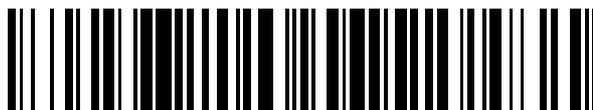


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 490**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2004 E 04760694 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 1620133**

54 Título: **Terapia génica para trastornos neurometabólicos**

30 Prioridad:

01.05.2003 US 467195 P
04.06.2003 US 475726 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2016

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.0%)
500 KENDALL STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US

72 Inventor/es:

PASSINI, MARCO A.;
STEWART, GREGORY R. y
DODGE, JAMES

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 562 490 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia génica para trastornos neurometabólicos

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente de EE.UU. N° 60/467.195, presentada el 1 mayo de 2003, y de la solicitud de patente de EE.UU. N° 60/475.726, presentada el 4 de junio de 2003.

5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere a composiciones y a métodos para tratar trastornos que afectan al sistema nervioso central (SNC). La presente descripción se refiere, además, a composiciones que comprenden vectores virales tales como vectores de virus adeno-asociados (AAV) y a métodos de administración de los mismos.

Antecedentes de la invención

- 10 Un grupo de trastornos metabólicos conocidos como enfermedades por depósito lisosomal (LSD) incluye más de cuarenta trastornos genéticos, muchos de los cuales implican defectos genéticos en diversas hidrolasas lisosomales. Enfermedades de depósito lisosomal representativas y las enzimas defectuosas asociadas están listadas en la Tabla 1.

Tabla 1

<i>Enfermedad por depósito lisosomal</i>	<i>Enzima defectuosa</i>
Aspartilglucosaminuria	Aspartilglucosaminidasa
Fabry	α -galactosidasa A
Enfermedad Infantil de Batten * (CNL1)	Palmitoil Proteína Tioesterasa
Enfermedad Infantil de Batten Tardía Clásica* (CNL2)	Tripeptidil Peptidasa
Enfermedad Juvenil de Batten* (CNL3)	Proteína Lisosomal de la Transmembrana
Batten, otras formas* (CNL4-CNL8)	Productos génicos múltiples
Cistinosis	Transportador de cisteína
Farber	Ceramidasa ácida
Fucosidosis	α -L-fucosidasa ácida
Galactosidosialidosis	Proteína protectora/catepsina A
Gaucher tipos 1, 2* y 3*	β -glucosidasa ácida, o glucocerebrosidasa
Gangliosidosis G _{M1} *	β -galactosidasa ácida
Hunter*	Iduronato-2-sulfatasa
Hurler-Scheie*	α -L-iduronidasa
Krabbe*	Galactocerebrosidasa
α -manosidosis*	α -manosidasa ácida
β -manosidosis*	β -manosidasa ácida
Maroteaux-Lamy	Arilsulfatasa B
Leucodistrofia metacromática*	Arilsulfatasa A
Morquio A	N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa
Morquio B	β -galactosidasa ácida
Mucopolidosis II/III*	N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa
Niemann-Pick A*, B	Esfingomielinasa ácida

Enfermedad por depósito lisosomal	Enzima defectuosa
Niemann-Pick C*	NPC-1
Pompe*	α -glucosidasa ácida
Sandhoff*	β -hexosaminidasa B
Sanfilippo A*	Heparan N-sulfatasa
Sanfilippo B*	α -N-acetilglucosaminidasa
Sanfilippo C*	Acetil-CoA: α -glucosaminidasa N-acetiltransferasa
Sanfilippo D*	N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa
Enfermedad de Schindler*	α -N-acetilgalactosaminidasa
Schindler-Kanzaki	α -N-acetilgalactosaminidasa
Sialidosis	α -neuramidasa
Sly*	β -glucuronidasa
Tay-Sachs*	β -hexosaminidasa A
Wolman*	Lipasa ácida

* Implicación del SNC

5 El rasgo distintivo de LSD es la acumulación anormal de metabolitos en los lisosomas que conduce a la formación de grandes números de lisosomas distendidos en el pericarion. Un reto importante para el tratamiento de LSD (en comparación con el tratamiento de una enzimopatía específica del hígado) es la necesidad de invertir la patología por depósito lisosomal en múltiples tejidos separados. Algunas LSDs pueden ser tratadas eficazmente mediante infusión intravenosa de la enzima que falta, conocida como terapia de reemplazo de enzimas (ERT). Por ejemplo, pacientes de Gaucher tipo 1 sólo tienen una enfermedad visceral y responden favorablemente a la ERT con glucocerebrosidasa recombinante (Cerezyme®, Genzyme Corp.). Sin embargo, los pacientes con enfermedad metabólica que afecta al SNC (p. ej., enfermedad de Gaucher tipo 2 ó 3) no responden a la ERT intravenosa, debido a que se evita que la enzima de reemplazo penetre en el cerebro por la barrera hematoencefálica (BBB). Además, intentos de introducir un enzima de reemplazo en el cerebro mediante inyección directa no han tenido éxito, en parte debido a la citotoxicidad de la enzima a concentraciones locales altas (observaciones no publicadas) y a tasas de difusión parenquimales limitadas en el cerebro (Pardridge, Peptide Drug Delivery to the Brain, Raven Press, 1991).

15 La terapia génica es una modalidad de tratamiento emergente de trastornos que afectan al SNC, incluyendo LSDs. En este enfoque, la restauración de la vía metabólica normal y la reversión de la patología se producen por la transducción de las células afectadas con un vector que porta una versión sana del gen. La terapia génica del SNC se ha visto facilitada por el desarrollo de vectores virales capaces de infectar eficazmente neuronas post-mitóticas. Para una revisión de vectores virales para la administración de genes al SNC, véase Davidson et al. (2003) Nature Rev., 4:353-364. Vectores de virus adeno-asociados (AAV) se consideran óptimos para la terapia génica del SNC, dado que son sustancialmente no tóxicos, no inmunogénicos, neurotrópicos y pueden mantener la expresión a largo plazo en el SNC (Kaplitt et al. (1994) Nat. Genet., 8:148-154; Bartlett et al. (1998) Hum. Gene Ther., 9:1181-1186; y Passini et al. (2002) J. Neurosci., 22:6437-6446).

25 Un producto de transgén terapéutico, p. ej., una enzima, puede ser secretado por las células transducidas y subsiguientemente puede ser recogido por otras células, en las que luego alivia la patología. Este proceso se conoce como corrección cruzada (Neufeld et al. (1970) Science, 169:141-146). Sin embargo, la corrección de la patología, tal como la patología de depósito en el contexto de LSD, está típicamente confinada a la vecindad inmediata del sitio de inyección debido a la difusión parenquimal limitada del vector inyectado y el producto transgénico secretado (Taylor et al. (1997) Nat. Med., 3:771-774; Skorupa et al. (1999) Exp. Neurol., 160:17-27). Por lo tanto, la neuropatología que afecta a múltiples regiones del cerebro requiere un suministro generalizado del vector, utilizando múltiples inyecciones distribuidas en el espacio, especialmente en un cerebro grande tal como el del ser humano. Esto aumenta significativamente el riesgo de lesión del cerebro. Además, a algunas regiones del cerebro puede ser difícil acceder quirúrgicamente. Por lo tanto, serían beneficiosos otros modos de transporte del vector dentro del SNC, además de la difusión.

35 Cuando se administra en las terminaciones axonales, algunos virus se internalizan y transportan de forma retrógrada a lo largo del axón hacia el núcleo. Las neuronas en una región del cerebro están interconectadas mediante axones

a las regiones distales del cerebro, proporcionando con ello un sistema de transporte para el suministro de vectores. Estudios con adenovirus, HSV y el virus de la pseudo-rabia han utilizado propiedades de tráfico de estos virus para suministrar genes a las estructuras distales dentro del cerebro (Soudas et al. (2001) FASEB J., 15:2283-2285; Breakefield et al. (1991) New Biol., 3:203-218; y deFalco et al. (2001) Science, 291:2608-2613). Sin embargo, inconvenientes asociados con estos vectores virales, p. ej., la inmunogenicidad y/o toxicidad celular, limitan su utilidad.

Varios grupos han informado que la transducción del cerebro por el AAV serotipo 2 (AAV2) está limitada al sitio de inyección intracardiacal (Kaplitt et al., (1994) Nat. Genet., 8:148-154; Passini et al. (2002) J. Neurosci., 22:6437-6446; y Chamberlin et al. (1998) Brain Res., 793:169-175). Un informe reciente sugiere que el transporte axonal retrógrado de AAV2 también puede producirse en circuitos seleccionados del cerebro de rata normal (Kaspar et al. (2002) Mol. Ther., 5:50-56). Sin embargo, no se sabe qué parámetros específicos fueron los responsables del transporte axonal observado, y si el transporte axonal suficiente y eficaz ocurriría en una neurona enferma que está en un estado de disfunción celular. De hecho, se ha informado de lesiones observadas en las neuronas de LSD para interferir con o incluso bloquear el transporte axonal (revisado en Walkley (1998) Brain Pathol., 8:175-193)), sugiriendo que las neuronas comprometidas con la enfermedad no apoyan el tráfico de AAV a lo largo de sus axones.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de desarrollar nuevos métodos terapéuticos para el tratamiento de trastornos metabólicos que afectan al SNC.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente descripción proporciona métodos y composiciones para el tratamiento o la prevención de trastornos metabólicos tales como enfermedades por depósito lisosomal (LSD), que se caracterizan por o están asociados con un riesgo de disminución de la función del SNC.

La presente descripción proporciona, además, métodos para el suministro mínimamente invasivo selectivo de un transgén a regiones seleccionadas en el cerebro de un sujeto afectado.

Ventajas adicionales de la presente descripción, incluidas ventajas de la presente invención, se expondrán en parte en la siguiente descripción, y en parte se desprenderán de la descripción, o pueden aprenderse por la puesta en práctica de la presente descripción, incluida la presente invención.

En los experimentos que conducen a la presente descripción, incluida la presente invención, a ratones inactivados por esfingomielinasa ácida (ASM), un modelo de la enfermedad de Niemann-Pick tipo A, se les administró un vector de AAV2 que porta el gen ASM humano (AAV-ASM) mediante una sola inyección intracraneal en un hemisferio del cerebro. La presente descripción, incluida la presente invención, se basa, en parte, en el descubrimiento y la demostración de que la inyección de AAV-ASM de alto título en el cerebro enfermo resulta en la expresión de AAV-ASM dentro de múltiples sitios distales en un patrón consistente con la organización topográfica de las neuronas de proyección que inervan el sitio de inyección. La presente descripción, incluida la presente invención, se basa además, en parte, en el descubrimiento y la demostración de una extensa corrección de la patología por depósito lisosomal en el sitio de inyección y en todos los sitios distales a los que AAV-ASM fue transportado y en donde ASM fue expresado.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente descripción proporciona métodos para tratar trastornos neurometabólicos en mamíferos. Las poblaciones tratadas por los métodos de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a los pacientes que tienen o están en riesgo de desarrollar una LSD tales como los trastornos listados en la Tabla 1, en particular, si dicha enfermedad afecta al SNC. En un caso ilustrativo, la enfermedad es la enfermedad de Niemann-Pick A.

En un aspecto, los métodos descritos incluyen administrar al SNC de un sujeto afectado un vector viral de AAV que porta un transgén que codifica un producto terapéutico y permitir que el transgén sea expresado dentro del SNC distalmente del sitio de administración en un nivel terapéutico. En un caso ilustrativo, la administración se logra mediante inyección intraparenquimal directa de una disolución de vector de AAV de título elevado en el cerebro enfermo. Después de ello, el transgén se expresa distalmente, contralateralmente o ipsilateralmente al sitio de administración en un nivel terapéutico de al menos 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 mm del sitio de administración.

En otro aspecto, la presente descripción también proporciona un método para suministrar un genoma de AAV recombinante al núcleo de una neurona en peligro de enfermedad in vivo. En algunos casos, la patología celular exhibida por la neurona es la de una enfermedad por depósito lisosomal tales como los trastornos listados en la Tabla 1. En un caso ilustrativo, la enfermedad es una enfermedad de Niemann-Pick A. El método de suministrar un genoma de AAV recombinante al núcleo de una neurona en peligro de enfermedad comprende poner en contacto una terminación axonal de la neurona en peligro de enfermedad con una composición que comprende una partícula viral de AAV que comprende el genoma de AAV recombinante y permitir que la partícula viral sea endocitosada y transportada de forma retrógrada intracelularmente a lo largo del axón hacia el núcleo de la neurona. La concentración del vector en la composición es al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^9$ ut/ml); o (c) 5, 6, 7, 8; 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^{10}$ ui/ml). En determinados casos, la neurona es una neurona de proyección y/o la distancia de la terminación axonal al núcleo de la neurona es al menos 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 mm.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para suministrar un producto de transgén terapéutico a una célula diana del SNC, que es una neurona o una célula glial, a un mamífero afectado con un trastorno neurometabólico, p. ej., una LSD que afecta al SNC. El método incluye poner en contacto una terminación axonal de una neurona con una composición que contiene un vector de AAV que porta al menos una parte de un gen que codifica un producto de transgén terapéutico, permitiendo que la partícula viral sea endocitosada y transportada de forma retrógrada intracelularmente a lo largo del axón al núcleo de la neurona; permitiendo que el producto transgén terapéutico sea expresado y secretado por la neurona, y permitiendo que la célula diana absorba el producto transgén terapéutico, en el que el producto transgén terapéutico alivia de ese modo la patología en la célula diana. En determinados casos, la concentración del vector en la composición es al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^9$ ut/ml); o (c) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^{10}$ ui/ml)

En los métodos de la presente descripción, el transgén terapéutico codifica una molécula biológicamente activa, cuya expresión en el SNC da como resultado al menos una corrección parcial de la neuropatología. En algunos casos, el producto transgén terapéutico es una hidrolasa lisosomal. En un caso ilustrativo, la hidrolasa lisosomal es ASM. En otros casos, el transgén terapéutico es una metaloendopeptidasa, p. ej., neprililina.

Sobre la base de la descripción que está contenida en esta memoria, un primer aspecto de la presente invención proporciona una composición que comprende un vector de AAV que comprende un transgén que codifica una hidrolasa lisosomal, para uso en el tratamiento de una enfermedad por depósito lisosomal en un mamífero, en donde la composición se ha de administrar a un primer sitio en el SNC del mamífero y la concentración del vector en la composición es al menos 5×10^{12} gp/ml, de modo que la hidrolasa lisosomal es expresada en una cantidad terapéuticamente eficaz en un segundo sitio en el SNC que contiene neuronas que se proyectan al primer sitio y que está distal a y al menos a 2 mm de dicho primer sitio.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un vector de AAV que comprende un genoma de AAV recombinante que comprende un transgén que codifica una hidrolasa lisosomal, para la preparación de una composición para tratar una enfermedad por depósito lisosomal en un mamífero, en donde la composición se ha de poner en contacto con una terminación axonal de una neurona comprometida con la enfermedad, de modo que el vector de AAV es endocitosado y transportado de forma retrógrada intracelularmente a lo largo del axón de la neurona al núcleo de la neurona, y en donde la neurona es una neurona de proyección, y la distancia de la terminación axonal al núcleo es de al menos 2 mm.

Aspectos y realizaciones adicionales de la presente invención se recogen en las reivindicaciones adjuntas.

Ha de entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son solamente ilustrativas y explicativas y no son restrictivas de la invención según se reivindica.

45 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La **Figura 1A** muestra una representación de una sección transversal del cerebro de ratón ASMKO, a las 5 ó 15 semanas después de una inyección de 2 μ l de alto título ($9,3 \times 10^{12}$ gp/ml) de AAV-ASM en el hipocampo. El sitio de la inyección se muestra por una línea vertical; la expresión de ARNm de ASM, tal como se detecta por hibridación in situ, se representa por los círculos más pequeños; y la expresión de la proteína ASM, según se detecta por tinción inmunohistoquímica, se representa por los círculos sombreados más grandes. El patrón de expresión dio lugar a una extensa área de la inversión de la patología (representado por el sombreado claro) en el hipocampo y las regiones corticales en los dos hemisferios del cerebro.

5 La **Figura 1B** representa el transporte axonal de AAV a regiones distales del cerebro de ratón después de una inyección de AAV de alto título en el hipocampo tal como se describe para la Figura. 1A. La inyección en el hipocampo (10) dio como resultado el transporte axonal del vector viral a través del circuito intrahipocampal al hipocampo contralateral (20) y a través del circuito entorrinodentado al córtex entorrinal (30). El sitio de la inyección se muestra por una línea vertical.

10 La **Figura 1C** es un diagrama esquemático que muestra las conexiones de los circuitos intrahipocampal y entorrinodentado del cerebro de ratón. La inyección en el hipocampo (10) da lugar a la infección y la transducción de cuerpos de células ubicados en la zona del asta de Amón 3 (CA3) y en la capa de células granulares dentadas (G). Además, un subconjunto del vector de AAV inyectado infecta las terminaciones axonales de las neuronas de proyección que inervan el lugar de la inyección, se somete a un transporte axonal retrógrado y suministra el transgén al campo de CA3 (CA3) e hilio (H) en la parte contralateral del hipocampo (20), e ipsilateralmente y en el córtex entorrinal (30).

15 La **Figura 2A** muestra una representación de una sección transversal del cerebro de ratón ASMKO, a las 5 ó 15 semanas después de una inyección intrahipocampal de AAV-ASM de alto título tal como se describe en la Figura 1A. La expresión de ARNm de ASM, tal como se detecta por hibridación in situ, está representada por los círculos más pequeños; y la expresión de proteínas ASM, tal como se detecta por tinción inmunohistoquímica, está representada por los círculos sombreados más grandes. La inyección resultó en ARNm de ASM y la proteína a detectar en el septum. Este patrón de expresión dio lugar a una extensa zona de la inversión de la patología (representado por el sombreado claro).

20 La **Figura 2B** representa el transporte axonal de AAV a las regiones distales del cerebro de ratón, siguiendo un alto título de inyección en el hipocampo tal como se describe en la Figura 1A. La inyección en el hipocampo (10) dio como resultado el transporte axonal del vector viral a través del circuito septum-hipocampal desde el sitio de inyección (representado por una línea vertical) al septum (40).

25 La **Figura 2C** es un diagrama esquemático que muestra las conexiones del circuito septum-hipocampal. La inyección en el hipocampo dio lugar a la transducción de cuerpos celulares situados en el campo CA3 (11). Además, un subconjunto del vector de AAV infecta las terminaciones axonales de las neuronas de proyección que inervan el sitio de inyección, experimenta un transporte axonal retrógrado, y suministra el transgén al septum medial (40).

30 La **Figura 3** representa el transporte axonal de AAV en el circuito nigroestriatal, después de una inyección de alto título de AAV en el cuerpo estriado (50) del cerebro del ratón. El transporte axonal de AAV se produce desde el sitio de inyección (representado por una línea vertical) a la sustancia negra (60).

La **Figura 4** representa el transporte axonal de AAV en el circuito médulo-cerebelar, después de una inyección de alto título de AAV-ASM en el cerebelo (70) del cerebro de ratón ASMKO. El transporte axonal de AAV2 se produce desde el sitio de inyección (representado por una línea vertical) a la médula oblongada (80).

35 La **Figura 5** representa el transporte axonal de AAV en los circuitos intrahipocampal, nigroestriado y entorrinodentado después de una inyección de alto título de AAV7-ASM en el hipocampo ipsilateral (10). Se detectaron células transducidas, tal como se determina mediante hibridación in situ, a lo largo de todo el eje rostral-caudal del hipocampo contralateral (90), el septum medial (40) y el córtex entorrinal (100) después de la inyección de AAV7-ASM del hipocampo ipsilateral (representado por una línea vertical).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 Con el fin de que la presente descripción, que incluye la presente invención, pueda entenderse más fácilmente, se definen primero determinados términos y expresiones. Definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

45 El término "transgén" se refiere a un polinucleótido que se introduce en una célula y es capaz de ser expresado en condiciones apropiadas y confiere una propiedad deseada a una célula en la que se introdujo, o que conduce de otro modo a un resultado terapéutico deseado.

La expresión "partículas de genoma (gp)" o "equivalentes de genoma", tal como se utiliza con referencia a un título viral, se refiere al número de viriones que contienen el genoma de ADN de AAV recombinante, independientemente de la infectividad o la funcionalidad. El número de partículas de genoma de una preparación de vector particular se

puede medir por procedimientos tales como los descritos en los Ejemplos en esta memoria o, por ejemplo, en Clark et al. (1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) Mol. Ther., 6:272-278.

Las expresiones "unidad de infección (ui)", "partícula infecciosa" o "unidad de replicación", tal como se utilizan en referencia a un título viral, se refieren al número de partículas de vector de AAV recombinante infecciosas y competentes para la replicación según se mide por el ensayo de centro infeccioso, también conocido como ensayo del centro de replicación tal como se describe, por ejemplo, en McLaughlin et al. (1988) J. Virol, 62:1963-1973.

La expresión "unidad de transducción (ut)", tal como se utiliza con referencia a un título viral, se refiere al número de partículas de vectores de AAV recombinantes infecciosas que resultan en la producción de un producto transgénico funcional tal como se mide en ensayos funcionales tales como los descritos en los Ejemplos en esta memoria o, por ejemplo, en Xiao et al. (1997) Exp. Neurobiol, 144:113-124; o en Fisher et al. (1996) J. Virol, 70:520-532 (ensayo LFU).

El término "terapéutico", la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" y sus afines se refieren a la cantidad de un compuesto que resulta en la prevención o retraso de la aparición o mejora de síntomas de un trastorno neurometabólico en un sujeto o un logro de un resultado biológico deseado tal como la corrección de una neuropatología, p. ej., una patología celular asociada con una enfermedad de almacenamiento lisosomal tal como se describe en esta memoria o en Walkley (1998) Brain Pathol., 8:175-193. La expresión "corrección terapéutica" se refiere al grado de corrección que se traduce en la prevención o el retraso de la aparición o la mejora de síntomas de trastorno metabólico en un sujeto. La cantidad eficaz se puede determinar por métodos bien conocidos en la técnica y tal como se describe en las secciones siguientes.

Métodos y composiciones

En los experimentos que conducen a la presente descripción, que incluye la presente invención, se utilizaron ratones (ASMKO) inactivados con esfingomielinasa ácida (ASM). Los ratones ASMKO se han descrito previamente y son un modelo aceptado de la enfermedad de Niemann-Pick de los tipos A y B (Horinouchi et al. (1995) Nat. Genetics, 10:288-293; Jin et al. (2002) J. Clin. Invest., 109: 1183-1191; y Otterbach (1995) Cell, 81:1053-1061). La enfermedad de Niemann-Pick (NPD) se clasifica como una enfermedad por depósito lisosomal y es un trastorno neurometabólico heredado, caracterizado por una deficiencia genética en esfingomielinasa ácida (ASM; esfingomielina colinefosfohidrolasa, EC 3.1.3.12). La falta de proteína ASM funcional resulta en la acumulación de sustrato de esfingomielina dentro de los lisosomas de las neuronas y la glía a lo largo del cerebro. Esto conduce a la formación de grandes números de lisosomas distendidos en el pericarion, que es un rasgo distintivo y el fenotipo celular primario de tipo A NPD. La presencia de lisosomas distendidos se correlaciona con la pérdida de la función celular normal y un curso neurodegenerativo progresivo que conduce a la muerte del individuo afectado en la infancia temprana (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases, comps. Scriver et al., McGraw-Hill, Nueva York, 2001, págs. 3589-3610). Fenotipos celulares secundarios (p. ej., alteraciones metabólicas adicionales) están también asociados con esta enfermedad, de manera notable la acumulación de alto nivel de colesterol en el compartimiento lisosomal. La esfingomielina tiene una fuerte afinidad por el colesterol, lo que resulta en el secuestro de grandes cantidades de colesterol en los lisosomas de ratones ASMKO y pacientes humanos (Leventhal et al. (2001) J. Biol. Chem., 276:44976-44983; Slotte (1997) Subcell. Biochem., 28:277-293; y Viana et al. (1990) J. Med. Genet., 27:499-504).

La presente descripción, incluida la presente invención, se basa, en parte, en el descubrimiento y la demostración de que una inyección intrahipocámpal de AAV-ASM de alto título en los cerebros enfermos de ratones ASMKO resulta en la expresión de ARNm de ASM y de la proteína distalmente desde el sitio de inyección en un patrón consistente con la organización topográfica de las neuronas de proyección que inervan el sitio de inyección. Además de la expresión robusta en el sitio de inyección, ARNm de ASM y proteína también se detectan en varias regiones distales por fuera del hipocampo ipsilateral (inyectado), específicamente en el giro dentado del hipocampo contralateral y CA3, y el septum medial y el córtex entorrinal. La presente descripción, incluida la presente invención, se basa, en parte, en el descubrimiento y la demostración de la extensa corrección de la patología por depósito lisosomal en los sitios distales, permitiendo así un mayor volumen de corrección a través de un menor número de sitios de inyección.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente descripción proporciona métodos para el tratamiento de trastornos neurometabólicos en mamíferos. Las poblaciones tratadas por los métodos de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a pacientes que tienen o están en riesgo de desarrollar un trastorno neurometabólico, p. ej., una LSD, tales como las enfermedades listadas en la Tabla 1, particularmente si una enfermedad de este tipo afecta al SNC. En un caso ilustrativo, la enfermedad es una enfermedad de Niemann-Pick de tipo A. En determinados casos, los trastornos neurometabólicos pueden excluir las enfermedades Alzheimer, Parkinson, Huntington, de Tay Sachs, de

Lesch-Nyan y de Creutzfeldt-Jakob. Sin embargo, los métodos de la presente descripción que utilizan una metaloendopeptidasa como un transgén terapéutico están dirigidos específicamente al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y trastornos relacionados con el amiloide.

5 En algunos casos, el método de tratar un trastorno neurometabólico comprende la administración de un vector de AAV alto título que porta un transgén terapéutico, de modo que el producto de transgén es expresado a un nivel terapéutico en un segundo sitio dentro del SNC, distal al primer sitio. En algunos casos, el título viral de la composición es de al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^9$ ut/ml); o (c) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^{10}$ ui/ml). En casos adicionales, la administración se lleva a cabo mediante inyección parenquimal directa de una disolución del vector de AAV de alto título en el cerebro enfermo, después de ello el transgén es expresado en distal, contralateral o ipsilateralmente al sitio de administración a un nivel terapéutico de al menos 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 mm del sitio de administración.

15 La distancia entre el primer y el segundo sitio se define como la región de mínima distancia entre el sitio de administración (primer sitio) y el límite de la transducción detectable del sitio distal (segundo sitio), tal como se mide utilizando procedimientos conocidos en la técnica o tal como se describe en los Ejemplos, p. ej., hibridación in situ. Algunas neuronas en el SNC de mamíferos superiores pueden abarcar grandes distancias en virtud de sus proyecciones axonales. Por ejemplo, en los seres humanos, algunos axones pueden abarcar una distancia de 1000 mm o mayor. Por lo tanto, en diversos métodos de la presente descripción, el AAV puede ser transportado axonalmente a lo largo de toda la longitud del axón a una distancia tal que alcance y transduzca al cuerpo de la célula madre.

20 Un sitio de la administración del vector dentro del SNC se elige en base a la región diana deseada de neuropatología y la topología de los circuitos del cerebro implicados, en la medida en que el sitio de administración y la región diana tengan conexiones axonales. La región diana se puede definir, por ejemplo, utilizando coordenadas estereotáxicas 3-D. En algunos casos de la presente descripción, p. ej., en algunas realizaciones de la presente invención, el sitio de administración se elige de modo que al menos 0,1, 0,5, 1,5 ó 10% de la cantidad total de vector inyectada sea suministrada distalmente a la región diana de al menos 1, 200, 500 ó 1000 mm³. Un sitio de administración puede estar localizado en una región inervada por neuronas de proyección que conectan regiones distales del cerebro. Por ejemplo, la sustancia negra y el área tegmental ventral envían proyecciones densas al caudado y putamen (colectivamente conocido como el cuerpo estriado). Las neuronas dentro de la sustancia negra y el tegmento ventral pueden ser fijadas como objetivo para la transducción mediante el transporte retrógrado de AAV después de la inyección en el cuerpo estriado. Como otro ejemplo, el hipocampo recibe proyecciones axonales predecibles, bien definidas, de otras regiones del cerebro. Otros sitios de administración pueden estar situados, por ejemplo, en la médula espinal, bulbo raquídeo (médula y puente de Varolio), mesencéfalo, cerebelo, diencefalo (tálamo, hipotálamo), telencéfalo (cuerpo estriado, corteza cerebral o dentro del córtex, los lóbulos occipital, temporal, parietal o frontal), o combinaciones de los mismos.

35 Para la identificación de estructuras en el cerebro humano, véase, p. ej., *The Human Brain: Surface, Three-Dimensional Sectional Anatomy With MRI, and Blood Supply*; 2^a ed., comps. Deuteron et al, Springer Vela, 1999; *Atlas Atlas of the Human Brain*, comps. Mai et al., Academic Press; 1997; y *Co-Planar Sterotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging*, comps. Tamarack et al., Thyme Medical Pub., 1988. Para la identificación de estructuras en el cerebro de ratón, véase, p. ej., *The Mouse Brain in Sterotaxic Coordinates*, 2^a ed., Academic Press, 2000. Si se desea, la estructura del cerebro humano se puede correlacionar con estructuras similares en el cerebro de otro mamífero. Por ejemplo, la mayoría de los mamíferos, incluyendo seres humanos y roedores, muestran una organización topográfica similar a las proyecciones del hipocampo entorrinales, con neuronas en la parte lateral de la corteza entorrinal tanto lateral como media que se proyecta a la parte dorsal o el polo septal del hipocampo, mientras que la proyección al hipocampo ventral se origina principalmente de neuronas en partes medias de la corteza entorrinal (*Principles of Neural Science*, 4^a ed., comps. Kandel et al., McGraw-Hill, 1991; *The Rat Nervous System*, 2^a ed., ed. Paxinos, Academic Press, 1995). Además, las células de la capa II de la corteza entorrinal se proyectan hacia el giro dentado y terminan en los dos tercios exteriores de la capa molecular del giro dentado. Los axones de las células de la capa III se proyectan bilateralmente a las zonas del cuerno de Amón CA1 y CA3 del hipocampo, terminando en la capa molecular del estrato lagunoso.

50 El segundo sitio (diana) puede estar situado en cualquier región del SNC, incluyendo el cerebro y la médula espinal, que contiene a las neuronas que se proyectan hacia el primer sitio (de administración). En algunos casos de la presente descripción, p. ej. en algunas realizaciones de la presente invención, el segundo sitio está en una región del SNC elegido de la sustancia negra, la médula oblonga o la médula espinal.

Para suministrar el vector específicamente a una región particular del sistema nervioso central, especialmente a una región particular del cerebro, puede ser administrado mediante microinyección estereotáxica. Por ejemplo, en el día de la cirugía, los pacientes tendrán la base del marco estereotáxico fijada en su lugar (atornillada en el cráneo). El cerebro con la base del marco estereotáxico (compatible con MRI con las marcas fiduciarias) será representado en imágenes utilizando MRI de alta resolución. Las imágenes de MRI serán entonces transferidas a un ordenador que ejecuta el software estereotáxico. Se utilizará una serie de imágenes coronales, sagitales y axiales para determinar el sitio diana de la inyección del vector, y la trayectoria. El software traduce directamente la trayectoria en coordenadas tridimensionales apropiadas para el marco estereotáxico. Se practican orificios de trepanación por encima del sitio de entrada y el aparato estereotáxico localizado con la aguja implantada a la profundidad determinada. Después se inyectará el vector en un soporte farmacéuticamente aceptable. El vector de AAV es entonces administrado mediante inyección directa al sitio diana principal y es transportado de forma retrógrada a los sitios diana distales a través de los axones. Se pueden utilizar vías de administración adicionales, p. ej., la aplicación cortical superficial bajo visualización directa, u otra aplicación no estereotáxica.

El volumen total de material a administrar y el número total de partículas de vector a ser administradas serán determinados por los expertos en la técnica en base a aspectos conocidos de la terapia génica. La eficacia y seguridad terapéutica pueden ser sometidas a ensayo en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, existe una diversidad de modelos animales bien caracterizados para las LSDs, p. ej., tal como se describe en esta memoria o en Watson et al. (2001) *Methods Mol. Med.*, 76:383-403; o Jeyakumar et al. (2002) *Neuropath. Appl. Neurobiol.*, 28:343-357.

En ratones experimentales, el volumen total de disolución de AAV inyectado oscila, por ejemplo, entre 1 y 5 μ l. Para otros mamíferos, incluyendo el cerebro humano, los volúmenes y las tasas de suministro se incrementan apropiadamente. Por ejemplo, se ha demostrado que volúmenes de 150 μ l se pueden inyectar de forma segura en el cerebro de primates (Janson et al. (2002) *Hum. Gene Ther.*, 13:1391-1412). El tratamiento puede consistir en una sola inyección por sitio diana, o se puede repetir a lo largo del tracto de inyección, si es necesario. Se pueden utilizar múltiples puntos de inyección. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente descripción, además del primer sitio de administración, una composición que comprende AAV que porta un transgén se administra a otro sitio que puede ser contralateral o ipsilateral al primer sitio de administración.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método de suministrar un genoma de AAV recombinante mediante el transporte axonal retrógrado al núcleo de una neurona comprometida con la enfermedad in vivo. En algunos casos, la patología celular exhibida por una neurona es la de una LSD tal como se lista en la Tabla 1 (véase, p. ej., Walleley (1998) *Brain Pathol.*, 8:175-193). En un caso ilustrativo; la enfermedad es la enfermedad de Niemann-Pick A. El método de suministrar un genoma de AAV recombinante al núcleo de una neurona comprometida con la enfermedad comprende poner en contacto una terminación axonal de una neurona comprometida con la enfermedad con una composición que comprende una partícula viral AAV que comprende el genoma de AAV recombinante y permitir que la partícula viral sea endocitosada y transportada intracelularmente de forma retrógrada a lo largo del axón hacia el núcleo de la neurona, en donde la concentración de genomas de AAV en la composición es al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^9$ ut/ml); o (c) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^{10}$ ui/ml). En determinados casos, la neurona es una neurona de proyección y/o la distancia desde la terminación axonal hasta el núcleo de la neurona es al menos 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 mm. En diversos casos, el genoma de AAV es transportado a lo largo de toda la longitud del axón, a distancias que varían dependiendo de la longitud del axón. En seres humanos, estas distancias pueden ser tanto como 1000 mm o mayores.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método de suministrar un producto de transgén a una célula diana del SNC, que es una neurona o una célula glial, en un mamífero afectado por un trastorno neurometabólico, p. ej., una LSD tal como está listada en la Tabla 1. El método comprende poner en contacto una terminación axonal de una neurona con una composición que comprende un vector de AAV que porta al menos una parte de un gen que codifica un producto de transgén terapéutico; permitir que las partículas virales sean endocitosadas y transportadas intracelularmente de forma retrógrada a lo largo del axón al núcleo de la neurona; permitir que el producto de transgén sea expresado y secretado por la neurona; y permitir que una segunda célula recoja el producto transgénico, en donde el producto transgénico alivia de ese modo la patología en la segunda célula. En algunos casos, la concentración del vector de AAV en la composición es al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^9$ ut/ml); o (c) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^{10}$ ui/ml). Por ejemplo, hidrolasas lisosomales pueden ser secretadas por las células transducidas y recogidas subsiguientemente por otra célula a través de endocitosis mediada por el receptor de manosa-6-fosfato, siendo transducida o no transducida la segunda célula (Sando et al. (1977) *Cell*, 12:619-627; Taylor et al. (1997) *Nat. Med.*, 3:771-774; Miranda et al. (2000) *Gene Ther.*, 7:1768-1776; y Jin et al. (2002) *J. Clin. Invest.*, 109:1183-1191).

En los métodos de la presente descripción, se puede utilizar el AAV de cualquier serotipo siempre y cuando el vector sea capaz de experimentar un transporte axonal retrógrado en un cerebro comprometido con la enfermedad. El serotipo del vector viral utilizado en determinadas realizaciones de la invención se selecciona del grupo que consiste en AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 y AAV8 (véase, p. ej., Gao et al. (2002) PNAS, 99:11854-11859; y Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, comp. Machida, Humana Press, 2003). Se pueden utilizar otros serotipos además de los mencionados en esta memoria. Sin embargo, AAV5 puede ser excluido específicamente de los métodos de la presente descripción utilizando una metaloendopeptidasa, p. ej., nerilisin, como un transgén terapéutico.

Vectores de AAV se derivan de parvovirus de ADN de cadena sencilla (ss) que son no patógenos para los mamíferos (revisado en Muzyscka (1992) Curr. Top. Microb. Immunol, 158:97-129). En síntesis, vectores basados en AAV tienen los genes virales rep y cap que representan el 96% del genoma viral separado, dejando a las dos repeticiones terminales invertidas (ITRs) flanqueantes de 145 pares de bases (pb), que se utilizan para iniciar la replicación del ADN viral, el empaquetamiento y la integración. En ausencia de virus helper, el AAV de tipo salvaje se integra en el genoma de la célula huésped humana con preferencial especificidad para el sitio en el cromosoma 19q 13.3, o puede permanecer expresado de forma episomal. Una sola partícula de AAV puede alojar hasta 5 kb de ADNss, por lo tanto dejando aproximadamente 4,5 kp para un transgén y elementos reguladores, lo cual es típicamente suficiente. Sin embargo, los sistemas de trans-corte y empalme tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 6.544.785, puede casi duplicar este límite.

En un caso ilustrativo de la presente descripción, p. ej., en una realización ilustrativa de la presente invención, AAV es AAV2. Virus adeno-asociados de muchos serotipos, especialmente AAV2, han sido ampliamente estudiados y caracterizados como vectores de terapia génica. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con la preparación de vectores de la terapia génica basados en AAV, funcionales. Numerosas referencias a diversos métodos de producción, purificación y preparación de AAV para la administración a sujetos humanos se pueden encontrar en el extenso cuerpo de la bibliografía publicada (véase, p. ej., Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, comp. Machida, Humana Press, 2003). Adicionalmente, la terapia génica basada en AAV dirigida a células del SNC se ha descrito en las Patentes de Estados Unidos N°s 6.180.613 y 6.503.888.

En determinados métodos de la presente descripción, el vector comprende un transgén enlazado operativamente a un promotor. El transgén codifica una molécula biológicamente activa, cuya expresión en el SNC da como resultado al menos una corrección parcial de la neuropatología. En algunos casos, el transgén codifica una hidrolasa lisosomal. En un caso ilustrativo, la hidrolasa lisosomal es ASM. Se han publicado las secuencias de ADNc genómicas y funcionales de ASM humana (véanse, p. ej., las Patente de Estados Unidos N°s 5.773.278 y 6.541.218). Otras hidrolasas lisosomales se pueden utilizar para enfermedades apropiadas, por ejemplo, tal como se listan en la Tabla 1.

La presente descripción proporciona, además, métodos de tratar la enfermedad de Alzheimer en mamíferos, incluyendo seres humanos. En métodos de este tipo, el transgén codifica una metaloendopeptidasa.

La metaloendopeptidasa puede ser, por ejemplo, la enzima degradadora del beta-amiloide neprilisin (EC 3.4.24.11; número de acceso de secuencia, p. ej., P08473 (SWISS-PROT)), la enzima degradadora de insulina insulisin (CE 3.4.24.56; número de acceso de secuencia, p. ej., P14735 (SWISS-PROT)), o la timet oligopeptidasa (EC 3.4.24.15; número de acceso de secuencia, p. ej., P52888 (SWISS-PROT)).

El nivel de expresión de los transgenes en las células eucariotas está determinado en gran medida por el promotor transcripcional dentro de la casete de expresión del transgén. Promotores que muestran actividad a largo plazo y que son específicos para tejidos e incluso las células se utilizan en algunos casos de la presente descripción, p. ej., en algunas realizaciones de la presente invención. Ejemplos no limitantes de promotores incluyen, pero no se limitan al promotor de citomegalovirus (CMV) (Kaplitt et al. (1994) Nat. Genet., 8:148-154), el promotor de CMV/ β 3-globina humana (Mandel et al (1998) J. Neurosci., 18:4271-4284), el promotor de GFAP (Xu et al. (2001) Gene Ther., 8:1323-1332), el promotor de enolasa específica para neuronas (NSE) de 1,8 kb (Klein et al. (1998) Exp. Neurol., 150:183-194), el promotor de beta actina de pollo (CBA)(Miyazaki (1989) Gene, 79:269-277) y el promotor de β -glucuronidasa (GUSB) (Shiple et al. (1991) Genetics, 10:1009-1018). Para prolongar la expresión, otros elementos reguladores pueden, adicionalmente, ser enlazados operativamente al transgén tal como, p. ej., el Elemento Post-Regulador del Virus de la Hepatitis de la Marmota (WPRE) (Donello et al. (1998) J. Virol., 72, 5085-5092) o el sitio de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH).

Para algunas aplicaciones de terapia génica del SNC, será necesario controlar la actividad transcripcional. Para este fin, la regulación farmacológica de la expresión génica con vectores de AAV se puede obtener mediante la inclusión

de diversos elementos reguladores y promotores de respuesta a los fármacos tal como se describe, por ejemplo, en Haberman et al. (1998) *Gene Ther.*, 5:1604-16011; y Ye et al. (1995) *Science*, 283: 88- 91.

Se pueden producir preparaciones de AAV de alto título utilizando técnicas conocidas en la técnica, p. ej., tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.658.776 y *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, comp. Machida, Humana Press, 2003.

Los siguientes ejemplos proporcionan realizaciones ilustrativas de la invención. Un experto ordinario en la técnica reconocerá que pueden realizarse numerosas modificaciones y variaciones. Los ejemplos no limitan en modo alguno la invención.

EJEMPLOS

10 Titulación de Vectores Recombinantes

Los títulos de vectores de AAV se midieron de acuerdo con el número de copias del genoma (partículas de genoma por mililitro). Las concentraciones de partículas de genoma se basaron en la PCR Taqman® del ADN del vector tal como se informó previamente (Clark et al. (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278). En síntesis, AAV-ASM purificada se trató con tampón de digestión de la cápside (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 1,0 mM, SDS al 0,5%, 1,0 mg/ml de proteinasa K) a 50°C durante 1 hora para liberar ADN del vector. Las muestras de ADN fueron sometidas a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que se reasocian a secuencias específicas en el ADN del vector, tal como la región del promotor, el transgén o la secuencia poli A. Los resultados de la PCR fueron entonces cuantificados mediante un software en Tiempo-real Taqman® tal como el proporcionado por el Sistema Detector de la Secuencia Prism 7700 de Perkin Elmer-Applied Biosystems (Foster City, CA).

Los vectores que portan un gen marcador ensayable tal como el gen β -galactosidasa o de la proteína verde fluorescente GFP) se puede titular utilizando un ensayo de infectividad. Células susceptibles (p. ej., células HeLa o COS) se transducen con el AAV y se realiza un ensayo para determinar la expresión génica tal como la tinción de células transducidas con el vector de β -galactosidasa con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) o microscopía de fluorescencia células transducidas con GFP. Por ejemplo, el ensayo se realiza de la siguiente manera: 4×10^4 células HeLa se siembran en cada uno de los pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos utilizando medio de crecimiento normal. Después de la unión, es decir, aproximadamente 24 horas más tarde, las células son infectadas con Ad tipo 5 a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 y son transducidas con diluciones en serie del vector empaquetado y son incubadas a 37°C. Uno a tres días más tarde, antes de que se observen extensos efectos citopáticos, se realiza el ensayo apropiado en las células (p. ej., tinción con X-gal microscopía de fluorescencia). Si se utiliza un gen informador tal como β -galactosidasa, las células se fijaron en paraformaldehído al 2%, glutaraldehído al 0,5% y se tiñen para la actividad de β -galactosidasa utilizando X-gal. Se cuentan las diluciones del vector que dan células bien separadas. Cada una de las células positivas representa 1 unidad de transducción (ut) del vector.

35 Corrección de la patología de LSD en el cerebro de ratón

Ratones ASMKO de diez semanas de edad contienen una patología NPD significativa en el sistema nervioso central. La identificación de mutantes homocigotos recesivos se verificó mediante PCR. Dieciséis ratones ASMKO de 10 semanas de edad fueron anestesiados con isoflurano y montados en un marco estereotáxico, se practicó una incisión para exponer el cráneo subyacente, y se realizó un agujero sobre un hemisferio de cada uno de los ratones. Dos microlitros de AAV2-CMV-ASM de alto título ($9,3 \times 10^{12}$ gp/ml) (Targeted Genetics, Seattle, WA) se inyectaron en el hipocampo a una coordenada estereotáxica final de 2,0 mm rostral del bregma, 1,5 mm derecha de la línea media y 2,0 mm ventral de la superficie pial. Estas coordenadas del hipocampo aseguraron que vector de AAV2 quedara expuesto a las neuronas del giro dentado y de la zona 3 del cuerno de Amón (CA3), así como a las terminaciones axonales de las neuronas de proyección del hipocampo contralateral, septum medial y córtex entorrinal. Las inyecciones se realizaron a una tasa de 0,2 μ l/minuto, y se administró un total de $1,86 \times 10^{10}$ partículas genómicas a cada uno de los cerebros. Los ratones fueron después sacrificados a las 5 (n = 8) o 15 (n = 8) semanas post-inyección (pi). Ocho cerebros (n = 4 cada uno a las 5 y 15 semanas pi) se analizaron en cuanto a ARNm de ASM y la distribución de proteínas, y para la reducción de los niveles suprafisiológicos de colesterol en los lisosomas. Los restantes 8 cerebros (n = 4 cada uno a las 5 y 15 semanas pi) fueron procesados para la histopatología para analizar la corrección de los lisosomas acumulados y distendidos, que es el método más directo y preciso para determinar la patología inversa por depósito para las LSDs.

Se detectó una transducción robusta en el hipocampo inyectado (ipsilateral) a las 5 y 15 semanas pi. La capa de células granulares y el hilio del giro dentado, y las capas de células piramidales y oriens de CA3 fueron ampliamente transducidas por el vector de AAV2. Este patrón de impresión de la transducción se extendió a otras regiones del hipocampo ipsilateral tal como el subículo y las zona 1 (CA1) y 2 (CA2) del cuerno de Amón. La inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal anti-ASM humano confirmó la presencia de proteína ASM en muchas células. El patrón general de proteínas era similar al patrón de ARNm, con alguna propagación localizada adicional de proteína.

ARNm de ASM humana y proteína también se detectaron en regiones fuera del hipocampo ipsilateral en ambos instantes. El giro dentado contralateral y CA3, y el septum medial y el córtex entorrinal eran positivos para la hibridación in situ y la inmunofluorescencia (Figuras 1A y 2A). El patrón de la transducción en estos sitios distales era consistente con la organización topográfica de las neuronas de proyección que inervan el sitio de inyección (Figuras 1B y 2B). Esto demostró que AAV2 fue sometido a un transporte axonal retrógrado en los circuitos intrahipocampal, septohipocampal y entorrinodentado de cerebros ASMKO, y que el vector viral fue dirigido al núcleo después del transporte hasta los axones (Figuras 1C y 2C). El patrón de la transducción no soporta una difusión parenquimal como la razón para el transporte de AAV2 a estos sitios distales. Si se había producido una difusión de este tipo, habrían quedado expuestas a virus migratorios estructuras entre los sitios inyectado y distal. Pero estas estructuras intermedias eran negativas para la hibridación in situ. Por ejemplo, el cuerpo estriado, que posee un fuerte tropismo natural para AAV2; era negativo para la transferencia de genes, a pesar de estar en la trayectoria directa entre el hipocampo y el septum medial. Por lo tanto, la transferencia de genes a los sitios distales debe haber surgido por transporte axonal retrógrado, lo que indica que una neurona de proyección afectada puede funcionar como un sistema de transporte por autopista efectivo para el movimiento de AAV2 a través de un cerebro enfermo.

Se investigó adicionalmente la capacidad de ASM de invertir las anomalías de colesterol en el cerebro ASMKO. Filipina es una molécula autofluorescente aislada de *Streptomyces filipinensis* que se une a complejos de colesterol (Leventhal et al. (2001) J. Biol. Chem., 276:44976-44983; y Sarna et al. (2001) Eur. J. Neurosci., 13,1-9). Cerebros ASMKO no inyectados tenían altos niveles de tinción con filipina debido a estos complejos de colesterol abundante, mientras que los cerebros normales de ratones no producían tinción con filipina.

La inyección de AAV2-CMV-ASM resultó en la pérdida completa de la tinción con filipina a lo largo de todo el hipocampo ipsilateral y contralateral, el septum y el córtex entorrinal a las 5 y 15 semanas pi de ratones ASMKO (Figuras 1A y 2A). Esto estaba en marcada contraposición con controles ASMKO no inyectados emparentados en edad, en donde los altos niveles de tinción con filipina se detectaron en estas mismas estructuras. La pérdida de la tinción con filipina en cerebros inyectados con AAV2 demuestra que se corrigió un fenotipo celular secundario (p. ej., defecto metabólico) de la enfermedad ASM. Esto sugiere considerablemente que la proteína ASM fue fijada como objetivo del lisosoma e interactuó con el complejo de esfingomielina-colesterol. Esta interacción dio probablemente como resultado la liberación de colesterol a partir de esfingomielina, y la subsiguiente entrada de colesterol en sus vías biológicas normales (tales como la degradación o la translocación a la membrana plasmática (Leventhal et al. (2001) J. Biol. Chem., 276:44976-44983)).

Se observó una pérdida de tinción con filipina en todas las capas de células y subcampos de los circuitos intrahipocampal, septohipocampal y entorrinodentado. El área de la corrección de colesterol era mucho mayor y más extensa que el patrón de proteínas ASM. Esto indica que, tras el transporte axonal retrógrado de AAV2, las neuronas de proyección pueden haber funcionado como "bombas de enzimas" y pueden haber secretado proteína ASM en el tejido circundante. De manera significativa, sólo se necesita una pequeña cantidad de ASM para tener un efecto terapéutico sobre la acumulación de colesterol en las células afectadas por ASMKO, una cantidad por debajo del límite de detección del protocolo de inmunofluorescencia.

También se evaluó si el transporte axonal del vector de AAV2-ASM da como resultado la corrección del fenotipo celular primario de NPD. La histopatología de secciones de cerebro de una micra de espesor demostró una notable reducción de patología lisosomal acumulada y distendida en los cerebros inyectados con CMV-ASM-AAV2 a las 5 semanas pi (Tabla 2). La inversión de la patología que resulta en la restauración parcial o completa de la arquitectura celular normal se produjo en todas las regiones de los hemisferios ipsilateral y contralateral del hipocampo. El septum medial y el córtex entorrinal también mostraron una reducción sustancial en las lesiones por depósito. De manera similar a los datos de filipina, el número de células corregidas era mayor y estaba más extendido que el patrón de proteínas ASM. La inversión de la patología era evidente dentro de las regiones que se conoce que se proyectan al hipocampo, incluyendo los circuitos intrahipocampal, septohipocampal y entorrinodentado. En general, el volumen de la corrección era de 30-35 mm³ o más en el hipocampo contralateral, de 5-8 mm³ o más en el córtex entorrinal ipsilateral, de 1-2 mm³ o más en el córtex entorrinal contralateral y de 2-3 mm³ o más en el septum medial. Esto apoya además que el transporte axonal del vector viral era el responsable de este efecto terapéutico, debido a que las estructuras cercanas (que no contribuyen en estos circuitos) habrían sido

corregidas si la distribución viral era mediada meramente por la difusión (véase, "cuerpo estriado ipsilateral" y "cuerpo estriado contralateral" en la Tabla 2).

5 Para demostrar que la inversión de la patología era específica para ASM, se inyectó a un grupo adicional de ratones ASMKO un vector de control que porta un gen informador, AAV2-CMV-β-gal (n = 2 en cada caso a las 5 y 15 semanas pi), y se procesó para la histopatología. En los cuatro cerebros las células permanecieron inundados con lisosomas distendidos, y contenían otras anomalías como la expansión citoplasmática y capas celulares desorganizadas.

Tabla 2

<i>Región del Cerebro</i>	<i>No tratado</i>	<i>Tratado con AAV2-ASM</i>
Hipocampo ipsilateral		
Campo 1	++++	+
Campo 3	++++	+
Capa de Células Granulares Dentadas	++++	+
Hilio	++++	+
Hipocampo contralateral		
Campo 1	++++	+
Campo 3	++++	+
Capa de Células Granulares Dentadas	++++	+
Hilio	++++	+
Córtex Ipsilateral Entorrinal	++++	++
Córtex Contralateral Entorrinal	++++	+++
Septum Ipsilateral Medial	++++	++
Septum Contralateral Medial	++++	++
Cuerpo Estriado Ipsilateral	++++	++++
Cuerpo Estriado Contralateral	++++	++++

- 10
- ++++ alto nivel de patología virtualmente en todas las células
 - +++ patología en muchas células, la corrección se observa en algunas células
 - ++ patología en algunas células, la corrección se observa en muchas células
 - + poca o ninguna patología en la mayoría de las células, virtualmente cada una de las células es corregida

15 Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, una sola inyección de vector de AAV2 de alto título es suficiente para transferir el gen ASM a las estructuras que inervan el hipocampo afectado por ASMKO. El número de estructuras positivas para el vector de AAV2 era mayor que el demostrado por un estudio reciente en el hipocampo de ratas normales, que mostró un transporte axonal sólo en el circuito entorrinodentado (Kaspar et al (2002) Mol. Ther., 5:50-56). Los resultados descritos en esta memoria demuestran que el transporte axonal puede producirse en las neuronas de proyección a las que se infligió una patología por depósito, y que este modo de transporte resulta en el aclaramiento de la patología por depósito en las estructuras proximales y múltiples regiones distales al sitio de inyección. Los autores de la invención demuestran también que el transporte axonal no se limita sólo a los circuitos asociados con el hipocampo. Se produce un transporte axonal retrógrado en los circuitos nigroestriatal (Figura 3) y medulocerebelar (Figura 4). Esto demuestra que el transporte axonal de AAV2 en las neuronas comprometidas con la enfermedad es una propiedad general del vector viral.

25 Se llevó a cabo un estudio similar con AAV1-ASM a las concentraciones de $1-4 \times 10^{13}$ gp/ml y AAV7-ASM a la concentración de $8,4 \times 10^{12}$ gp/ml. Mientras que AAV1 no exhibía un transporte axonal retrógrado detectable, AAV7 sufrió un transporte axonal retrógrado, similar a AAV2, y produjo una corrección de la patología de LSD en regiones distales (véase la Figura 5).

Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la acumulación de péptido β -amiloide (A β) debido al catabolismo reducido de A β . A medida que se acumula A β , éste se agrega en placas extracelulares, provocando un deterioro de la función sináptica y la pérdida de neuronas. La patología conduce a la demencia, pérdida de coordinación y muerte.

5 Neprilisina es una metaloendopeptidasa de zinc de 97 kD unida a la membrana que es la enzima limitante de la velocidad en la degradación normal de A β . La introducción de neprilisina puede desacelerar el progreso de la enfermedad al separar agrupaciones de A β antes de la agregación. De hecho, se demostró que neprilisina degrada formas oligoméricas de A β , separando de este modo las placas existentes en un modelo animal de AD (Kanemitsu et al. (2003) *Neurosci. Lett.*, 350:113-116). R ratones inactivados con neprilisina exhiben altos niveles de A β (Iwata et al. (2001) *J. Neurosci.*, 24:991-998). Inhibidores de neprilisina tales como tiorfano y fosforamidón aumentan los niveles de A β , en cerebro de ratón (Iwata et al. (2000) *Nat. Med.*, 6:143-150). Adicionalmente, se encontraron niveles reducidos de ARNm de neprilisina en zonas de alta carga de placa amiloide en cerebros humanos, lo que demuestra adicionalmente la relación entre neprilisina y la AD (Yasojima et al. (2001) *Neurosci. Lett.*, 297:97-100).

15 Las zonas del cerebro más afectadas por la AD son el hipocampo, el córtex, el cerebelo, el cuerpo estriado y el tálamo (véase, p. ej., Iwata et al (2001) supra; Yasojima et al. (2001) supra). Estas son las mismas zonas del cerebro que muestran un eficiente transporte axonal retrógrado con AAV.

Por consiguiente, AAV puede utilizarse para suministrar transgenes terapéuticos a regiones de alta carga de placa, mediante inyección directa y subsiguiente translocación de virus a través de los circuitos del cerebro a nuestros sitios de destino. La transferencia de genes mediada por el vector viral de neprilisina era efectiva en el tratamiento de modelos de ratones de la AD (Marr et al. (2003) *J. Neurosci.*, 23:1992-1996; Marr et al. (2004) *J. Mol. Neurosci.*, 22:5-11; Iwata et al. (2004) *J. Neurosci.*, 24:991-998). Un informe reciente demostró que AAV5-neprilisina separaba A β de los terminales presinápticos del hipocampo en ratones deficientes en neprilisina, desacelerar la formación de placas en las sinapsis (Iwata et al. (2004) supra). En este informe, se encontró neprilisina en el hipocampo contralateral, pero sigue desconociéndose si esto es atribuible al transporte retrógrado de virus o al transporte anterógrado de la proteína expresada.

La memoria descriptiva se entiende más a fondo a la vista de las enseñanzas de las referencias citadas dentro de la memoria descriptiva. Las realizaciones dentro de la memoria descriptiva proporcionan una ilustración de realizaciones de la invención y no deben interpretarse que limitan el alcance de la invención. El experto en la técnica reconoce fácilmente que muchas otras realizaciones quedan abarcadas por la invención. En la medida en que todas las publicaciones, patentes y secuencias biológicas citadas en esta descripción contradigan o sean inconsistentes con la presente memoria descriptiva, la presente memoria descriptiva reemplaza a cualquiera de estos materiales. La cita de cualquier referencia en esta memoria no es una admisión de que estas referencias sean técnica anterior a la presente invención.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, cultivo celular, condiciones de tratamiento, etcétera, utilizados en la memoria descriptiva, incluidas las reivindicaciones, han de entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique otra cosa en contrario, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenda obtener mediante la presente invención. A menos que se indique de otro modo, la expresión "al menos" que precede a una serie de elementos debe entenderse que se refiere a cada uno de los elementos en la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, utilizando no más que una experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en esta memoria. Tales equivalentes están destinados a ser abarcados por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un vector de AAV que comprende un transgén que codifica una hidrolasa lisosomal, para uso en el tratamiento de una enfermedad por depósito lisosomal en un mamífero, en donde la composición se ha de administrar a un primer sitio en el SNC del mamífero y la concentración del vector en la composición es al menos 5×10^{12} gp/ml, de modo que la hidrolasa lisosomal es expresada en una cantidad terapéuticamente eficaz en un segundo sitio en el SNC que contiene neuronas que se proyectan al primer sitio y que está distal a y al menos a 2 mm de dicho primer sitio.
2. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad por depósito lisosomal es la enfermedad de Niemann-Pick A.
- 10 3. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el mamífero es un ser humano.
4. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición se ha de administrar mediante inyección directa en el cerebro.
5. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el segundo sitio es contralateral al primer sitio.
- 15 6. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer sitio está en una región del SNC seleccionada del grupo que consiste en la médula espinal, el bulbo raquídeo, el hipocampo, el cuerpo estriado, la médula, el puente de Varolio, el mesencéfalo, el cerebelo, el tálamo, el hipotálamo, la corteza cerebral, el lóbulo occipital, el lóbulo temporal, el lóbulo parietal y el lóbulo frontal.
- 20 7. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el primer sitio está en el hipocampo y el segundo sitio está en una región del cerebro seleccionada del grupo que consiste en el giro dentado contralateral y la CA3 contralateral, y el septum medial y el córtex entorrinal.
8. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el primer sitio está en una región del cerebro seleccionada del grupo que consiste en el cuerpo estriado y el cerebelo, y el segundo sitio está en una región del cerebro seleccionada del grupo que consiste en la sustancia negra y la médula oblongada.
- 25 9. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición se ha de administrar a un tercer sitio en el SNC del mamífero.
10. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el tercer sitio es contralateral al primer sitio.
- 30 11. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la hidrolasa lisosomal es aspartilglucosaminidasa, α -galactosidasa A, palmitoil proteína tioesterasa, tripeptidil peptidasa, proteína de la membrana lisosomal, transportador de cisteína, ceramidasa ácida, α -L-fucosidasa ácida, proteína protectora/catepsina A, β -glucosidasa ácida o glucocerebrosidasa, β -glucosidasa ácida, iduronato-2-sulfatasa, α -L-iduronidasa, galactocerebrosidasa, α -manosidasa ácida, β -manosidasa ácida, arilsulfatasa B, arilsulfatasa A, N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, esfingomielinasa ácida, NPC-1, α -glucosidasa ácida, β -hexosaminidasa B, heparan N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, acetil-CoA: α -glucosaminidasa N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa, α -N-acetilgalactosaminidasa, α -neuramidasa, β -glucuronidasa, β -hexosaminidasa A o lipasa ácida.
- 35 12. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la hidrolasa lisosomal es esfingomielinasa ácida.
- 40 13. Uso de un vector de AAV que comprende un genoma de AAV recombinante que comprende un transgén que codifica una hidrolasa lisosomal, para la preparación de una composición para tratar una enfermedad por depósito lisosomal en un mamífero, en donde la composición se ha de poner en contacto con una terminación axonal de una neurona comprometida con la enfermedad, de modo que el vector de AAV es endocitosado y es transportado de forma retrógrada intracelularmente a lo largo del axón de la neurona al núcleo de la neurona, y la hidrolasa lisosomal es expresada y secretada por la neurona y es recogida por una célula diana, aliviando con ello la patología en la
- 45

célula diana, en donde la concentración de los genomas de AAV recombinante en la composición es de al menos 5×10^{12} gp/ml, y en donde la neurona es una neurona de proyección.

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la célula diana es una neurona secundaria o una célula glial.
- 5 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la distancia desde la terminación axonal al núcleo es de al menos 2 mm.
16. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la enfermedad por depósito lisosomal es la enfermedad de Niemann-Pick A.
17. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la hidrolasa lisosomal es esfingomielinasa ácida.
- 10 18. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el AAV es uno de serotipo seleccionado del grupo que consiste en AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 y AAV8.
19. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en donde el AAV es uno de serotipo seleccionado del grupo que consiste en AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 y AAV8.

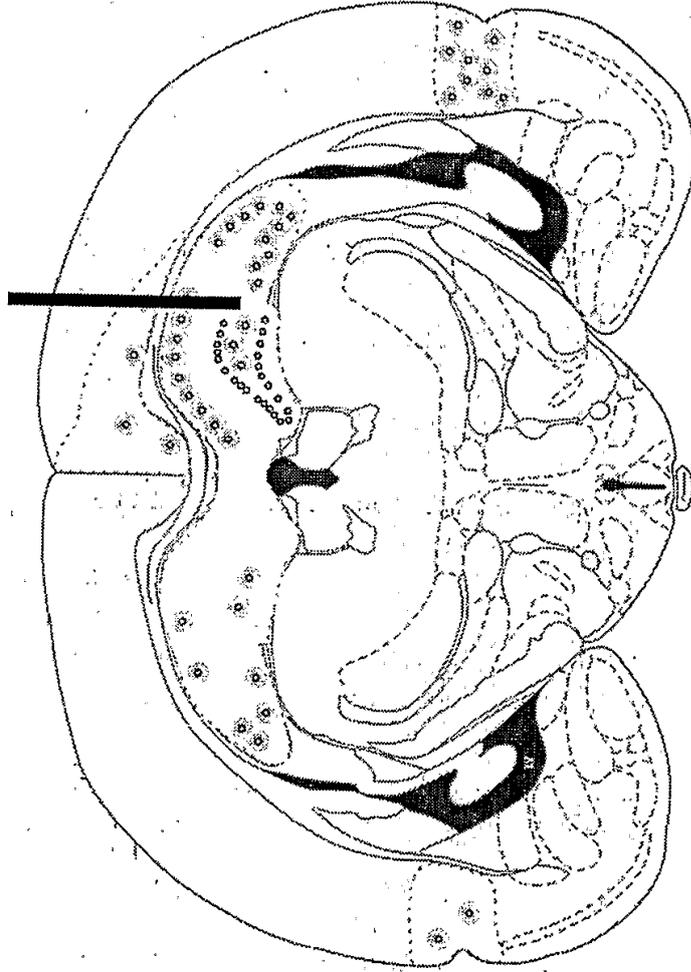


FIG. 1A

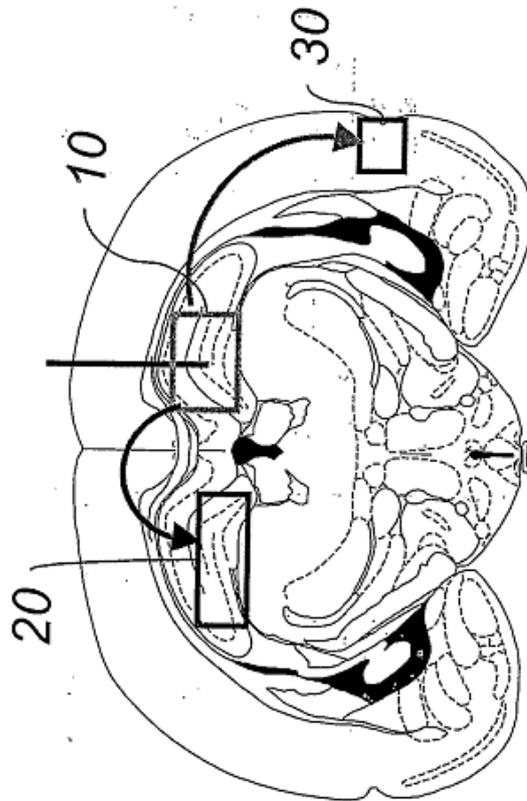


FIG. 1B

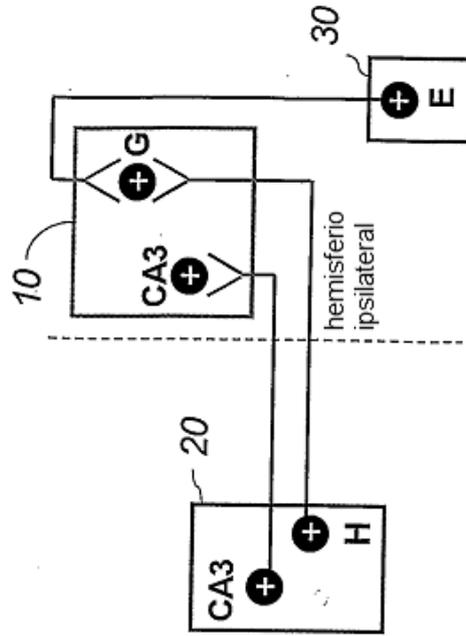


FIG. 1C

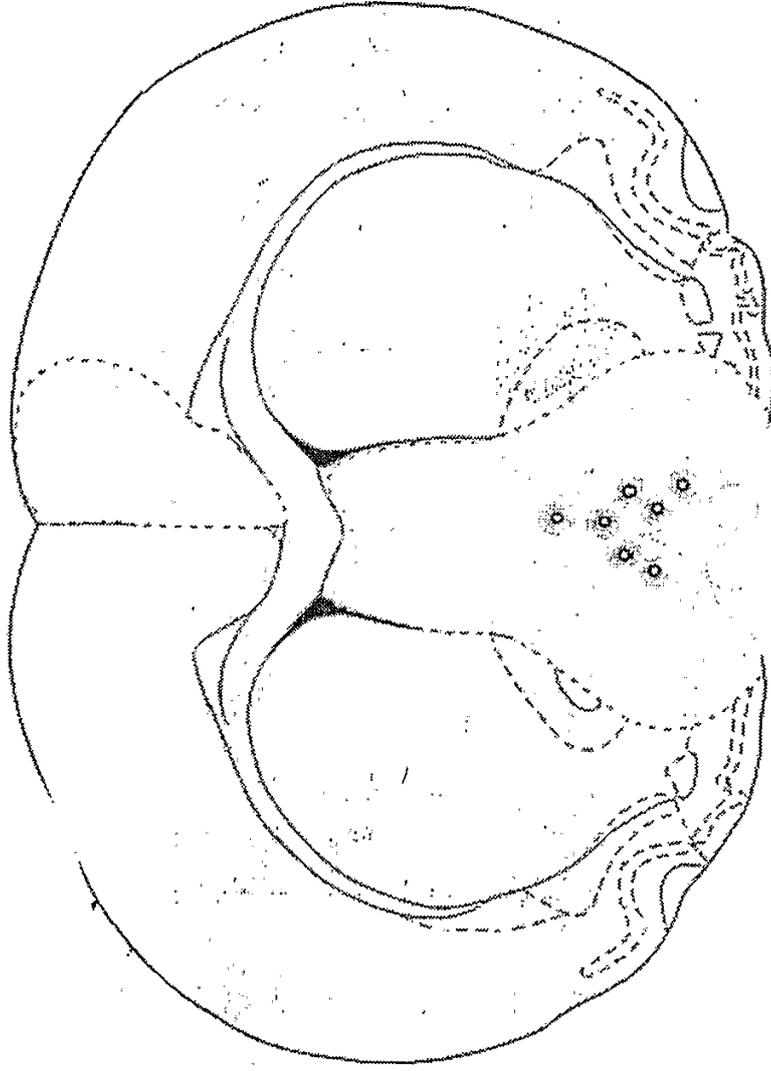


FIG. 2A

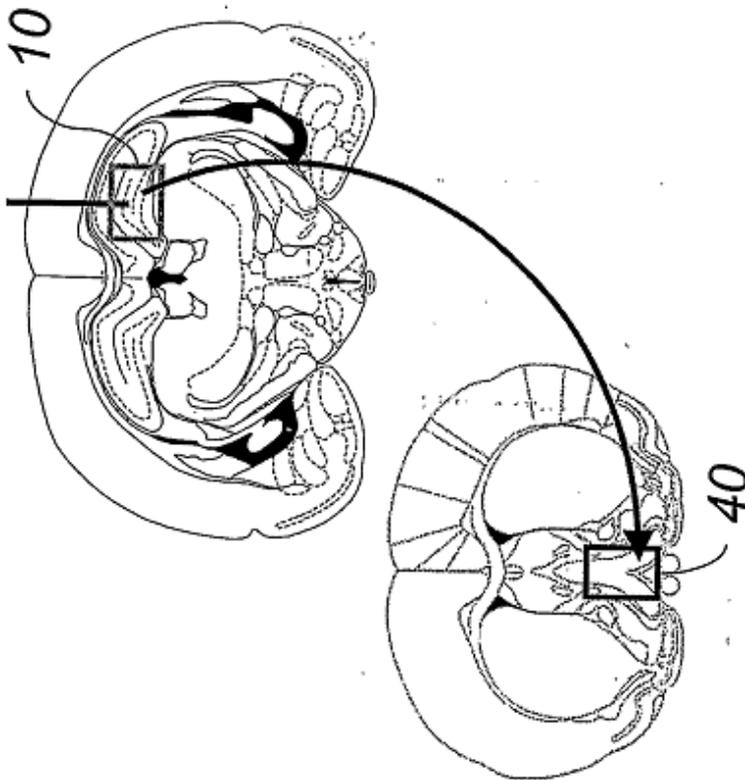


FIG. 2B

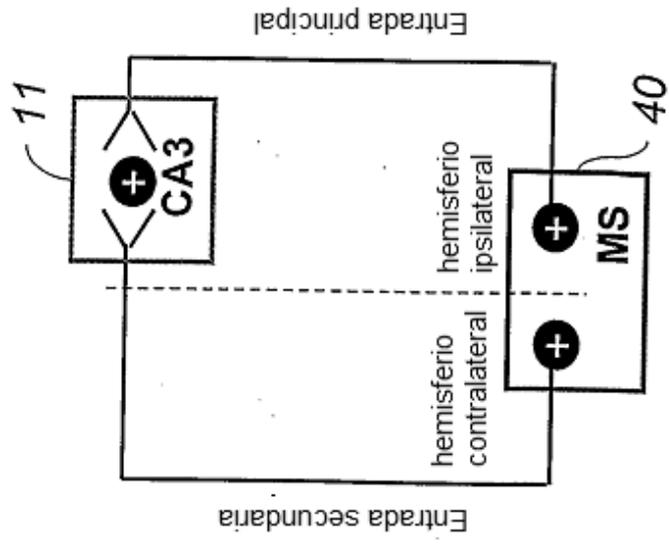


FIG. 2C

