa Hamilton de calibre 23, 1 µl/min	5,8 y 6,2
Infusión única de 50 µl usando una jeringa Hamilton de calibre 23, 3 µl /min	5,0
Infusión única de 50 µl usando una cánula de sílice fundida de calibre 28, 1 µl/min	8,6 y 6,2
Infusión única de 50 µl usando una cánula de sílice fundida de calibre 28, 3 µl/min	7,0 y 6,2
Infusión única de 100 µl usando una jeringa Hamilton de calibre 28, 3 µl /min	
Infusión única de 100 µl usando una cánula de sílice fundida de calibre 28, 3 µl/min	

Tabla 2. Datos de un único experimento que muestra el volumen de distribución.

5

Dispositivo de inyección	Volumen de inyección / método	Velocidad de flujo de inyección	Distribución A-P (mm)	Volumen de distribución (mm ³)
Aguja de acero inoxidable y jeringuilla de vidrio (calibre 23)	50 µl de vector administrado mediante 5 tramos de inyección con tres depósitos por tramo	1 µl/min	7,8	35,1
Aguja de acero inoxidable y jeringuilla de vidrio (calibre 23)	50 µl, infusión única	1 µl/min	5,8	10,0
		3 µl /min	5,0	25,7
Cánula de sílice fundida (calibre 28)	50 µl, infusión única	1 µl /min	8,6	60,2
		3 µl /min	7,0	91,7

Conclusión

10 Previamente, se han administrado pequeños volúmenes de vectores lentivirales al cerebro mediante múltiples depósitos dentro de cada tramo de cánula usando velocidades de flujo lentas. Un método tal es incómodo y no ha permitido estudios de aumento de dosis. Se consideró que un paradigma de infusión continua simplificado que permitiera la administración de mayores volúmenes de vector a una velocidad de flujo más rápida era más aplicable al empleo quirúrgico en el tratamiento de diversas afecciones neurológicas.

15 No se sabía si vectores tan grandes como los lentivirus podrían distribuirse eficazmente en el cerebro mediante un paradigma de infusión única, ya que estos vectores son considerablemente más grandes que las partículas de AAV que se han examinado previamente en cerebro de primate (Bankiewicz et al. (2000) Exp. Neurol. 164:2-14; Hadaczek et al. (2006) Hum. Gene Ther 17:291-302 y Hadaczek et al. (2009) Hum. Gene Ther 20:229-237). Como el diámetro de vectores lentivirales (aproximadamente 100 nm) es mayor que el espacio extracelular (38-64 nm), es posible que las partículas de vector lentiviral no hubieran sido conducidas eficazmente a través del espacio extracelular, que puede ser prohibitivo para partículas tan grandes como los vectores lentivirales. Es, sin embargo, evidente que los vectores lentivirales tales como vectores de VAIE pueden conducirse eficazmente a través de la región del putamen usando un método de infusión continua que se controla fácilmente y que proporciona un volumen de transducción que es mejor que el goteo de vector alrededor de la región diana usando múltiples colocaciones de la cánula.

25 Estudios previos en roedores han informado que a bajas velocidades de flujo y durante el proceso de CED, el vector puede propagarse a través del espacio perivascular, posiblemente conducido por la acción pulsada de la circulación sanguínea a través de la red de capilares del cerebro (Hadaczek et al. (2004) Hum Gene Ther. 15:469-79). Sin embargo, los presentes inventores han encontrado poca evidencia de este fenómeno cuando la velocidad de flujo se mantuvo a un alto nivel. La restricción de este transporte perivascular puede reducir la distribución del vector en áreas no diana.

30 Existe la preocupación de que algunos vectores virales puedan plantear un riesgo de inflamación central y que la infusión de vectores, a una velocidad de flujo única, o mediante el proceso de CED, pueda agravar una respuesta inflamatoria. Se ha demostrado recientemente que los vectores de serotipo 1 de AAV, que se han examinado como vehículos de genes terapéuticos, produjeron una respuesta humoral y celular robusta cuando se administraron al estriado y la corteza de primates (Hadaczek et al. (2009) Hum. Gene Ther 20:229-237). No se ha observado evidencia de un aumento de la respuesta inflamatoria local con una infusión única de un vector basado en VAIE usando una cánula de calibre 28 con velocidades de flujo de administración de entre 1 y 3 µl/min.

40

En conclusión, estos estudios indican que los genes terapéuticos que tienen como objetivo tratar diversas afecciones neurológicas pueden administrarse con seguridad por el vector de VAIE para elegir como diana regiones del cerebro usando el paradigma de infusión simplificado y que un amplio volumen de células diana pueden transducirse eficazmente.

5

Métodos y materiales

Animales

10 Se alojaron seis macacos cinomolgos macho y seis hembra en grupos compatibles de un único sexo durante su periodo de aclimatación a temperatura (22 ± 2 °C) y humedad (45 % - 65 %) constante bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (la luz se enciende a las 07:30) antes de la administración del vector. A continuación, los animales se alojaron individualmente tras la administración quirúrgica del vector en cajas de acero inoxidable individuales de dimensiones estándar de 1,10 m² de superficie del suelo x 1 m de altura. El aire en la sala de animales se cambió aproximadamente 10 veces por hora. Los animales se alimentaron con pellas Old World Monkey (SDS DIETEX nº 808004) y tuvieron acceso a voluntad a agua del grifo. El uso y cuidado de los animales fue administrado por la Directiva 86/609/CEE de la Convención Europea para la Protección de Animales Vertebrados usados con Fines Experimentales u otros Fines Científicos y la Acta de Animales (Procedimiento Científico) 86 para el Reino Unido.

15

Administración del vector

20 Los animales ayunaron antes de la cirugía y se previno el acceso a agua durante aproximadamente 6 horas. Los animales se administraron con sulfato de atropina (0,04 mg/kg, i.m.), HCl de ketamina (10 mg/kg, i.m.) y buprenorfina (0,01 mg/kg, i.m.) y luego se anestesiaron con propofol (3 mg/kg i.v.) 10 min después. Los animales también se inyectaron con amoxicilina (30 mg/kg, s.c.) 24 horas antes de la cirugía y luego cada 48 horas hasta una semana después de la cirugía. Los animales se intubaron y se mantuvieron en anestesia con anestésico inhalante de isoflurano administrado mediante un respirador de volumen regulado. Se monitorizaron y se registraron el ECG, saturación de O₂ y frecuencia cardíaca. Se monitorizó la temperatura corporal durante toda la cirugía usando un termómetro rectal. Los animales se pusieron en un marco estereotáctico (Unim'ecanique, Francia) y se administró vector en el putamen usando el sistema de microinyector (Kopf, EE.UU.) para administración de vector como pequeños depósitos individuales en el putamen usando una aguja Hamilton de acero inoxidable de calibre 23 de 6,5 mm de largo unida a una jeringa Hamilton 710 (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Suiza). Para las infusiones únicas del putamen, se infundieron suspensiones de vector usando tanto aguja Hamilton de acero inoxidable de calibre 23 de 6,5 mm de longitud y jeringa, aguja Hamilton de acero inoxidable de calibre 28 de 6,5 mm de largo y jeringa como cánula de inyección de sílice fundida de 6,5 mm de longitud unida a una jeringa Hamilton por una pieza corta de tubo de plástico para minimizar el volumen muerto (Plastics-1, Roanoke, VA, EE.UU.). Después de perforar un orificio en el cráneo sin dañar la duramadre, una cánula ventriculográfica montada sobre una jeringuilla de vidrio se introdujo en la asta anterior del ventrículo lateral y se inyectó un medio de contraste (Omnipaque, Nycomed, Noruega). Se usó un atlas estereotáxico para el preciso ajuste antes de la inserción en el cráneo (Martin & Bowden (1996) Neuroimage 4(2):119-150). La posición precisa de la comisura anterior (CA) se dedujo de la ventriculografía que se usó luego para posicionar tanto el putamen izquierdo como derecho. Las coordenadas para la colocación de las cánulas de infusión fue CA -1 mm (directamente centro del área motora del putamen). Para múltiples depósitos dentro de cada putamen, se inyectó vector a 3 profundidades administrando 4 ml en el depósito más profundo y luego otros dos depósitos de 3 ml se administraron cada uno 1 mm por encima del otro para administrar 10 ml por tramo de aguja. El primero de los cinco tramos de la aguja Hamilton estuvo al nivel de la comisura anterior (CA), es decir, CA 0 mm, la segunda inyección: 2 mm caudal con respecto a CA (CA -2 mm), tercera inyección: 3 mm caudal con respecto a la CA (CA -3 mm), cuarta inyección: 5 mm caudal con respecto a la CA (CA -5 mm) y quinta inyección: 6 mm caudal con respecto a la CA (CA -6 mm) para distribuir vector a lo largo de la longitud rostro-caudal del putamen. La jeringa Hamilton y el catéter de infusión se quedarán *in situ* durante 2 minutos adicionales después de cada inyección/infusión antes que sacarse.

25

30

35

40

45

50

El vector se infundió a una velocidad de flujo única de 0,5, 1 ó 3 µl/min usando una bomba de infusión pequeña programable (UltraMicroPump III; World Precision Instruments, Sarasota, FL, EE.UU.). El vector se administró bilateralmente en el putamen a un volumen total de 50 µl por hemisferio recibiendo cada hemisferio vector administrado por una velocidad de flujo diferente o dispositivo de cánula. En un animal, el tampón de formulación TSSM se infundió en el putamen, en un hemisferio usando la aguja Hamilton de calibre 23 administrando tampón a 1 ml/min y en el otro hemisferio el vector se administró por una aguja Hamilton de calibre 28 a 1 ml/min. El animal infundido con TSSM se usó para evaluar el grado relativo de daño neuronal y respuesta de inflamación a tampón de formulación estéril solo, en ausencia de vector viral. Registros quirúrgicos. Tras la cirugía, los animales se observaron atentamente y se mantuvieron calientes hasta que recuperaron los reflejos de enderezamiento y de deglución antes de devolverse a sus jaulas. Se administró analgesia con buprenorfina dos veces al día, durante 3 días (0,02 mg/kg, i.m.) y se registraron semanalmente los pesos corporales después de la cirugía.

55

60

Histología

65

Se hizo la autopsia de los animales 4 semanas después de la dosificación y tras un ayuno durante la noche mediante inyección de ketamina (10 mg/kg) y a continuación eutanasia usando anestesia con pentobarbital sódico (entre 10-30 mg/kg, i.v.). Tras la recogida de una muestra de sangre para la evaluación de la respuesta inmunitaria al virus, los animales se desangraron, se perfundieron con solución salina tamponada con fosfato heparinizada (0,9 % en peso/volumen de cloruro sódico, USP que contiene aproximadamente 25 U/ml de heparina), seguido de una disolución de paraformaldehído tamponada al 4 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los cerebros (con la duramadre extraída) se diseccionaron cuidadosamente y se colocaron en paraformaldehído al 4 % fresco durante la noche a 5 ± 3 °C y a continuación se transfirieron a disolución de sacarosa al 30 % filtrada en frío en PBS durante entre 2 y 4 días. A continuación, los cerebros se biseccionaron por la línea central en dos hemisferios y cada hemisferio se congeló criogénicamente en isopentano frío (-40 a -50 °C) y se guardó a -80 °C antes de seccionarlo a cuarenta micrómetros (40 μ m) de espesor usando un criostato. Se recogieron secciones de cerebro que contenían la región del putamen en tarros que contenían 5 secciones equivalentes a una distancia de doscientos micrómetros (200 μ m) de recorrido en el eje rostro-caudal del hemisferio del cerebro. Las secciones del cerebro de flotación libre se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti- β -galactosidasa. Se obtuvieron anticuerpos secundarios y terciarios del kit Vectastain anti-mouse ABC (nº PK-6102) y la metodología fue según instrucciones del kit. Se logró la visualización de DAB usando un kit DAB peroxidase substrate (número de catálogo SK-4100). Entonces, las secciones se montaron sobre portaobjetos de microscopio de vidrio. Se tiñeron secciones del hemisferio cerebral alternas con anticuerpo anti-GFAP (Chemicon nº MAB3402) a una concentración de 1:200. Las secciones seleccionadas también se tiñeron usando H&E y las secciones se analizaron microscópicamente para evaluar niveles de infiltrados celulares y cambios en la morfología del tejido. También se tiñeron secciones seleccionadas en la región de infusión del vector para los marcadores inmunológicos CD8, CD4 y CD68 después de eliminar la tinción no específica con 10 % de peróxido de hidrógeno, seguido de una incubación durante la noche en 10 % de suero con 0,5 % de Triton X-100. Se aplicaron anticuerpos primarios (control negativo de IgG, sin control negativo primario, anti-CD4, CD8 y CD68 humano de ratón) durante dos horas solo. Después de tres lavados de 5 minutos en PBS + 0,02 % de Tween 20 se usó el kit anti-mouse vector elite ABC con tres lavados de 5 minutos entre cada etapa. Entonces se usó un kit DAB peroxidase para la visualización.

El volumen de distribución del vector se calculó midiendo el área de tinción de β -galactosidasa positiva en secciones de cerebro en serie a lo largo de todo el putamen inyectado y aplicando métodos de estereología estándar (usando el principio de Cavalieri) para estimar la cobertura en volumen total.

Ejemplo 2 – Comparación de la eficacia de un vector lentiviral para enfermedad de Parkinson tras la administración al putamen motor de pacientes con enfermedad de Parkinson usando a) administración convencional y b) administración usando un número reducido de sitios de inyección con un dispositivo de calibre más estrecho y una alta velocidad de flujo

Está en curso un ensayo clínico de fase I/II ensayo para evaluar la seguridad y eficacia de un tratamiento basado en vector lentiviral para enfermedad de Parkinson, llamado ProSavin[®]. ProSavin[®] es un vector lentiviral de VAIE que contiene tres genes que codifican enzimas en la ruta de la biosíntesis de dopamina. Como parte del ensayo, se evaluó el potencial terapéutico de ProSavin[®] para corregir síntomas de enfermedad de Parkinson usando 1) el método convencional de administración y 2) un método de infusión continuo. El método convencional implicó la inyección de un volumen total de 125 μ l de vector administrado a cada putamen mediante 5 tramos de aguja usando una jeringa Hamilton y aguja de calibre 23 y una tasa de administración de 1 μ l/min. Se administró un total de 25 μ l de vector a lo largo de cada tramo de inyección con 5 depósitos de 5 μ l de vector distribuido a lo largo del tramo. En el método de administración continuo se administró el mismo volumen total de vector (125 μ l) usando una jeringa Hamilton y una aguja de calibre 28 más estrecha. Se realizaron tres inyecciones en cada putamen y se hizo una infusión continua de vector en cada sitio de inyección usando una elevada tasa de administración de 3 μ l/min. Los volúmenes de vector administrados fueron 42 μ l, 42 μ l y 43 μ l en los tres sitios de inyección. El tiempo quirúrgico para la administración de vector usando el método de infusión fue casi la mitad de aquel en comparación con el método convencional.

Los procedimientos quirúrgicos fueron seguros y bien tolerados en todos los pacientes con ambos métodos de administración. No se informaron acontecimientos adversos graves en ningún paciente referentes a tanto ProSavin[®] como a los dos métodos de administración.

El criterio primario de evaluación de la eficacia del estudio fue la mejora en la parte motora (parte III) de la escala de clasificación unificada de la enfermedad de Parkinson (UPDRS) 6 meses después del tratamiento en comparación con las puntuaciones del nivel inicial. Un resumen de mejoras en la función motora hasta la fecha se muestra en la Tabla 3 (la función motora se evalúa según la escala de clasificación unificada de la enfermedad de Parkinson [UPDRS] en el estado "DE AUSENCIA DE RESPUESTA" del paciente, es decir, después de la retirada de la medicación para la enfermedad de Parkinson). En el grupo de pacientes que recibieron ProSavin[®] usando el método de 5 depósitos/tramo discontinuo convencional se observó una mejora del 34 % en las puntuaciones de la parte III de UPDRS a los 6 meses. De forma interesante, los pacientes que recibieron el mismo volumen total de vector usando el método continuo de infusión mostraron una mayor mejora en las puntuaciones de la parte III de UPDRS, alcanzando una mejora del 43 % 6 meses después del tratamiento.

Cohorte ²	Dosis	Método de administración	3 meses (UPDRS)	6 meses (UPDRS)	1 año (UPDRS)	2 años (UPDRS)
1, n=3	1x	Convencional	Media 27 % Máx. hasta 30 %	Media 30 % Max. hasta 50 %	Media 29 % Max. hasta 44 %	Media 20 % Max. hasta 30 %
2, n=3	2x	Convencional	Media 28 % Máx. hasta 53 %	Media 34 % Máx. hasta 53 %	Media 29 % Máx. hasta 56 %	-
2b, n=3	2x	Infusión continua	Media 26 % Máx. hasta 52 %	Media 43 % Máx. hasta 61 %	-	-

Además, los pacientes mostraron una mejora promedio del 26 % en la puntuación “DE RESPUESTA” de la parte III de UPDRS a los 6 meses. Los datos del diario del paciente mostraron un aumento en la mejora funcional en el tiempo en el que la L-dopa oral fue eficaz sin discinesias alarmantes de 3,2 horas y una disminución en el tiempo en el que la L-dopa oral fue ineficaz de 4,1 horas.

Los resultados indican que el método de infusión continua proporciona elevada eficacia en pacientes con Parkinson en comparación con el método de 5 depósitos/tramo discontinuo previamente usado. El motivo para esto puede ser debido a una distribución mejorada del vector ProSavin[®] en el putamen inyectado, aunque no es posible evaluar esto en pacientes vivos. Además, el tiempo quirúrgico para la administración de vector usando el método de infusión continua fue casi la mitad de aquel en comparación con el método convencional.

Métodos y materiales

Todos los pacientes se inyectaron con ProSavin[®] intraestriatalmente bajo anestesia general usando inyecciones estereotáxicas bilaterales. Se realizó un barrido de IRM craneal antes de la administración para proporcionar coordenadas de inyección precisas para elegir como diana la región del putamen sensoriomotora del putamen.

Para cada inyección se insertó un tubo guía de 130 mm de longitud con un diámetro de perforación de 1,2 mm en la posición correcta dentro del cerebro, usando las coordenadas derivadas de IRM, sin entrar en el putamen. Para el método convencional de administración, ProSavin[®] se cargó en una jeringa Hamilton unida a una aguja sin efecto sacabocados biselada de estilo de punta 2 de calibre 23, 150 mm de longitud. Para el método de infusión continua, ProSavin[®] se cargó en una jeringa Hamilton unida a una aguja de calibre 28 de la misma longitud. La aguja que bajó en el cerebro mediante el tubo guía y penetró el putamen motor. Entonces se sacó el tubo guía aproximadamente 10 mm antes de la infusión de ProSavin[®]. Se usaron un tubo guía, jeringa Hamilton y aguja nuevos para cada hemisferio del cerebro.

Para el método convencional de administración se administraron 25 µl de ProSavin[®] a cada uno de los cinco tramos separados en ambos hemisferios del cerebro. Cada tramo recibió cinco depósitos de 5 µl de ProSavin[®]. El depósito más profundo se administró primero, a continuación se sacó la aguja 1 mm y se administró un segundo depósito de 5 µl. Esto se repitió hasta que se habían hecho los cinco depósitos. La administración se realizó manualmente en cada uno de los tramos de inyección a una tasa de 1 µl por minuto (se inyectarán 0,5 µl, seguido de una pausa de 30 segundos antes inyectar los siguientes 0,5 µ, etc.) hasta que se inyectaron 5 µl en los cinco depósitos a lo largo de cada tramo. La aguja se dejó *in situ* durante un minuto tras completarse los cinco depósitos en un tramo único.

Para el método de infusión continua, ProSavin[®] se administró en tres tramos de inyección por hemisferio. Se administraron volúmenes de 42 µl, 42 µl y 43 µl de ProSavin[®] usando infusión continua a una tasa de administración constante de 3 µl/min. La velocidad de flujo se controló por el uso de una bomba en vez del sistema manual descrito anteriormente para el método convencional.

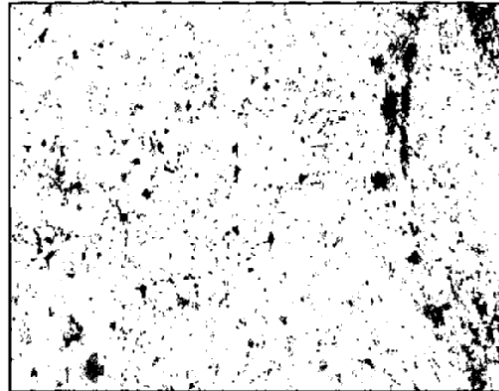
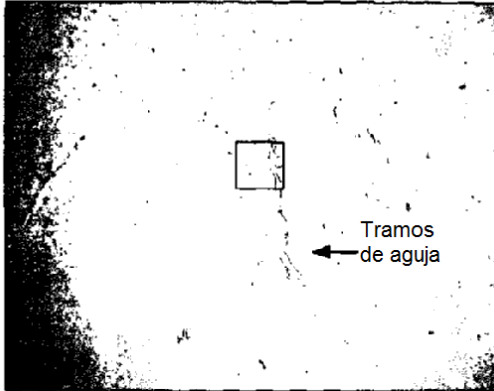
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector lentiviral para la administración al putamen para su uso en el tratamiento de una afección neurológica, en el que una composición que comprende el vector lentiviral se administra directamente al putamen por infusión continua usando una cánula y en el que se administran entre 10-600 µl de la composición de vector por tramo a una velocidad de flujo de al menos 2 µl/min, y en el que el vector lentiviral se administra usando una cánula con una perforación equivalente o más estrecha de aproximadamente 28 de calibre.
- 10 2. Un vector lentiviral según la reivindicación 1, en el que se mantiene una velocidad de flujo constante durante la infusión del vector lentiviral.
- 15 3. Un vector lentiviral según la reivindicación 1, en el que la velocidad de flujo se aumenta durante la infusión del vector lentiviral.
- 20 4. Un vector lentiviral según cualquier reivindicación precedente, que es un vector del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE).
- 25 5. Un vector de VAIE según la reivindicación 4, que comprende secuencias de nucleótidos que codifican tirosina hidroxilasa, GTP-ciclohidrolasa 1 y el aminoácido aromático Dopa descarboxilasa.
- 30 6. Un vector lentiviral según cualquier reivindicación precedente, en el que la velocidad de flujo a la que el vector se administra es entre 2-4 µl/min.
- 35 7. Un vector lentiviral según cualquier reivindicación precedente, en el que la velocidad de flujo a la que el vector se administra es aproximadamente 3 µl/min.
8. Un vector lentiviral según cualquier reivindicación precedente para tratar enfermedad de Parkinson.
9. Un kit para administrar un vector lentiviral como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 directamente al putamen del sujeto para su uso en el tratamiento de una afección neurológica, en el que el kit comprende una o más cánulas, en el que la(s) cánula(s) tiene/n aproximadamente 28 de calibre o más estrechas, y en el que, en uso, una composición que comprende el vector lentiviral se administra directamente al putamen por infusión continua usando la cánula y en el que entre 10-600 µl de la composición de vector se administra por tramo a una velocidad de flujo de al menos 2 µl/min.
10. Un kit según la reivindicación 9, en el que la(s) cánula(s) está/n precargada/s con el vector lentiviral a un volumen de entre 10 y 600 µl.

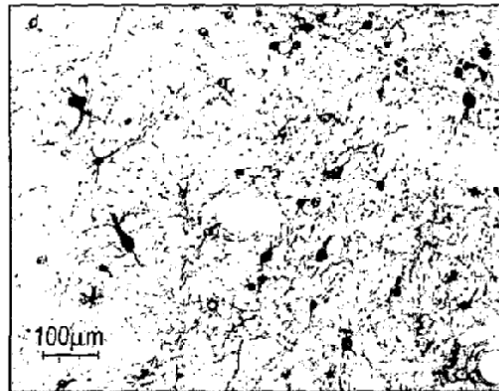
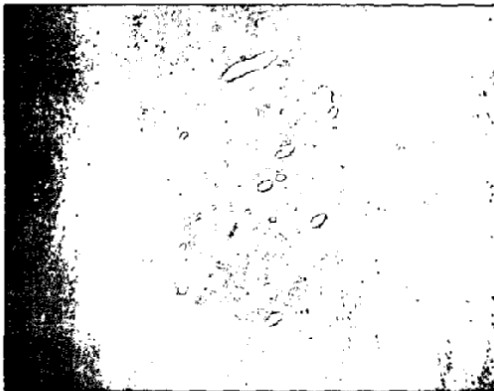
Imagen de bajo aumento (x12)

Imagen de gran aumento (x200)

(A)



(B)



(C)

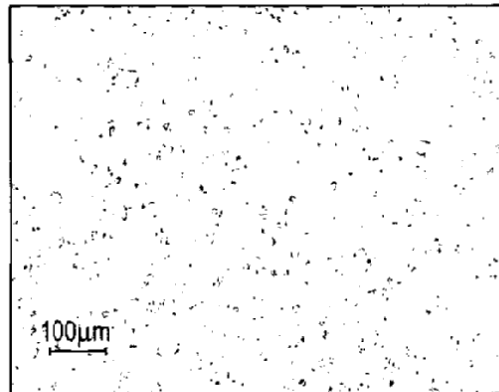
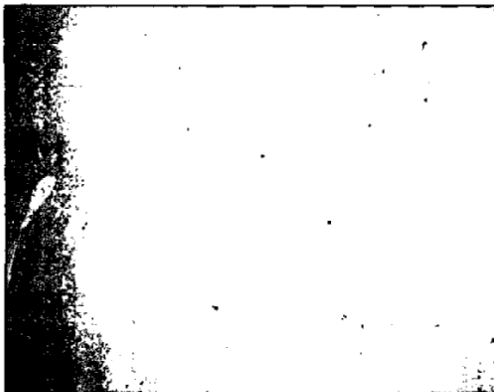


FIG. 1

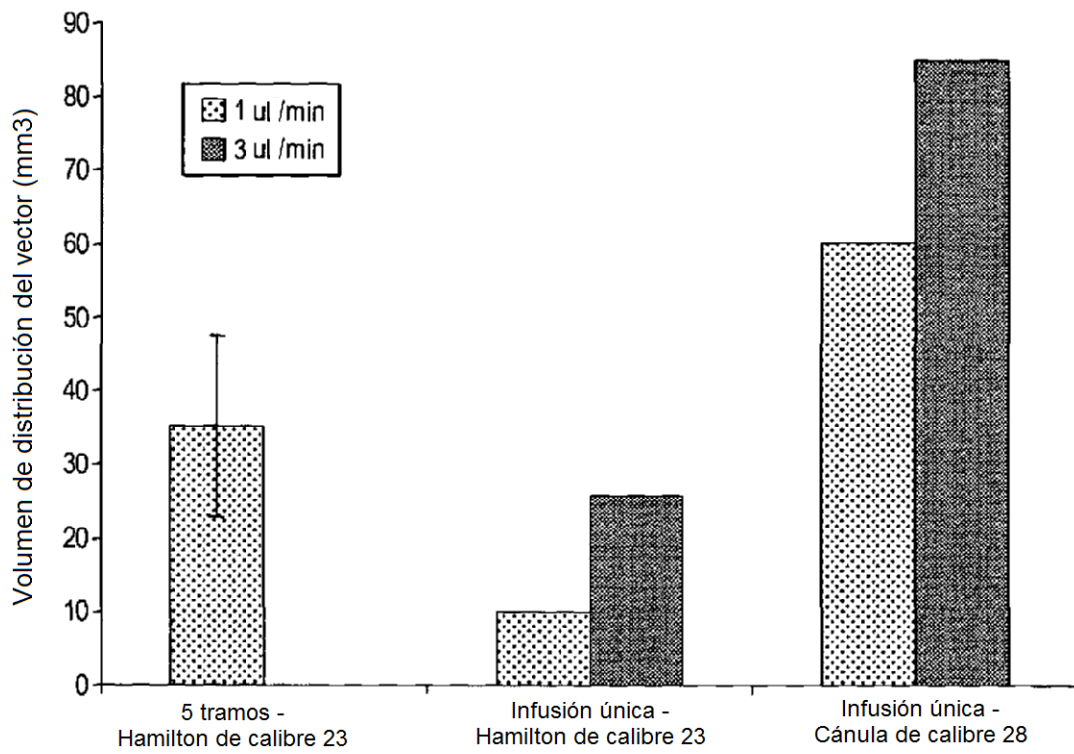


FIG. 2

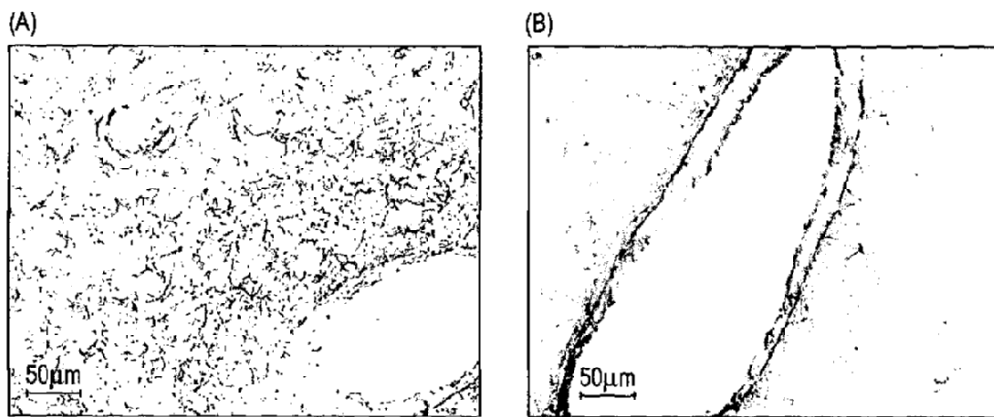


FIG. 3