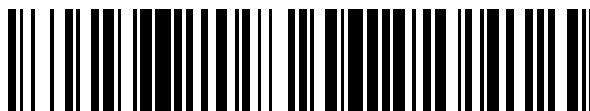


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 495**

51 Int. Cl.:

A61K 38/44 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2011** **E 11770760 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015** **EP 2627359**

54 Título: **Vector de expresión para colesterol 24-hidrolasa en terapia de la enfermedad de Huntington**

30 Prioridad:

15.10.2010 EP 10306128

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

13.04.2016

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (25.0%)**

101 rue de Tolbiac

75013 Paris, FR;

UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE (25.0%);

UNIVERSITE PARIS DESCARTES (25.0%) y

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE (CNRS) (25.0%)

72 Inventor/es:

CABOCHE, JOCELYNE;

AUBOURG, PATRICK;

CARTIER, NATHALIE y

BETUING, SANDRINE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 566 495 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

Vector de expresión para colesterol 24-hidrolasa en terapia de la enfermedad de Huntington.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un vector para su utilización en el tratamiento de la enfermedad de Huntington, vector que comprende un ácido nucleico que codifica para colesterol 24-hidroxilasa.

10 **Antecedentes de la invención**

La enfermedad de Huntington (HD) es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente provocada por una expansión de repeticiones de glutaminas. Las principales manifestaciones clínicas de HD son corea, deterioro cognitivo y trastornos psiquiátricos. La transmisión de HD es autosómica dominante con una penetrancia completa. La mutación responsable de HD, una expansión inestable de una secuencia de repetición de CAG, se ubica en la parte terminal en 5' del gen IT15 que codifica para la huntingtina (htt). Una característica importante de HD es la vulnerabilidad de una región cerebral particular, el cuerpo estriado, a pesar de una expresión similar de la proteína mutada en otras zonas cerebrales (Roze *et al.*, 2008a). Además, a pesar de la expresión temprana de Htt mutada (Exp-Htt) en todas las células neuronales, es decir tan pronto como al nacer, los primeros síntomas y los rasgos distintivos neuropatológicos aparecen en la edad adulta, alrededor de los 40-45 años de edad. La edad de aparición de la enfermedad es, a la inversa, proporcional al número de repeticiones de CAG en el alelo afectado. Una vez que han aparecido los primeros síntomas, la enfermedad progresa y conduce progresivamente a la muerte. Una hipótesis admitida actualmente es que la alteración de rutas de señalización específicas durante el envejecimiento aumenta las alteraciones moleculares inducidas por Exp-Htt, específicamente o principalmente en neuronas del cuerpo estriado. Hasta la fecha, no existe ninguna terapia disponible dirigida a ralentizar la progresión de la enfermedad y en consecuencia la HD progresa inexorablemente hasta la muerte. Por tanto, es importante encontrar estrategias para la terapia en HD

Se han propuesto estrategias para el tratamiento de enfermedad de Huntington, o bien con huntingtina o bien con etil-EPA en modelo de ratón de HD (TRUSHINA E. *ET AL* BMC NEUROSCIENCE 2009, 10(1) 7). La sobreexpresión de la huntingtina de tipo natural da como resultado una mejora leve para el tratamiento de la neuropatología del cuerpo estriado en el modelo de ratón YAC128 de HD (VAN RAAMSDONK JM *et al.* BMC NEUROSCIENCE, 2006, 7(1) 80). Se han descrito vectores, en particular vectores adenovirales, que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica para colesterol 24-hidroxilasa para la terapia génica de la enfermedad de Alzheimer en modelos de ratón (HUDRY *et al.* MOLECULAR THERAPY, 2009, 18 (1) págs. 44-53, HUDRY *et al.* MOLECULAR THERAPY, 2009, 17, supl. 1 S148, documento WO 2004/055201) pero no para el tratamiento de la enfermedad de Huntington

Estudios fisiopatológicos en pacientes con HD y modelos de ratón notifican la relación entre el metabolismo del colesterol en la enfermedad de Huntington o más generalmente en patologías neurodegenerativas. VALENZA *ET AL*: NEUROBIOLOGY OF DISEASE, 2007. 28(1) 133-142 dan a conocer la disfunción progresiva de la ruta de biosíntesis de colesterol en el modelo de ratón R6/2 de enfermedad de Huntington. Los resultados muestran que el nivel de precursores de colesterol disminuyen en el cuerpo estriado, la corteza y el hipocampo de ratones R6/2 y se alteran progresivamente en el cerebro de ratones con HD. El análisis del catabolismo del colesterol muestra que el nivel de 24OH colesterol (24OHC) no disminuye significativamente en las diferentes regiones cerebrales de ratones sintomáticos, aunque había una tendencia hacia una reducción en el cuerpo estriado. Los autores concluyen que el catabolismo cerebral por medio de 24HOC no se reduce en ratones R6/2 aunque los niveles de 24OHC eran ligeramente inferiores en los cuerpos estriados con HD.

Se acumula colesterol en neuronas cultivadas que expresan huntingtina mutante (mhtt) *in vitro* y en cerebros de animales que expresan mhtt *in vivo* (HUMAN MOLECULAR GENETICS 2006 15 (24) 3578-3591. El recambio de colesterol cerebral se reduce en el modelo de HD (HUM. MOL. GENET., vol. 11, 2002, páginas 1953-1965).

55 **Sumario de la invención**

Los inventores observaron que CYP46A1, una enzima responsable de la degradación del colesterol en el sistema nervioso central, es neuroprotectora en un modelo celular de HD. Además, los inventores observaron una reducción de ARNm de CYP46A1 en el cuerpo estriado, la estructura cerebral más vulnerable en la enfermedad, del modelo de ratón con HD transgénico R6/2.

Por tanto, la invención se refiere a un vector para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, en el que el vector expresa CYP46A1 en células del sistema nervioso central.

Además, la invención se refiere a una composición farmacéutica para su utilización en el tratamiento de la enfermedad de Huntington que comprende un vector según la invención.

Descripción detallada de la invención**Definiciones:**

5 A lo largo de toda la memoria descriptiva, se emplean varios términos y se definen en los siguientes párrafos.

Las secuencias de CYP46A1

10 Un primer objeto de la invención se refiere a un vector para su utilización en el tratamiento de la enfermedad de Huntington, vector que comprende la secuencia completa del ácido nucleico que codifica para colesterol 24-hidroxilasa.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “gen” se refiere a un polinucleótido que contiene al menos un marco de lectura abierto que puede codificar para un polipéptido o una proteína particular tras transcribirse o traducirse.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “secuencia codificante” o “una secuencia que codifica para una proteína particular” indica una secuencia de ácido nucleico que se transcribe (en el caso de ADN) y se traduce (en el caso de ARNm) para dar un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de iniciación en el extremo 5' terminal (amino) y un codón de terminación de traducción en el extremo 3' terminal (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, ADNc a partir de ARNm procariota o eucariota, secuencias de ADN genómico a partir de ADN procariota o eucariota, e incluso secuencias de ADN sintético.

25 El gen de CYP46A1 codifica para colesterol 24-hidroxilasa. Esta enzima es un miembro de la superfamilia de citocromo P450. Se da a conocer una secuencia de ADNc para CYP46A1 en el número de registro de Genbank AF094480.1 (SEC ID nº: 1). La secuencia de aminoácidos se muestra en SEC ID nº: 2.

30 En una realización preferida, la invención proporciona un constructo de ácido nucleico que comprende la secuencia SEC ID nº 1 o una variante de la misma para el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

35 Las variantes incluyen, por ejemplo, variantes que se producen de manera natural debido a variaciones alélicas entre individuos (por ejemplo, polimorfismos), formas de corte y empalme alternativo, etc. El término variante también incluye secuencias génicas de CYP46A1 de otras fuentes u organismos. Las variantes son de manera preferida sustancialmente homólogas a SEC ID nº 1, es decir, presentan una identidad de secuencia de nucleótidos de normalmente al menos aproximadamente el 75%, preferiblemente al menos aproximadamente el 85%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% con SEC ID nº 1. Las variantes de un gen de CYP46A1 también incluyen secuencias de ácido nucleico, que se hibridan con una secuencia tal como se definió anteriormente (o una hebra complementaria de la misma) en condiciones de hibridación rigurosas. Las condiciones de hibridación rigurosas típicas incluyen temperaturas por encima de 30°C, preferiblemente por encima de 35°C, más preferiblemente de más de 42°C, y/o salinidad de menos de aproximadamente 500 mM, preferiblemente menos de 200 mM. Las condiciones de hibridación puede ajustarse el experto en la materia modificando la temperatura, salinidad y/o la concentración de otros reactivos tales como SDS, SSC, etc.

Vectores no virales

45 En una realización preferida, la utilización de vector según la invención es un vector no viral. Normalmente, el vector no viral puede ser un plásmido que codifica para CYP46A1.

Los vectores virales

50 Pueden construirse vectores virales de suministro génico útiles en la práctica de la presente invención utilizando metodologías bien conocidas en la materia de biología molecular. Normalmente, se ensamblan vectores virales que portan transgenes a partir de polinucleótidos que codifican para el transgén, elementos reguladores adecuados y elementos necesarios para la producción de proteínas virales que median en la transducción celular.

55 Los términos “transferencia génica” o “suministro génico” se refieren a procedimientos o sistemas para insertar de manera fiable ADN foráneo en células huésped. Tales procedimientos pueden dar como resultado expresión transitoria de ADN transferido no integrado, replicación extracromosómica y expresión de replicones transferidos (por ejemplo, episomas), o integración de material genético transferido en el ADN genómico de las células huésped.

60 Los ejemplos de vector viral incluyen vectores adenovirales, retrovirales, lentivirales, de herpesvirus y virus adenoasociados (AAV).

65 Tales virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas en la materia, tales como transfectando

células de empaquetamiento o mediante transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Los ejemplos típicos de células de empaquetamiento de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Pueden encontrarse protocolos detallados para producir tales virus recombinantes de replicación defectuosa por ejemplo en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US nº 5.882.877, US nº 6.013.516, US nº 4.861.719, US nº 5.278.056 y WO 94/19478.

En una realización preferida, se emplean vectores de virus adenoasociados (AAV).

En otra realización preferida, el vector de AAV es AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 AAV10 o cualquier otro serotipo de AAV que pueda infectar a seres humanos, monos u otras especies.

En una realización más preferida, el vector de AAV es un AAV10.

Por un "vector de AAV" quiere decirse un vector derivado de un serotipo de virus adenoasociado, incluyendo sin limitación, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV6, etc. Los vectores de AAV pueden presentar uno o más de los genes de tipo natural de AAV delecionados en su totalidad o en parte, preferiblemente los genes rep y/o cap, pero conservan secuencias de ITR flanqueantes funcionales. Las secuencias de ITR funcionales son necesarias para el rescate, la replicación y el empaquetamiento del virión de AAV. Por tanto, se define en la presente memoria que un vector de AAV incluye al menos las secuencias requeridas en cis para la replicación y el empaquetamiento (por ejemplo, ITR funcionales) del virus. No es necesario que las ITR sean las secuencias de nucleótidos de tipo natural, y pueden alterarse, por ejemplo, mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos, siempre que las secuencias proporcionen rescate, replicación y empaquetamiento funcionales. Los vectores de expresión de AAV se construyen utilizando técnicas conocidas para al menos proporcionar componentes operativamente unidos en la dirección de transcripción, elementos de control que incluyen una región de iniciación de la transcripción, el ADN de interés (es decir el gen de CYP46A1) y un elemento de terminación de la transcripción.

Los elementos de control se seleccionan para que sean funcionales en una célula de mamífero. El constructo resultante que contiene los componentes operativamente unidos se une (5' e Y) con secuencias de ITR de AAV funcionales. Por "repeticiones terminales invertidas de virus adenoasociados" o "ITR de AAV" quiere decirse las regiones reconocidas en la materia que se encuentran en cada extremo del genoma de AAV que funcionan juntas en cis como orígenes de replicación de ADN y como señales de empaquetamiento par el virus. Las ITR de AAV, junto con la región que codifica para rep de AAV, proporcionan una escisión y rescate eficaces de, y la integración de una secuencia de nucleótidos interpuesta entre dos ITR flanqueantes en un genoma de célula de mamífero. Se conocen las secuencias de nucleótidos de regiones de ITR de AAV. Véase, por ejemplo, Kotin, 1994; Berns, KI "Parvoviridae and their Replication" en Fundamental Virology, 2ª edición, (B. N. Fields y D. M. Knipe, eds.) para la secuencia de AAV-2. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "ITR de AAV" no comprende necesariamente la secuencia de nucleótidos de tipo natural, sino que puede alterarse, por ejemplo, mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos. Adicionalmente, pueden derivarse ITR de AAV de cualquiera de varios serotipos de AAV, incluyendo sin limitación, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV6, etc. Además, no es necesario que las ITR en 5' y 3' que flanquean a una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector de AAV sean idénticas o se deriven del mismo aislado o serotipo de AAV, siempre que funcionen tal como se prevé, es decir, permitiendo la escisión y el rescate de la secuencia de interés de un vector o genoma de célula huésped, y permitiendo la integración de la secuencia heteróloga en el genoma de la célula receptora cuando están presentes productos génicos de Rep de AAV en la célula. Adicionalmente, pueden derivarse ITR de AAV de cualquiera de varios serotipos de AAV, incluyendo sin limitación, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV 5, AAV6, etc. Además, no es necesario que las ITR en 5' y 3' que flanquean a una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector de expresión de AAV sean idénticas o se deriven del mismo aislado o serotipo de AAV, siempre que funcionen tal como se prevé, es decir, permitiendo la escisión y el rescate de la secuencia de interés de un vector o genoma de célula huésped, y permitiendo la integración de la molécula de ADN en el genoma de la célula receptora cuando están presentes productos génicos de Rep de AAV en la célula.

Se prefieren particularmente vectores derivados de serotipos de AAV que presentan tropismo para y altas eficacias de transducción en células del CNS de mamíferos, particularmente neuronas. Se proporciona una revisión y comparación de eficacias de transducción de diferentes serotipos en Cearley CN *et al.*, 2008. En un ejemplo preferido, se ha mostrado que los vectores basados en AAV2 muestran una expresión a largo plazo directa de transgenes en el CNS, preferiblemente transduciendo neuronas. En otros ejemplos no limitativos, los vectores preferidos incluyen vectores derivados de los serotipos AAV10 y AAV11, que se ha mostrado también que transducen células del CNS (Davidson *et al*, citado anteriormente).

La secuencia de nucleótidos seleccionada está operativamente unida a elementos de control que dirigen la transcripción o expresión de la misma en el sujeto *in vivo*. Tales elementos de control pueden comprender secuencias de control normalmente asociadas con el gen seleccionado.

Alternativamente, pueden emplearse secuencias de control heterólogas. Las secuencias de control heterólogas útiles incluyen generalmente las derivadas de secuencias que codifican para genes virales o de mamífero. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, el promotor de fosfoglicerato cinasa (PKG), CAG, promotores neuronales,

promotor del receptor de dopamina-1 y receptor de dopamina-2, el promotor temprano de SV40, promotor de LTR del virus de tumor mamario de ratón; promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP); un promotor del virus del herpes simple (HSV), un promotor de citomegalovirus (CMV) tal como la región promotora temprana inmediata de CMV (CMVIE), el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotores sintéticos, promotores híbridos, y similares. Además, secuencias derivadas de genes no virales, tales como el gen de metalotioneína murina, también encontrarán utilización en la presente memoria. Tales secuencias promotoras están disponibles comercialmente de, por ejemplo, Stratagene (San Diego, CA). Para los fines de la presente invención, serán de utilización particular tanto promotores heterólogos como otros elementos de control, tales como promotores, potenciadores y similares inducibles y específicos del CNS.

Los ejemplos de promotores heterólogos incluyen el promotor de CMV. Los ejemplos de promotores específicos del CNS incluyen los aislados de los genes de la proteína básica de la mielina (MBP), proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y enolasa específica de neuronas (NSE).

Los ejemplos de promotores inducibles incluyen elementos de respuesta de ADN para ecdisona, tetraciclina, hipoxia, andaufina.

El vector de expresión de AAV que alberga la molécula de ADN de interés unida mediante ITR de AAV puede construirse insertando directamente la(s) secuencia(s) seleccionada(s) en un genoma de AAV que presenta los marcos de lectura abiertos ("ORF") de AAV principales cortados del mismo. También pueden delecionarse otras partes del genoma de AAV, siempre que permanezca una parte suficiente de las ITR para permitir las funciones de replicación y empaquetamiento. Tales constructos pueden diseñarse utilizando técnicas bien conocidas en la materia. Véanse, por ejemplo, las patentes US nº 5.173.414 y nº 5.139.941; las publicaciones internacionales WO 92/01070 (publicada el 23 de enero de 1992) y WO 93/03769 (publicada el 4 de marzo de 1993); Lebkowski *et al.*, 1988; Vincent *et al.*, 1990; Carter, 1992; Muzyczka, 1992; Kotin, 1994; Shelling y Smith, 1994; y Zhou *et al.*, 1994. Alternativamente, pueden cortarse ITR de AAV del genoma viral o de un vector de AAV que contiene los mismos extremos 5' y 3' y fusionados de un constructo de ácido nucleico seleccionado que está presente en otro vector utilizando técnicas de ligamiento convencionales. Se han descrito vectores de AAV que contienen ITR en, por ejemplo, la patente US nº 5.139.941. En particular, se describen en la misma varios vectores de AAV que están disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") con los números de registro 53222, 53223, 53224, 53225 y 53226. Adicionalmente, pueden producirse genes quiméricos de manera sintética para que incluyan secuencias de ITR de AAV dispuestas en 5' y 3' con respecto a una o más secuencias de ácido nucleico seleccionadas. Pueden utilizarse codones preferidos para la expresión de la secuencia génica quimérica en células de CNS de mamífero. La secuencia quimérica completa se ensambla a partir de oligonucleótidos solapantes preparados mediante procedimientos convencionales. Véanse, por ejemplo, Edge, 1981; Nambair *et al.*, 1984; Jay *et al.*, 1984. Con el fin de producir viriones de AAV, se introduce un vector de expresión de AAV en una célula huésped adecuada utilizando técnicas conocidas, tales como mediante transfección. Se conocen generalmente en la materia varias técnicas de transfección. Véanse, por ejemplo, Graham *et al.*, 1973; Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Davis *et al.* (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, y Chu *et al.*, 1981. Los procedimientos de transfección particularmente adecuados incluyen coprecipitación con fosfato de calcio (Graham *et al.*, 1973), microinyección directa en células cultivadas (Capecchi, 1980), electroporación (Shigekawa *et al.*, 1988), transferencia génica mediada por liposomas (Mannino *et al.*, 1988), transducción mediada por lípidos (Felgner *et al.*, 1987) y suministro de ácidos nucleicos utilizando microproyectiles de alta velocidad (Klein *et al.*, 1987).

Por ejemplo, un vector viral preferido, tal como el AAV10, comprende, además de una secuencia de ácido nucleico que codifica para colesterol 24-hidroxilasa, la estructura principal del vector de AAV con una ITR derivada de AAV-2, el promotor, tal como el promotor del gen de PGK (fosfoglicerato cinasa) de ratón o el promotor híbrido de citomegalovirus/ β -actina (CAG) que consiste en el potenciador del gen inmediato de citomegalovirus, el promotor, el donador de corte y empalme y el intrón del gen de β -actina de pollo, el aceptor de corte y empalme de β -globina de conejo, o cualquier promotor neuronal tal como el promotor del receptor de dopamina-1 o el receptor de dopamina-2 con o sin la forma mutante o de tipo natural del elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de Woodchuck (WWPRE).

Suministro de los vectores

En la presente memoria se proporciona un método para tratar la enfermedad de Huntington en un sujeto, comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar un vector tal como se definió anteriormente, que comprende un ácido nucleico que codifica para colesterol 24-hidroxilasa; y
- (b) suministrar el vector al sistema nervioso central (CNS) del sujeto, mediante lo cual dicho vector transduce células en el CNS, y mediante lo cual las células transducidas expresan colesterol 24-hidroxilasa a un nivel terapéuticamente eficaz.

Los procedimientos de suministro de vectores a neuronas y/o astrocitos incluyen generalmente cualquier procedimiento adecuado para suministrar vectores a las neuronas y/o astrocitos de manera que se transducen al menos una parte de las células de una población de células conectadas sinápticamente seleccionada. El vector puede suministrarse a cualquier célula del sistema nervioso central, o ambos. Generalmente, el vector se suministra a las células del sistema nervioso central, incluyendo por ejemplo células de la médula espinal, el tronco encefálico (bulbo raquídeo, protuberancia y mesencéfalo), cerebelo, diencefalo (tálamo, hipotálamo), telencéfalo (cuerpo estriado, corteza cerebral o, dentro de la corteza, los lóbulos occipital, temporal, parietal o frontal), o combinaciones de los mismos, o preferiblemente cualquier subpoblación adecuada de las mismas. Los sitios preferidos adicionales para el suministro incluyen el núcleo rojo, el cuerpo amigdalino, la corteza entorrinal y neuronas ventrales laterales, o al núcleo anterior del tálamo.

Para suministrar el vector específicamente a una región particular y a una población de células particular del CNS, el vector puede administrarse mediante microinyección estereotáctica. Por ejemplo, los pacientes presentan la base del bastidor estereotáctico fijada en su lugar (atornillada al cráneo). Se obtienen imágenes del cerebro con la base del bastidor estereotáctico (compatible con MRI con marcas fiduciales) utilizando MRI de alta resolución. Las imágenes de MRI se transfieren entonces a un ordenador que ejecuta un software estereotáctico. Se utiliza una serie de imágenes coronales, sagitales y axiales para determinar la diana (el sitio de la inyección del vector AAV) y la trayectoria. El software traduce directamente la trayectoria a coordenadas tridimensionales apropiadas para el bastidor estereotáctico. Se perforan orificios de burl por encima del sitio de entrada y se sitúa el aparato estereotáctico por la aguja implantada a la profundidad dada. Se inyecta entonces el vector de AAV en los sitios diana. Puesto que el vector de AAV se integra en las células diana, en vez de producir partículas virales, la propagación posterior del vector es de poca importancia, y principalmente una función de la difusión pasiva desde el sitio de inyección y por supuesto del transporte transináptico deseado, antes de la integración. El grado de difusión puede controlarse ajustando la razón de vector con respecto al portador de fluido.

Las vías de administración adicionales pueden comprender también aplicación local del vector bajo visualización directa, por ejemplo, aplicación cortical superficial, u otra aplicación no estereotáctica. El vector puede administrarse por vía intratecal, en los ventrículos o mediante inyección intravenosa.

Las células diana de los vectores de la presente invención son células del sistema nervioso central de un sujeto aquejado de enfermedad de Huntington. Preferiblemente el sujeto es un ser humano, generalmente un adulto.

Sin embargo la invención engloba suministrar el vector a modelos biológicos de la enfermedad. En ese caso, el modelo biológico puede ser cualquier mamífero en cualquier estadio de desarrollo en el momento del suministro, por ejemplo, embrionario, fetal, infantil, juvenil o adulto, preferiblemente es un adulto. Además, las células del CNS diana pueden ser esencialmente de cualquier fuente, especialmente primates no humanos y mamíferos de los órdenes Rodenta (ratones, ratas, conejos, hámster), Carnívora (gatos, perros) y Arteriodactila (vacas, cerdos, ovejas, cabras, caballos) así como cualquier otro sistema no humano (por ejemplo sistema modelo de pez cebra).

Preferiblemente, el procedimiento de la invención comprende la administración intracerebral a través de inyecciones estereotácticas. Sin embargo, también pueden adaptarse otros procedimientos de suministro conocidos según la invención. Por ejemplo, para una distribución más generalizada del vector a través del CNS, puede inyectarse en el líquido cefalorraquídeo, por ejemplo, mediante punción lumbar. Para dirigir el vector al sistema nervioso periférico, puede inyectarse en la médula espinal o en los ganglios periféricos, o la carne (por vía subcutánea o por vía intramuscular) de la parte del cuerpo de interés. En determinadas situaciones el vector puede administrarse por medio de un enfoque intravascular. Por ejemplo, el vector puede administrarse por vía intraarterial (carótida) en situaciones en las que la barrera hematoencefálica está alterada o no está alterada. Además, para un suministro más global, el vector puede administrarse durante la "apertura" de la barrera hematoencefálica lograda mediante infusión de disoluciones hipertónicas que incluyen manitol.

Los vectores utilizados en la presente memoria pueden formularse en cualquier vehículo adecuado para su suministro. Por ejemplo pueden ponerse en una suspensión, disolución o emulsión farmacéuticamente aceptable. Los medios adecuados incluyen solución salina y preparaciones liposomales. Más específicamente, los portadores farmacéuticamente aceptables pueden incluir disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares.

También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

También puede utilizarse un sistema de dispersión coloidal para el suministro génico dirigido. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas.

Las dosis y el régimen preferidos puede determinarlos un médico, y dependen de la edad, el sexo, el peso, del sujeto y el estadio de la enfermedad. Como ejemplo, para el suministro de colesterol 24-hidroxilasa utilizando un vector de expresión viral, cada dosificación unitaria de vector que expresa colesterol 24-hidroxilasa puede comprender de 2,5 a 100 μ l de una composición que incluye un vector de expresión viral en un fluido farmacéuticamente aceptable a una concentración que oscila entre 10^{11} y 10^{16} genomas virales por ml por ejemplo.

Composición farmacéutica

Un segundo objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica para su utilización en el tratamiento de la enfermedad de Huntington que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector según la invención.

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" quiere decirse una cantidad suficiente del vector de la invención para tratar la enfermedad de Huntington a una razón de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

Se entenderá que la dosificación diaria total de los compuestos y las composiciones de la presente invención las decidirá el médico encargado dentro del alcance de criterio médico sensato. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno que está tratándose y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el momento de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está muy dentro del conocimiento de la técnica comenzar las dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logra el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variar a lo largo de un amplio intervalo por adulto por día. La cantidad terapéuticamente eficaz del vector según la invención que debe administrarse, así como la dosificación para el tratamiento de un estado patológico con el número de partículas víricas o no víricas y/o composiciones farmacéuticas de la invención, dependerán de numerosos factores, incluyendo la edad y el estado del paciente, la gravedad de la alteración o trastorno, el procedimiento y la frecuencia de administración y el péptido particular que va a utilizarse.

La presentación de las composiciones farmacéuticas que contienen el vector según la invención puede ser de cualquier forma que sea adecuada para administración intracerebral, intratecal, intraventricular o intravenosa.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración intramuscular, intravenosa, intracerebral, intratecal o intraventricular, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede inyectarse. Éstas pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente secadas por congelación que tras las adición, dependiendo del caso, de agua o solución salina fisiológica esterilizada, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

Las formas farmacéuticas adecuadas para utilización inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado de que existe una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Pueden prepararse disoluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezclados adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y utilización, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

El vector según la invención puede formularse para dar una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. También pueden derivarse sales formadas con los grupos carboxilo libres a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El portador también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la utilización de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante la utilización de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ocasionarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ocasionarse mediante la utilización en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan disoluciones inyectables estériles incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros componentes enumerados anteriormente, tal como se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son técnicas de secado a vacío y secado por congelación que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución esterilizada por filtración previamente del mismo.

Tras la formulación, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármacos y similares.

También pueden administrarse dosis múltiples.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, no debe interpretarse de ningún modo que estos ejemplos y figuras limitan el alcance de la presente invención.

Figuras

Figura 1: Cuantificación de la expresión de ARNm de CYP46A1 en ratones R6/2 y WT. Se realizaron RT-qPCR de ARNm de la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado utilizando cebadores específicos para ADNc de CYP46A1. Se normalizaron todos los datos de RT-qPCR utilizando ARNm de HPRT como patrón interno. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM (n = 3) (* P<0,05, **P<0,005, ns: no significativo).

Figura 2: Ilustración de ensayos de cotransfección. Se detectó la expresión de Exp-Htt debido al marcaje con GFP (color verde), se detectó la expresión de CYP46A1 o mut-CYP46A1 debido al inmunomarcaje con Ha (color rojo). Se evaluó la viabilidad de neuronas del cuerpo estriado basándose en la tinción de Hoechst (color azul). Obsérvese la expresión difusa de Exp-Htt en presencia de CYP46A1, mientras que se formó un agregado de Exp-Htt en neuronas que coexpresaban mut-CYP46A1.

Figura 3: Efecto de la sobreexpresión de CYP46A1 sobre la formación de agregados mediada por ExpHtt. Se transfectaron neuronas del cuerpo estriado primarias con Exp-Htt o se cotransfectaron con ExpHtt y mut-CYP46A1 o CYP46A1. Se cuantificaron las neuronas transfectadas con agregados de ExpHtt. Se analizaron los datos de al menos 3 experimentos independientes (100 neuronas transfectadas por estado y por experimento) y se expresaron como la media $\pm$ SEM (*P<0,05, **P<0,01).

Figura 4: Efecto de la expresión de CYP46A1 sobre la muerte de neuronas del cuerpo estriado mediada por ExpHtt. Se transfectaron neuronas del cuerpo estriado primarias con Htt, Exp-Htt o se cotransfectaron con Exp-Htt y mut-CYP46A1 (Exp-Htt + mut-CYP46A1) o CYP46A1 (Exp-Htt + CYP46A1). Se cuantificó el porcentaje de neuronas transfectadas supervivientes basándose en el marcaje de Hoechst. Se analizaron los datos de al menos 3 experimentos independientes (100 neuronas transfectadas por estado y por experimento) y se expresaron como la media $\pm$ SEM, *P<0,05, **P<0,005, ***P<0,001, ns: no significativo).

Figura 5: Transducción del vector AAVrh.10 tras inyecciones estereotácticas en el cuerpo estriado de ratones WT. Se realizaron secciones sagitales (30 μ m) del cerebro en ratones 3 semanas tras el suministro de AAVrh.10-GFP dentro del cuerpo estriado. (A) Secciones sagitales de cerebro de ratón, lateral 2,28 mm. (B) Sección sagital de cerebro de ratón, lateral 1,92 mm. Obsérvese que la tinción con GFP (color gris) mostró una transducción extendida de AAVrh.10 dentro del núcleo caudado-putamen (CPu) así como dos estructuras cerebrales conectadas sinápticamente: corteza (Ctx) y globo pálido (GP).

Figura 6: Representación tridimensional del cuerpo estriado transducido mediante AAVrh.10-GFP. Tres semanas tras el suministro de AAVrh.10-GFP dentro del cuerpo estriado en ratones WT, se realizaron secciones coronales

(30 μ m) del cerebro seguido por una reconstrucción tomográfica de la fluorescencia verde emitida a partir del cuerpo estriado. (A) Vista sagital y (B) vista medial del cuerpo estriado transducido (marcaje en gris). (Cpu: núcleo caudado-putamen, AC: comisura anterior, Nacc: núcleo accumbens). Obsérvese que la totalidad del cuerpo estriado dorsal está transducido mediante Aavrh.10 (marcaje en gris).

Figura 7: Transducción y tropismo de AAVrh.10-CYP46A1-Ha tras inyecciones estereotácticas en el cuerpo estriado de ratones WT. Se estudiaron secciones sagitales (30 μ m) del cerebro mediante inmunofluorescencia 3 semanas tras el suministro de AAVrh.10-CYP46A1-Ha dentro del cuerpo estriado. (A) Representación de ADN recombinante de AAVrh.10-CYP46A1-Ha, lateral 2,04 mm. (B) Se evaluó la expresión de CYP46A1-Ha mediante tinción inmunohistológica con Ha (color gris claro). (C-E) Tinción con Ha de mayor aumento (C, marcaje citoplasmático de color blanco) combinada con tinción con marcador específico de neuronas (D, NeuN, marcaje nuclear de color blanco). E) Imagen fusionada. Obsérvese la eficacia de la transducción de AAVrh.10-CYP46A1-Ha en el cuerpo estriado y el tropismo neuronal de AAVrh.10. Cpu: núcleo caudado-putamen, GP: globo pálido.

Figura 8: Ausencia de expresión de CYP46A1-Ha en células gliales tras inyecciones estereotácticas de AAVrh10.CYP46A1-Ha en el cuerpo estriado de ratones WT. Se estudiaron secciones coronales (30 μ m) del cerebro mediante inmunofluorescencia 3 semanas tras el suministro de AAVrh.10-CYP46A1-Ha dentro del cuerpo estriado. (A) Tinción inmunológica con Ha (marcaje citoplasmático de color blanco) asociada con una tinción de astrocitos específica utilizando inmunomarcaje con GFAP (marcaje de color blanco). (B) Tinción inmunológica con Ha (marcaje citoplasmático de color blanco) asociada con un marcaje de células microgliales específica (color blanco) y (C) tinción inmunológica con Ha (color blanco) asociada con una tinción inmunológica de oligodendrocitos específica (Olig2, color blanco rojizo, véanse las flechas). Obsérvese la ausencia de expresión de CYP46A1-Ha en las células gliales. Cpu: núcleo caudado-putamen, Cc: cuerpo calloso, Ctx: corteza.

Figura 9: Rendimiento en Rotarod de ratones WT y R6/2 a los que se les inyectó solución salina o AAVrh.10-CYP46A1-Ha. Se evaluó el rendimiento motor en el Rotarod 2 semanas tras el suministro de AAVrh.10-CYP46A1-Ha dentro del cuerpo estriado en ratones de 6 semanas de edad a 11 semanas. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM (* P <0,05, ** P <0,001, *** P <0,0001). El análisis estadístico reveló un efecto significativo de AAVrh.10-CYP46A1-Ha sobre el rendimiento en Rotarod de ratones R6/2 de 8 semanas de edad. WT solución salina (n=6) WT AAVrh.10-CYP46A1-Ha (n=8), R6/2 solución salina (n=13), R6/2 AAVrh.10 (n=12).

Figura 10: Puntuaciones de agarre de ratones WT y R6/2 tras inyecciones estereotácticas de AAVrh10.CYP46A1-Ha o solución salina en el cuerpo estriado. Se evaluó el agarre 2 semanas tras el suministro de AAVrh.10-CYP46A1-Ha dentro del cuerpo estriado en ratones de 6 semanas de edad a 11 semanas. (A) Fotografías representativas de ratones WT y R6/2 a 11 semanas de edad suspendidos por la cola. Los ratones WT a los que se les inyectó solución salina o AAVrh.10-CYP46A1-ha mostraron agitación de las extremidades mientras que los ratones R6/2 a los que se les inyectó solución salina mostraron agarre de las extremidades tanto delanteras como traseras. La inyección de AAVrh.10-CYP46A1-Ha en ratones R6/2 presenta efectos beneficiosos sobre las posturas de las extremidades delanteras y traseras. (B) Cuantificación de pruebas de agarre con cuatro puntuaciones relacionadas con la gravedad del fenotipo. WT solución salina (n=6) WT AAVrh.10-CYP46A1-Ha (n=8), R6/2 solución salina (n=13), R6/2 AAVrh.10(n=12).

Ejemplos:

Ejemplo 1: Efecto de CYP46A1 *in vitro*

Material y procedimientos

Cría de los ratones:

Se alojaron ratones R6/2 transgénicos y compañeros de camada WT en una sala de temperatura controlada mantenida en un ciclo de luz/oscuridad. Estaban disponibles alimento y agua a voluntad. Se obtuvieron ratones R6/2 [B6CBA-TgN (Hdaxon1) 62], que expresan el exón 1 del gen de HD mutante humano que contiene 115-150 CAG bajo el control del promotor del gen de IT15 humano del Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), cruzando hembras hemicigotas con trasplante de ovario con machos de su cepa B6CBAF1/J antecedente. Se realizó el genotipado de los ratones transgénicos en ADN de la cola mediante PCR. Se alojaron los ratones en grupos con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y alimento y agua a voluntad. Se realizaron los experimentos según las directrices éticas convencionales (publicación de los National Institutes of Health de los USA nº 85-23, revisada en 1985, y la directiva del Comité Europeo sobre el cuidado y utilización de animales de laboratorio 86/609/EEC).

Extracción de ARN a partir de tejidos y amplificación por PCR con transcripción inversa:

Se diseccionaron el cuerpo estriado, la corteza y el hipocampo de ratones WT y R6/2 de 6 semanas de edad. Se aislaron los ARNm totales utilizando el kit Rneasy mini (Qiagen) utilizando las instrucciones del fabricante. Se realizó transcripción inversa utilizando SuperScript III (Invitrogen). Se utilizaron cuatrocientos nanogramos de ARNm totales

extraídos del cuerpo estriado, la corteza y el hipocampo en bruto como molde para la transcripción inversa con el kit de transcripción inversa (RT) (SuperScript III - Invitrogen).

Se utilizó el ADNc resultante como molde para la PCR cuantitativa (QPCR) realizada en el sistema de detección Icyler (Bio-Rad) utilizando el kit de QPCR ABSolute SYBR Green (ABgene). Se diseñaron cebadores específicos (Eurogentec S.A.) para la amplificación del ADNc de CYP46A1:

Directo: 5'-TCCTCTCCTGTTTCAGCACCT-3' (SEC ID nº: 3)
Inverso: 5'-GGCCATGACAACTTTTACCT-3' (SEC ID nº: 4)

Se normalizaron las cantidades de ARNm absolutas con ARNm de HPRT (hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa), utilizada como gen de mantenimiento. Los siguientes cebadores para amplificar el ADNc de HPRT fueron tal como sigue:

Directo: 5'-TTGCTCGAGATGTCATGAAGGA-3' (SEC ID nº 5)
Inverso: 5'-AGCAGGTCAGCAAAGAACTTATAG-3' (SEC ID nº 6)

Los resultados representados son la media de 3 normalizaciones diferentes de la expresión de ARNm de CYP46A1 en ratones R6/2 o WT.

Cultivo de cuerpo estriado primario

Se diseccionaron neuronas del cuerpo estriado primarias a partir de embriones de 14 días de edad de ratones Swiss preñados (Janvier, Le Genest Saint Isle, Francia). Se realizó la disociación celular con 1 ml de tripsina-EDTA durante 15 min y se detuvo añadiendo 1 ml de medio neurobasal completo (NBC) (medio neurobasal complementado con B27, antibiótico y glutamina) a 300 µl de suero de ternero fetal y 30 µl de ADNasa I. Tras la disociación mecánica e incubación en hielo durante 5 minutos, se tomó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 ml de NBC. Se centrifugó la disolución de células del cuerpo estriado 5 min, 4°C, 900 rpm y se resuspendió el sedimento en NBC.

Se sembraron en placa los recuentos celulares en una placa de 4 pocillos recubierta con poli-L-lisina (160000 células por pocillo) a 37°C, el 5% de CO₂ en un incubador.

Transfección:

Tras 7 días en cultivo, se transfectaron de manera transitoria las neuronas que se hicieron crecer en placas de 4 pocillos utilizando lipofectamina (Invitrogen) con constructos de pcADN que codifican para el primer exón de Htt humana que contiene o bien 25 (Htt) o bien 103 (ExpHtt) repeticiones de CAA o CAG continuas en marco con GFP (proporcionados por HDF Resource Bank, UCLA). Cuando se indica, se cotransfectaron neuronas del cuerpo estriado con constructos de pcADN que codifican para la proteína CYP46A1 de tipo natural en marco con una etiqueta de hemaglutinina (CYP46A1-Ha) o una versión mutada etiquetada con Ha correspondiente a una mutación de cambio de sentido (A1309C) carente de actividad enzimática (CYP46A1-mut) (obsequio del Pr. Aubourg). Tres horas y media tras la transfección, se retiró el medio y se sustituyó por NBC.

Inmunohistoquímica, formación de agregados y análisis de la muerte neuronal:

Se fijaron neuronas del cuerpo estriado en paraformaldehído al 2% en PBS durante 40 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con Triton al 0,3% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 15 min y se lavaron con PBS 1X Triton al 0,1% durante 5 min a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS, se preincubaron las células con tampón de bloqueo (PBS, Triton al 0,1% NGS al 5%) durante 20 min y se lavaron con PBS Triton al 0,1%, NGS al 1% durante 5 min a temperatura ambiente. Se incubó anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal de ratón anti-Ha Covance, dilución 1/1000) en PBS Triton al 0,1% NGS al 1% durante la noche a 4°C. Tras tres lavados con PBS Triton al 0,1% durante 5 min, se incubaron las células con el anticuerpo secundario (anticuerpo Alexa 568 anti-ratón, dilución 1/1000 en PBS Triton al 0,1% NGS al 1%). Se realizaron tres lavados con PBS Triton al 0,1% antes del marcaje del núcleo utilizando tinción de Hoechst (1/20000 en PBS) durante 5 min seguido por 3 lavados con PBS durante 5 min. Se montaron las células bajo cubreobjetos utilizando un medio Vectashield (Vector Laboratories) y se analizaron con un microscopio de fluorescencia DM4000B de Leica (X40). Se evaluó la formación de agregados debido a la tinción con GFP de Exp-Htt y se cuantificó 24 h tras la transfección. Se evaluó la muerte neuronal 48 h tras la transfección tras la tinción de Hoechst y se puntuaron las neuronas que contenían núcleos condensados o fragmentados como células moribundas. Los resultados presentados son los resultados de tres experimentos independientes y se analizaron más de 100 neuronas transfectadas en cada experimento.

Análisis estadístico

Se analizaron estadísticamente todos los datos utilizando una prueba de la t de Student y para todos los análisis estadísticos se consideró que la diferencia entre comparaciones era significativa cuando P<0,05.

Resultados

A. Cuantificación del ARNm de CYP46A1 en un modelo de ratón de enfermedad de Huntington:

Se ha descrito la disfunción de la biosíntesis de colesterol en HD (para una revisión véase Valenza *et al* 2006). Puesto que se sabe que Exp-Htt induce desregulación transcripcional, específicamente genes implicados en el metabolismo y la supervivencia neuronales, se pensó que una deficiencia de la expresión de ARNm de CYP46A1 podría explicar, al menos en parte, la desregulación del colesterol y por tanto las disfunciones neuronales en HD. Los ratones R6/2 son el modelo de ratones más comúnmente utilizado y el mejor caracterizado de HD. Estos ratones transgénicos presentan una serie de cambios conductuales y regulatorios que se desarrollan gradualmente hasta la muerte, que se produce entre 13 y 16 semanas de edad. Se midió la expresión de ARNm de CYP46A1 en tejidos cerebrales de ratones R6/2 de 6 semanas de edad, junto con sus compañeros de camada de tipo natural, utilizando PCR con transcriptasa inversa cuantitativa. Para cada cepa de ratones, se extrajeron ARN de la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado. La expresión de ARNm de CYP46A1 estaba ligeramente, pero significativamente, regulada por disminución en la corteza cerebral de ratones R6/2 en comparación con los ratones de tipo natural (figura 1). No se encontró ninguna alteración significativa en el hipocampo. En el cuerpo estriado de ratones R6/2, se encontró una fuerte disminución de la expresión de ARNm de CYP46A1, en comparación con el cuerpo estriado de ratones de tipo natural (-50%; figura 1).

B. Influencia de la sobreexpresión de CYP46A1 sobre los efectos tóxicos de ExpHtt en neuronas del cuerpo estriado primarias:

La disminución de la expresión de ARNm de CYP46A1 observada en el cuerpo estriado de ratones R6/2 sugirió un posible papel causal en la patogénesis de HD. Para abordar esto, se utilizó un sistema modelo sencillo de disfunciones de neuronas del cuerpo estriado inducidas por Exp-Htt, que se estableció en el laboratorio (Garcia *et al.*, 2004; Charvin *et al.*, 2005; Deyts *et al.*, 2009). Este sistema modelo consiste en cultivos primarios de neuronas del cuerpo estriado transfectadas de manera transitoria con un constructo de ADNc que codifica para el primer exón de Htt con un tramo de 25 poliglutaminas (Htt) o 103 poliglutaminas (Exp-Htt). En este modelo celular, la sobreexpresión de Exp-Htt conduce a una formación de agregados espontánea y a la muerte. Estos dos parámetros pueden evaluarse 24 y 48 horas tras la transfección, respectivamente. Para analizar un posible papel protector de CYP46A1, se cotransfectó ADNc que codifica para la proteína de longitud completa en su forma de tipo natural (CYP46A1) o mutada (mut-CYP46A1) junto con Exp-Htt. Se detectó la expresión de Htt o Exp-Htt debido al marcaje con GFP, mientras que se detectaron CYP46A1 y mut-CYP46A1 tras el inmunomarcaje con Ha. En los ensayos de cotransfección, todas las neuronas transfectadas mostraron coexpresión de GFP y Ha (figura 2).

B-1) Efecto de la sobreexpresión de CYP46A1 sobre la formación de agregados mediada por ExpHtt:

Veinticuatro horas tras la transfección de neuronas del cuerpo estriado con el plásmido que codifica para GFP-ExpHtt, el 58% de las neuronas transfectadas mostraba agregados de Exp-Htt (figura 3). No se observaron agregados en neuronas que expresaban GFP-Htt (datos no mostrados). La coexpresión de CYP46A1 con ExpHtt promovió una disminución fuerte y significativa de la formación de agregados (el 58% frente al 27,5%) (figura 3). Se encontró una disminución ligera pero significativa de agregados (el 58% frente al 47%) con el mutante de CYP46A1 inactivo. En conclusión, la sobreexpresión de CYP46A1 protege a las neuronas del cuerpo estriado de la formación de agregados por Exp-Htt.

B.2). Efecto de la expresión de CYP46A1 sobre la muerte de neuronas del cuerpo estriado mediada por ExpHtt:

La expresión de ExpHtt en neuronas del cuerpo estriado indujo una disminución significativa de la supervivencia en comparación con neuronas que expresan Htt (figura 4). De hecho, 48 h tras la transfección, el 89% de las neuronas que expresaban Htt estaban todavía vivas tras la transfección mientras que sólo el 55% de las neuronas que expresaban Exp-Htt sobrevivían. La coexpresión de mut-CYP46A1 con Exp-Htt no protegió frente a la muerte del cuerpo estriado. En cambio, se encontró una neuroprotección en neuronas del cuerpo estriado que coexpresaban Exp-Htt y CYP46A1 (figura 4). Por tanto, el porcentaje de neuronas supervivientes se elevó hasta el 76% en neuronas transfectadas con Exp-Htt + CYP46A1, en comparación con hasta el 55% en neuronas que expresan Exp-Htt sólo o el 89% en neuronas que expresan Htt. Por tanto, CYP46A1 presenta un fuerte efecto protector sobre la muerte neuronal inducida por ExpHtt.

Ejemplo 2: Efecto de CYP46A1 *in vivo*:

Material y procedimientos

Suministro al cuerpo estriado de AAVrh.10-GFP y AAVrh.10-CYP46A1-Ha en ratones

Los dos vectores AAVrh10 utilizados contenían un casete de expresión que consistía en el ADNc de gfp (AAVrh.10-GFP) o el ADNc de CYP46A1 humana en marco con una etiqueta de hemaglutinina (AAVrh.10-CYP46A1-Ha) dirigidos por un promotor híbrido de CMV/ β -actina rodeado por repeticiones terminales invertidas de AAV2. Ambos

vectores AAVrh10 se produjeron en el laboratorio del Pr. Ronald G. Crystal (Departamento de Medicina Genética, Weill Medical College de la Universidad de Cornell, Nueva York, Nueva York, USA). A las 4 semanas de edad se anestesiaran ratones WT o R6/2 mediante inyección intraperitoneal de disolución de ketamina/xilacina (ketamina 100 mg/kg, Merial, Lyon, Francia y xilacina 10 mg/kg, Bayer Health Care, Alemania) y se colocaron en un aparato estereotáctico (Kopf) en un laboratorio PC2 (nivel de contención física 2) convencional. Los ratones recibieron administración de AAVrh.10 GFP (103 vg/ml) o AAVrh.10 CYP46A1-Ha (1,6 1012 vg/ml) o solución salina (NaCl al 0,001%) de manera bilateral en el cuerpo estriado (A/P +0,5 mm, M/L +/- 2,1 mm, D/V -3,35 mm), el volumen inyectado fue de 2 µl a una velocidad de 0,2 µl/min. Tras la cirugía, los ratones se recuperaron durante 72 horas en una instalación para animales PC2 y se transfirieron a una plataforma de fenotipo con una instalación para animales PC1.

Evaluación de la transducción y el tropismo de AAVrh.10 en el cerebro tras el suministro in vivo

Tres semanas tras el suministro de AAVrh.10-GFP o AAVrh.10-CYP46A1-Ha en el cuerpo estriado de ratones WT, se anestesiaron los animales mediante sobredosis de pentobarbital sódico 250 mg/kg (Sanofi, París, Francia), perfundido de manera transcardiaca con una disolución de paraformaldehído al 4% suministrada con una bomba peristáltica a 25 ml/min durante 5 min. Entonces se fijaron posteriormente los cerebros durante la noche en la misma disolución y se almacenaron a 4°C. Se cortaron secciones coronales o sagitales (30 µm) con un vibrátomo (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, Francia) y se mantuvieron en una disolución que contenía el etilenglicol al 30%, glicerol al 30% y tampón fosfato 0,1 M a -20°C hasta el procesamiento para el análisis histológico.

Transducción de AAVrh.10

Se determinó la transducción de AAVrh.10 en el cerebro 3 semanas tras el suministro del vector AAVrh.10-GFP en ratones WT. Tras tres enjuagues en TBS, se montaron las secciones cerebrales bajo cubreobjetos con Vectashield (Vector Laboratories) y se analizó la tinción con GFP en secciones cerebrales coronales a lo largo de la extensión rostro-caudal del cerebro utilizando un microscopio motorizado de epifluorescencia (Zeiss) equipado con una cámara CCD conectada a un ordenador PC. Se realizó la reconstrucción tomográfica de la fluorescencia verde emitida a partir del cuerpo estriado a partir de fotografías en mosaico (Mastronarde, D.N., 1997) seguido por una representación tridimensional gracias al software IMOD (Kremer *et al*, 1996).

Tropismo de AAVrh.10

Se estudió el tropismo de AAVrh.10 en el cerebro 3 semanas tras el suministro del vector AAVrh.10 CYP46A1Ha en el cuerpo estriado de ratones WT. Se evaluaron marcadores neuronales y gliales específicos mediante inmunohistoquímica. Se enjuagaron secciones en flotación libre en TBS y se incubaron durante 15 min con Triton X-100 al 0,2% en TBS. Tras tres enjuagues, se saturaron las secciones en flotación durante 1 h a temperatura ambiente con NGS al 10% en TBS. Entonces se enjuagaron las secciones tres veces en TBS y se incubaron con el anticuerpo primario (Ha 1/500, Covance; NeuN 1/200, AbCys Vector; Olig2 1/1000, Millipore; GFAP 1/1000, Dako; isolectina 1/1000, Chemicon) durante la noche a 4°C en TBS1X-NGS al 5%. Entonces se incubaron las secciones durante 90 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Alexa Fluor (1/1000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Tras tres enjuagues en TBS, se montaron las secciones de tejido bajo cubreobjetos con Vectashield (Vector Laboratories) para la microscopía de fluorescencia.

Estudio in vivo de AAVrh10-CYP46A1Ha en modelo de ratón de HD

Se sometieron a prueba la prueba de agarre y el rendimiento en Rotarod dos semanas tras el suministro de AAVrh.10-CYP46A1-Ha o inyección de solución salina en ratones WT y R6/2. Para la puntuación de agarre, se sometieron a prueba los ratones una vez cada semana desde 6 semanas hasta 11 semanas de edad. Se suspendieron los ratones por la cola durante 30 segundos y se clasificó el fenotipo de agarre a un nivel particular según la siguiente escala: 0, sin agarre; 1, agarre de las extremidades delanteras sólo; 2, agarre de las extremidades tanto delanteras como traseras una o dos veces; 3, agarre de las extremidades tanto delanteras como traseras más de 3 veces o más de 5 segundos. Para el rendimiento en Rotarod, se sometieron a prueba los ratones a lo largo de 3 días consecutivos una única semana desde 6 semanas hasta 11 semanas de edad. Se realizó un ensayo de entrenamiento a las 5 semanas de edad pero no se incluyeron los datos en los resultados finales. Las sesiones diarias incluían un ensayo de entrenamiento de 5 minutos a 4 RPM. Al menos 1 hora después, se sometieron a prueba los ratones en tres ensayos de 5 minutos con una velocidad en aceleración (desde 0 hasta 40 RPM en 5 minutos) separados por un intervalo entre ensayo de 30 minutos. Se registró la cantidad de tiempo hasta que cayeron del Rotarod. Se retiraron los ratones que permanecieron en el Rotarod durante más de 5 minutos y se puntuó su tiempo como 300 segundos.

Análisis estadístico

Se utilizó análisis de ANOVA bilateral seguido por la prueba de Bonferroni para las comparaciones del rendimiento en Rotarod (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$). Para todos los análisis estadísticos se consideró que la diferencia entre comparaciones era significativa cuando $P < 0,05$.

Resultados

C. Suministro de CYP46A1 *in vivo* utilizando el vector AAVrh.10

C1. Eficacia de transducción

Con el fin de expresar CYP46A1 en el cuerpo estriado de ratones, se decidió utilizar el vector AAVrh.10. En una primera etapa, se utilizó AAVrh.10 que expresaba el ADNc que codifica para GFP. Se administró el vector AAVrh.10-GFP en el cuerpo estriado, *in vivo*, utilizando microinyecciones (véase la sección de procedimiento). Se analizó la expresión de GFP a partir de secciones sagitales y coronales 3 semanas tras la inyección. Utilizando los parámetros, podía observarse GFP dentro de toda la extensión del cuerpo estriado dorsal, junto con el globo pálido y la corteza cerebral, dos estructuras cerebrales conectadas sinápticamente al cuerpo estriado (figuras 5A y 5B). Se realizó una representación tridimensional de las secciones coronales que expresaban GFP, mostrando expresión de GFP en el 63% del cuerpo estriado, es decir la totalidad del cuerpo estriado dorsal (figura 6A y 6B).

C2. Tropismo neuronal

Entonces, se utilizó el vector AAVrh.10-CYP46A1-Ha (figura 7A) según las mismas condiciones experimentales (2 microlitros a 1,6 10¹² vg/ml). Se reveló la expresión de CYP46A1 inducida por este vector utilizando inmunocitodetección de Ha que se encontró, tal como se esperaba, dentro de la totalidad del cuerpo estriado dorsal (caudal-putamen-CpU) (figura 7B). Al nivel celular, se encontró una ubicación citoplasmática del producto CYP46A1-Ha (figura 7C). Tal como se evaluó mediante detección inmunocitoquímica doble, el vector AAVrh10 presentaba un fuerte tropismo neuronal, puesto que el marcaje con Ha se solapaba perfectamente con el marcador neuronal NeuN (figura 7C-D). Se realizaron experimentos adicionales utilizando marcadores gliales, para astrocitos (GFAP), astroglia (isolectina) y oligodendrocitos (Olig2). Ninguno de estos marcadores marcaba conjuntamente con Ha (figura 8A-C). Por tanto, conjuntamente estos datos indican que el vector AAVrh10-CYP46A1-Ha presenta un tropismo neuronal estricto.

D. Suministro de AAVrh.10-Cyp46A1-Ha en el modelo de ratón R6/2 de HD

D1. Protección conductual

Se utilizaron el modelo de ratón transgénico de HD, los ratones R6/2 que sobreexpresan el primer exón del gen de HTT humano con 150 repeticiones de CAG y sus compañeros de camada de tipo natural, en esta parte del estudio. A ambas cepas se les inyectó de manera bilateral dentro del cuerpo estriado el vector AAVrh.10-CYP46A1-Ha (n=6 para ratones de tipo natural y n=12-13 para ratones R6/2) a las 4 semanas tras el nacimiento. A los grupos control se les inyectó una solución salina según las mismas condiciones experimentales.

Se evaluaron los rendimientos conductuales de los ratones en los que se realizaron las inyecciones desde 6 semanas hasta 11 semanas tras el nacimiento utilizando las pruebas de Rotarod (figura 9) y de agarre (figura 10). Cualquiera que fuese la inyección en el cuerpo estriado (es decir, solución salina o AAVrh.10-CYP46A1-Ha), los ratones de tipo natural mostraron el mismo rendimiento conductual en la prueba de Rotarod (figura 9), con una ligera disminución entre 9 y 11 semanas tras el nacimiento, lo que refleja probablemente una ligera disminución en la motivación a realizar esta prueba. Los ratones R6/2 a los que se les inyectó solución salina y AAVrh.10-CYP46A1-Ha mostraron un rendimiento significativamente inferior que los ratones de tipo natural desde 6 hasta 11 semanas (figura 9). No obstante, aunque los ratones R6/2 a los que se les inyectó solución salina presentaban una disminución progresiva en esta prueba entre 6 y 11 semanas, los ratones R6/2 a los que se les inyectó AAVrh10-CYP46A1-Ha permanecieron al mismo nivel de rendimiento (figura 9). A las 11 semanas tras el nacimiento (7 semanas tras la inyección), los ratones R/6 a los que se les inyectó AAVrh.10-CYP46A1-Ha no eran significativamente diferentes de los ratones de tipo natural a los que se les inyectó solución salina.

Los ratones R6/2 a los que se les inyectó solución salina mostraron una alteración progresiva en la respuesta de agarre de las extremidades traseras durante la suspensión por la cola (figura 10A). A las 11 semanas tras el nacimiento casi el 100% de estos ratones alcanzaron la puntuación máxima (agarre de las extremidades tanto delanteras como traseras más de 5 segundos). Los ratones R6/2 a los que se les inyectó AAVrh10-CYP46A-Ha mostraron un retraso en su respuesta y una puntuación significativamente inferior a las 11 semanas, es decir, sólo el 30% de estos ratones mostraron una puntuación de 3 (figura 10B). Conjuntamente, estos datos indican que AAVrh.10-CYP46A1-Ha alivia el deterioro locomotor inducido por la mutación en HD.

Bibliografía

Cearley CN, Wolfe JH. Mol Ther. Marzo de 2006; 13(3):528-37 y Cearley CN, Vandenberghe LH, Parente MK, Carnish ER, Wilson JM, Wolfe JH. Mol Ther. Octubre de 2008; 16(10):1710-8

Charvin, D., Vanhoutte, P., Pages, C., Borrelli, E., y Caboche, J. (2005) Unraveling a role for dopamine in

- 5 Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 12218-12223. Deyts C, Galan-Rodriguez B, Martin E, Bouveyron N, Roze E, Charvin D, Caboche J, Bétuing S. (2009) Dopamine D2-receptor stimulation potentiates PolyQ-Huntingtin-induced mouse striatal neuron dysfunctions via Rho/ROCKII activation PloS One. 15 de diciembre; 4(12):e8287
- Garcia M, Charvin D, Caboche J. (2004) Expanded-huntingtin activates the c-Jun terminal kinase/c-Jun pathway prior to aggregate formation in traital neurons in culture Neuroscience. 2004; 127(4):859-70.
- 10 Roze E, Betuing S, Deyts C, Marcon E, Brami-Cherrier K, Pages C, Humbert S, Mérienne K, Caboche J. (2008) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 deficiency is involved in expanded-huntingtin-induced transcriptional dysregulation and striatal death. FASEB J. 22(4):1083-93.
- 15 Valenza M, Cattaneo E (2006) Cholesterol dysfunction in neurodegenerative diseases: is Huntington's disease in the list. Prog Neurobiol. 80(4):165-76.

Listado de secuencias

- 20 <110> INSERM
- <120> MÉTODOS Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON
- 25 <130> BIO10491CABOCHE
- <160> 6
- <170> PatentIn versión 3.3
- 30 <210> 1
- <211> 2138
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 566 495 T3

atgagccccg ggctgctgct gctcggcagc gccgtcctgc tcgccttcgg cctctgctgc	60
accttcgtgc accgcgctcg cagccgctac gagcacatcc ccgggcccgc gcggcccagt	120
ttccttctag gacacctccc ctgcttttgg aaaaaggatg aggttggtgg ccgtgtgctc	180
caagatgtgt ttttggttgg ggctaagaag tatggacctg ttgtgcgggt caacgtcttc	240
cacaaaacct cagtcctcgt caccgagtcct gagtccgtta agaagttcct gatgtcaacc	300
aagtacaaca aggactccaa gatgtaccgt gcgctccaga ctgtgtttgg tgagagactc	360
ttcggccaag gcttggtgtc cgaatgcaac tatgagcgtt ggcaacaagc gcggagagtc	420
atagacctgg ccttcagccg gagctccttg gttagcttaa tggaaacatt caacgagaag	480
gctgagcagc tgggtggagat tctagaagcc aaggcagatg ggcagacccc agtgtccatg	540
caggacatgc tgacctacac cgccatggac atcctggcca aggcagcttt tgggatggag	600
accagtatgc tgctgggtgc ccagaagcct ctgtcccagg cagtgaact tatgttggag	660
ggaatcactg cgtcccga cactctggca aagttcctgc cagggagag gaagcagctc	720
cgggaggtcc gggagagcat tcgcttcctg cgccagggtg gcagggactg ggtccagcgc	780
cgccgggaag ccctgaagag gggcgaggag gttcctgccg acatcctcac acagattctg	840
aaagctgaag agggagccca ggacgacgag ggtctgctgg acaacttcgt caccttcttc	900
attgctggtc acgagacctc tgccaaccac ttggcggtca cagtgatgga gctgtctcgc	960
cagccagaga tcgtggcaag gctgcaggcc gaggtggatg aggtcattgg ttctaagagg	1020
tacctggatt tcgaggacct ggggagactg cagtacctgt ccaggtcct caaagagtcg	1080
ctgaggctgt acccaccagc atggggcacc tttcgcctgc tggaagagga gaccttgatt	1140
gatggggtca gagtccccgg caacaccccc ctcttgttca gcacctatgt catggggcgg	1200
atggacacat actttgagga cccgctgact ttcaaccccc atcgcttcgg ccctggagca	1260
cccaagccac ggttcaccta ctcccccttc tccctgggce accgctcctg catcgggcag	1320
cagtttgctc agatggaggt gaaggtggtc atggcaaagc tgctgcagag gctggagttc	1380

```

cgggtggtgc ccgggcagcg cttcgggctg caggagcagg ccacactcaa gccactggac 1440
cccgtgctgt gcaccctgcg gccccgcggc tggcagcccg cccccccacc acccccctgc 1500
tgagggggcc tccaggcagg acgagactcc tcgggcaagg gccgtgcccg cccacctctg 1560
ctgcccacgg ccacccaccc ttctcccctg ccccgcccc tgggccaccc ttcacgctgg 1620
cttcacgagg gccctctgcc gaccgcctgc ttcacacccc tcagcgctcc ctgtcgctg 1680
cggactccat ggcccttcct ggactggccc ttgcccaact cccagccacc accactgtcc 1740
ctaccactga gcccttgac aggccacttg ctacagcag acaccctaac tcttgctcac 1800
tccctaaagc cctcttcagg ggtcacctcc tccaagaagc cctccttgcc accccccgcc 1860
ggcagggggc cctcctctgt gctccctcgg tcacctgtgc tacctctaac accacactga 1920
ccacactgta tcgtgagtgt ccgttgacgt gaccaattgc cctgccaggc tgtcagcgcc 1980
tcaagggtag ggtctgcgtg tgatttgtct ctgagcccc tgtgccacc cagggcccgg 2040
cacagagtcg atgctcaata aatgtgtgtt gactgcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2100
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2138

```

<210> 2
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2
 Met Ser Pro Gly Leu Leu Leu Leu Gly Ser Ala Val Leu Leu Ala Phe
 1 5 10 15

Gly Leu Cys Cys Thr Phe Val His Arg Ala Arg Ser Arg Tyr Glu His
 20 25 30

Ile Pro Gly Pro Pro Arg Pro Ser Phe Leu Leu Gly His Leu Pro Cys
 35 40 45

Phe Trp Lys Lys Asp Glu Val Gly Gly Arg Val Leu Gln Asp Val Phe
 50 55 60

Leu Asp Trp Ala Lys Lys Tyr Gly Pro Val Val Arg Val Asn Val Phe
 65 70 75 80

His Lys Thr Ser Val Ile Val Thr Ser Pro Glu Ser Val Lys Lys Phe
 85 90 95

Leu Met Ser Thr Lys Tyr Asn Lys Asp Ser Lys Met Tyr Arg Ala Leu
 100 105 110

Gln Thr Val Phe Gly Glu Arg Leu Phe Gly Gln Gly Leu Val Ser Glu
 115 120 125

Cys Asn Tyr Glu Arg Trp His Lys Gln Arg Arg Val Ile Asp Leu Ala
130 135 140

Phe Ser Arg Ser Ser Leu Val Ser Leu Met Glu Thr Phe Asn Glu Lys
145 150 155 160

Ala Glu Gln Leu Val Glu Ile Leu Glu Ala Lys Ala Asp Gly Gln Thr
165 170 175

Pro Val Ser Met Gln Asp Met Leu Thr Tyr Thr Ala Met Asp Ile Leu
180 185 190

Ala Lys Ala Ala Phe Gly Met Glu Thr Ser Met Leu Leu Gly Ala Gln
195 200 205

Lys Pro Leu Ser Gln Ala Val Lys Leu Met Leu Glu Gly Ile Thr Ala
210 215 220

Ser Arg Asn Thr Leu Ala Lys Phe Leu Pro Gly Lys Arg Lys Gln Leu
225 230 235 240

Arg Glu Val Arg Glu Ser Ile Arg Phe Leu Arg Gln Val Gly Arg Asp
245 250 255

Trp Val Gln Arg Arg Arg Glu Ala Leu Lys Arg Gly Glu Glu Val Pro
260 265 270

Ala Asp Ile Leu Thr Gln Ile Leu Lys Ala Glu Glu Gly Ala Gln Asp
275 280 285

Asp Glu Gly Leu Leu Asp Asn Phe Val Thr Phe Phe Ile Ala Gly His
290 295 300

Glu Thr Ser Ala Asn His Leu Ala Phe Thr Val Met Glu Leu Ser Arg
305 310 315 320

Gln Pro Glu Ile Val Ala Arg Leu Gln Ala Glu Val Asp Glu Val Ile
325 330 335

Gly Ser Lys Arg Tyr Leu Asp Phe Glu Asp Leu Gly Arg Leu Gln Tyr
340 345 350

Leu Ser Gln Val Leu Lys Glu Ser Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp
355 360 365

Gly Thr Phe Arg Leu Leu Glu Glu Glu Thr Leu Ile Asp Gly Val Arg
370 375 380

ES 2 566 495 T3

Val Pro Gly Asn Thr Pro Leu Leu Phe Ser Thr Tyr Val Met Gly Arg
385 390 395 400

Met Asp Thr Tyr Phe Glu Asp Pro Leu Thr Phe Asn Pro Asp Arg Phe
405 410 415

Gly Pro Gly Ala Pro Lys Pro Arg Phe Thr Tyr Phe Pro Phe Ser Leu
420 425 430

Gly His Arg Ser Cys Ile Gly Gln Gln Phe Ala Gln Met Glu Val Lys
435 440 445

Val Val Met Ala Lys Leu Leu Gln Arg Leu Glu Phe Arg Leu Val Pro
450 455 460

Gly Gln Arg Phe Gly Leu Gln Glu Gln Ala Thr Leu Lys Pro Leu Asp
465 470 475 480

Pro Val Leu Cys Thr Leu Arg Pro Arg Gly Trp Gln Pro Ala Pro Pro
485 490 495

Pro Pro Pro Cys
500

<210> 3
<211> 20
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 3
tcctctcctg ttcagcacct 20

<210> 4
15 <211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
20 <223> Cebador

<400> 4
ggccatgaca actttcacct 20

<210> 5
25 <211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
30 <223> Cebador

<400> 5
35 ttgctcgaga tgtcatgaag ga 22

ES 2 566 495 T3

	<210> 6	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 6	
10	agcaggtcag caaagaactt atag	24

REIVINDICACIONES

1. Vector para su utilización en el tratamiento de la enfermedad de Huntington, comprendiendo dicho vector la secuencia completa de ácido nucleico que codifica para colesterol 24-hidroxilasa.
2. Vector según la reivindicación 1, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 2.
3. Vector según la reivindicación 2, que comprende la secuencia SEC ID nº: 1.
4. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se selecciona de entre el grupo constituido por vectores de adenovirus, retrovirus, herpesvirus y virus adenoasociados (AAV).
5. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un vector de AAV.
6. Vector según la reivindicación 5, que es un AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AA5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10.
7. Vector según la reivindicación 6, que es un vector AAV10.
8. Vector según las reivindicaciones 1 a 7, que se administra directamente al cerebro del sujeto.
9. Vector según la reivindicación 8, que se administra al núcleo rojo, el cuerpo amigdalino, la corteza entorrinal y neuronas ventrales laterales, o a los núcleos anteriores del tálamo, por microinyección estereotáctica.
10. Vector según las reivindicaciones 1 a 8, que se administra por inyección intravenosa.
11. Vector según las reivindicaciones 1 a 8, que se administra por inyección intratecal.
12. Vector según las reivindicaciones 1 a 8, que se administra a los ventrículos.
13. Composición farmacéutica para su utilización en el tratamiento de la enfermedad de Huntington, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Composición farmacéutica según la reivindicación 13, para su utilización en el tratamiento de la enfermedad de Huntington que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector AAV10, que comprende la secuencia completa de ácido nucleico que codifica para colesterol 24-hidroxilasa.

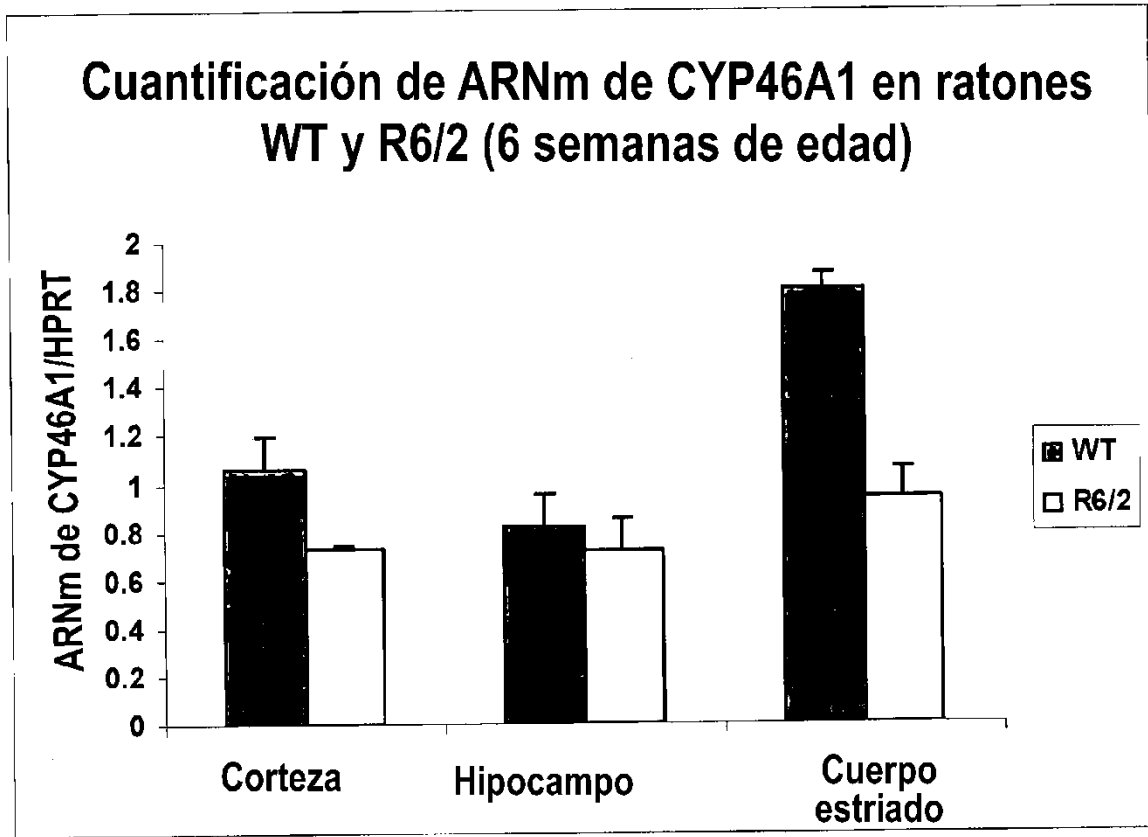


Figura 1

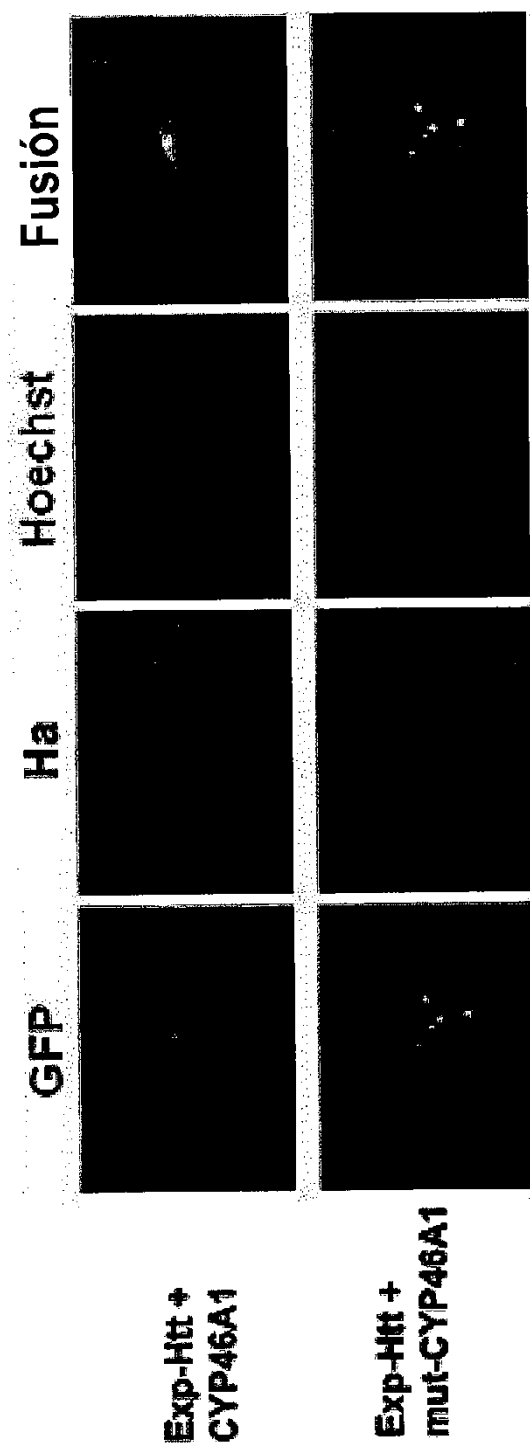


Figura 2

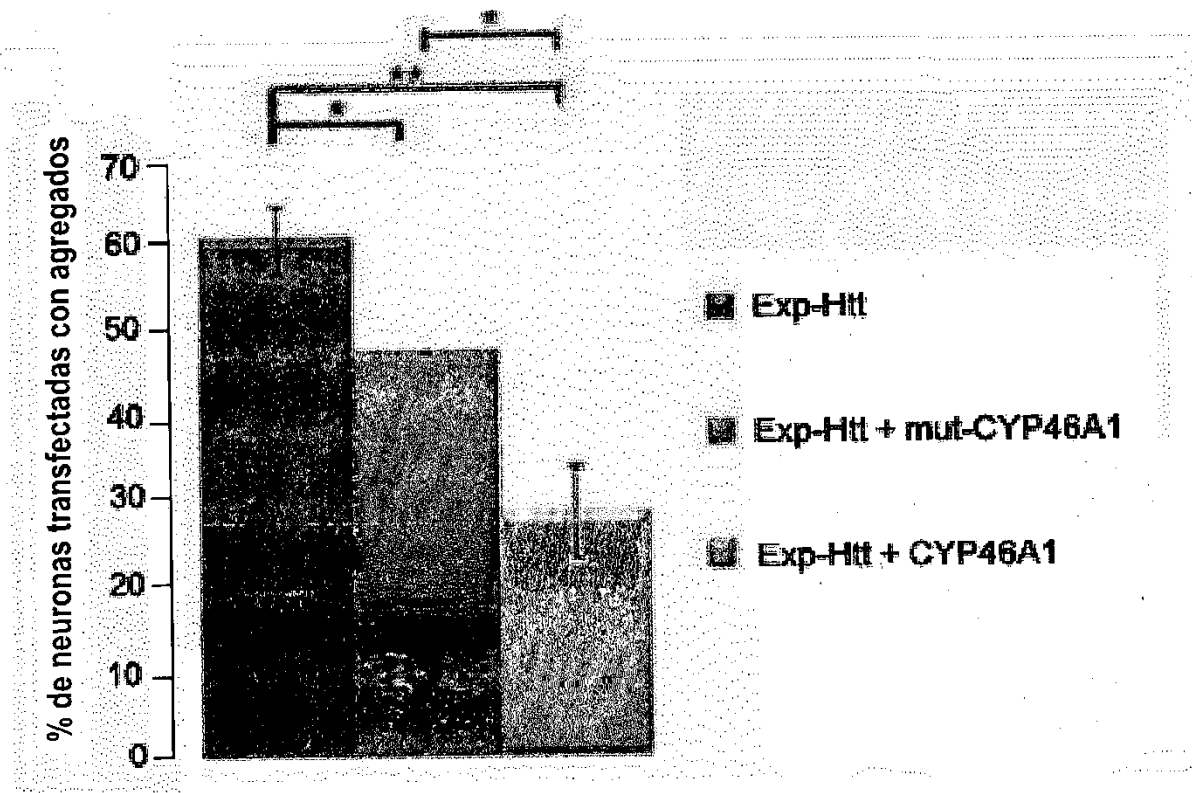


Figura 3

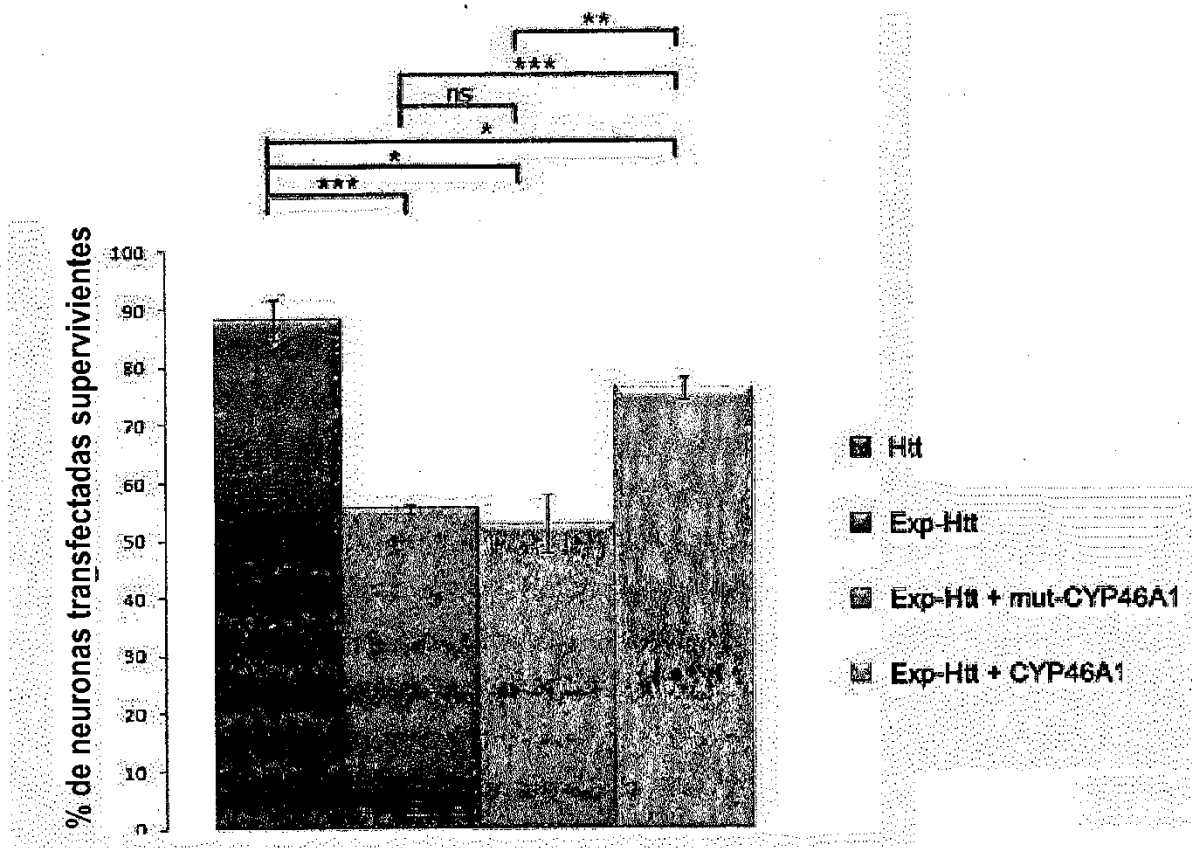


Figura 4

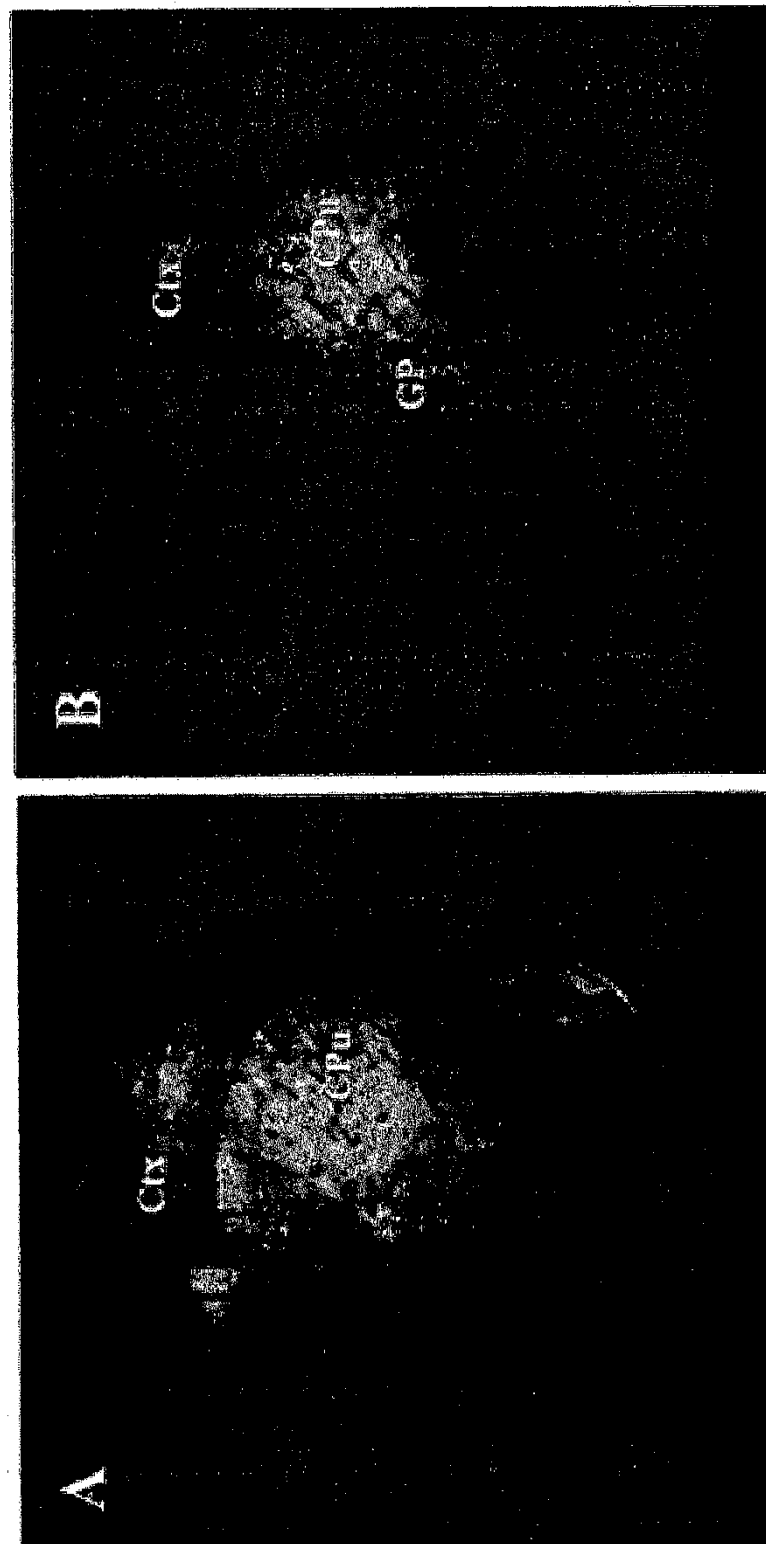


Figura 5

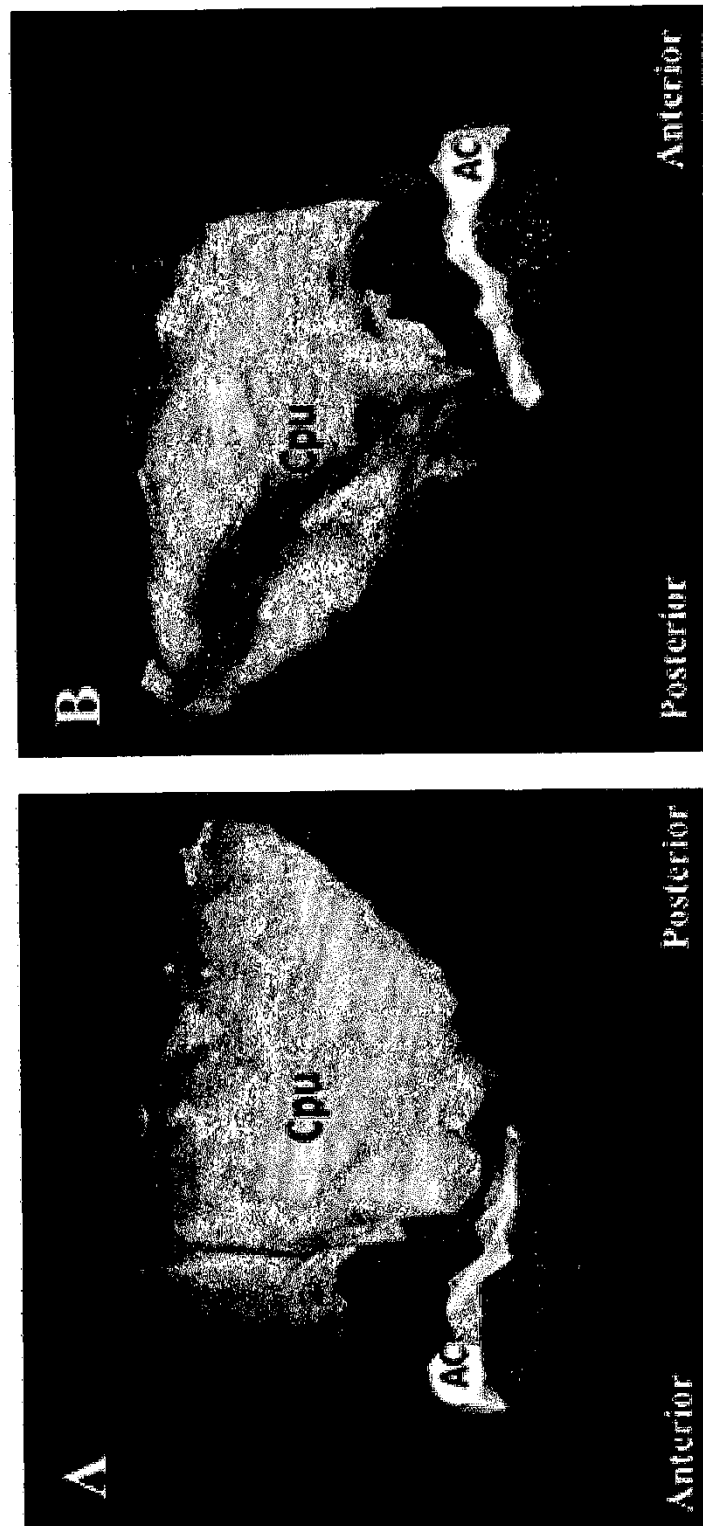


Figura 6

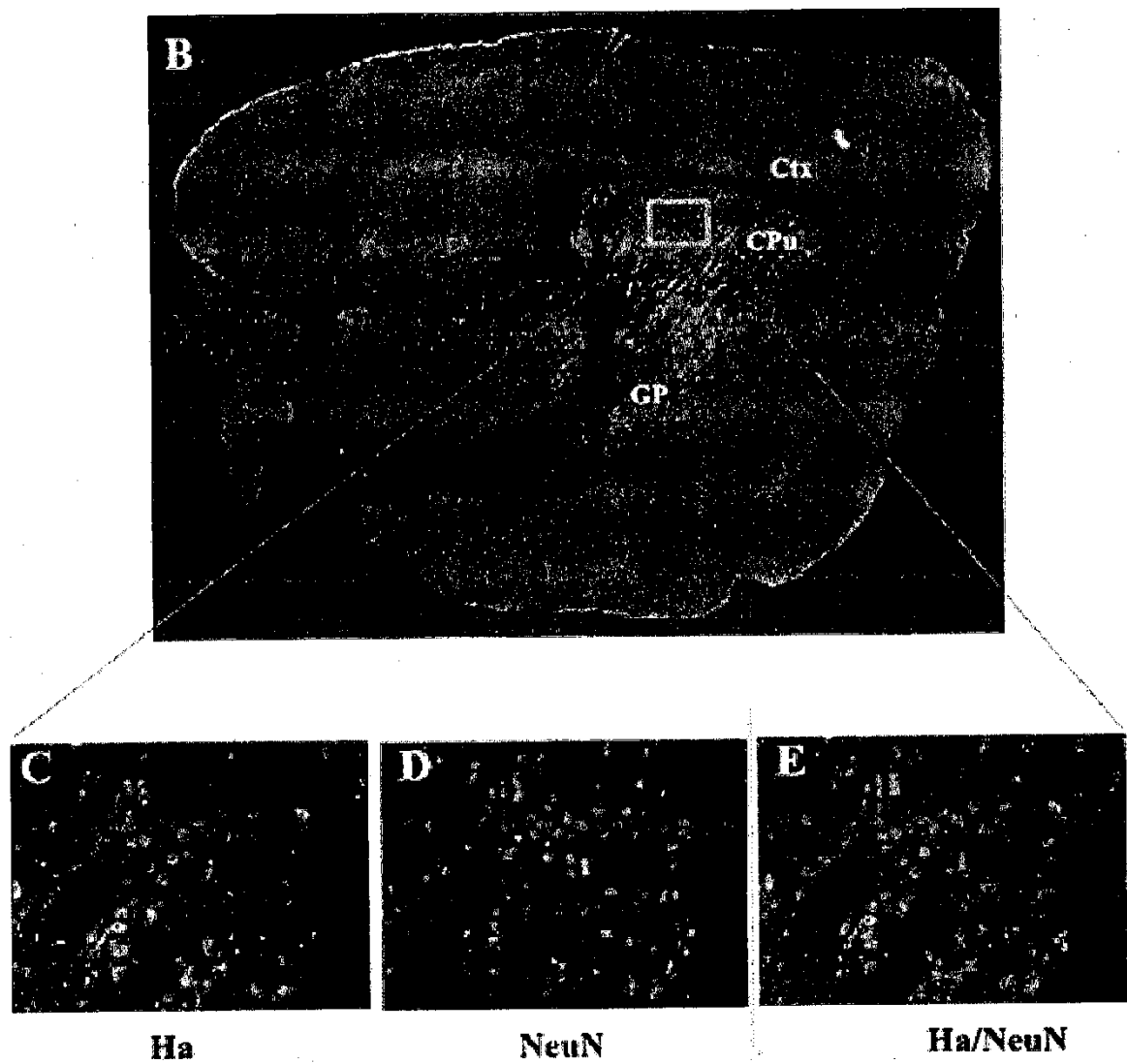


Figura 7

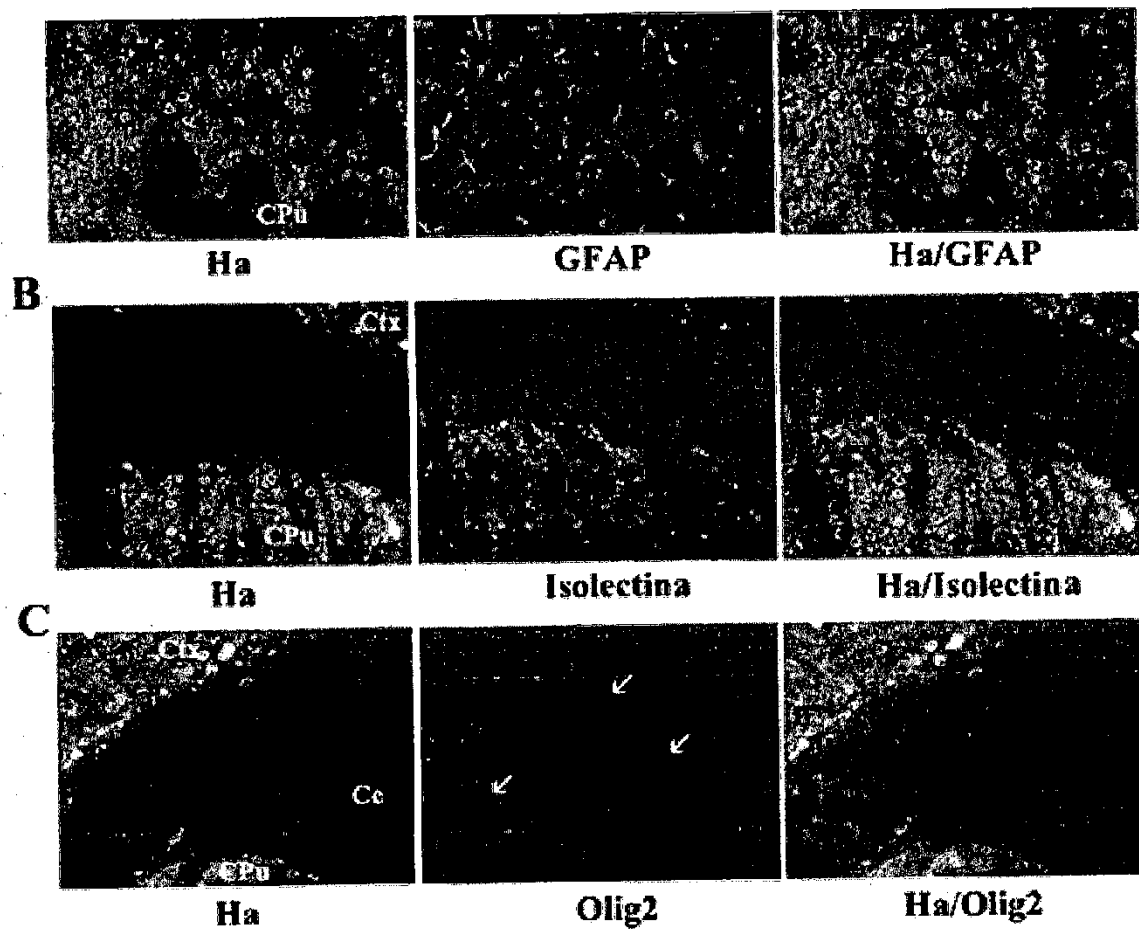


Figura 8

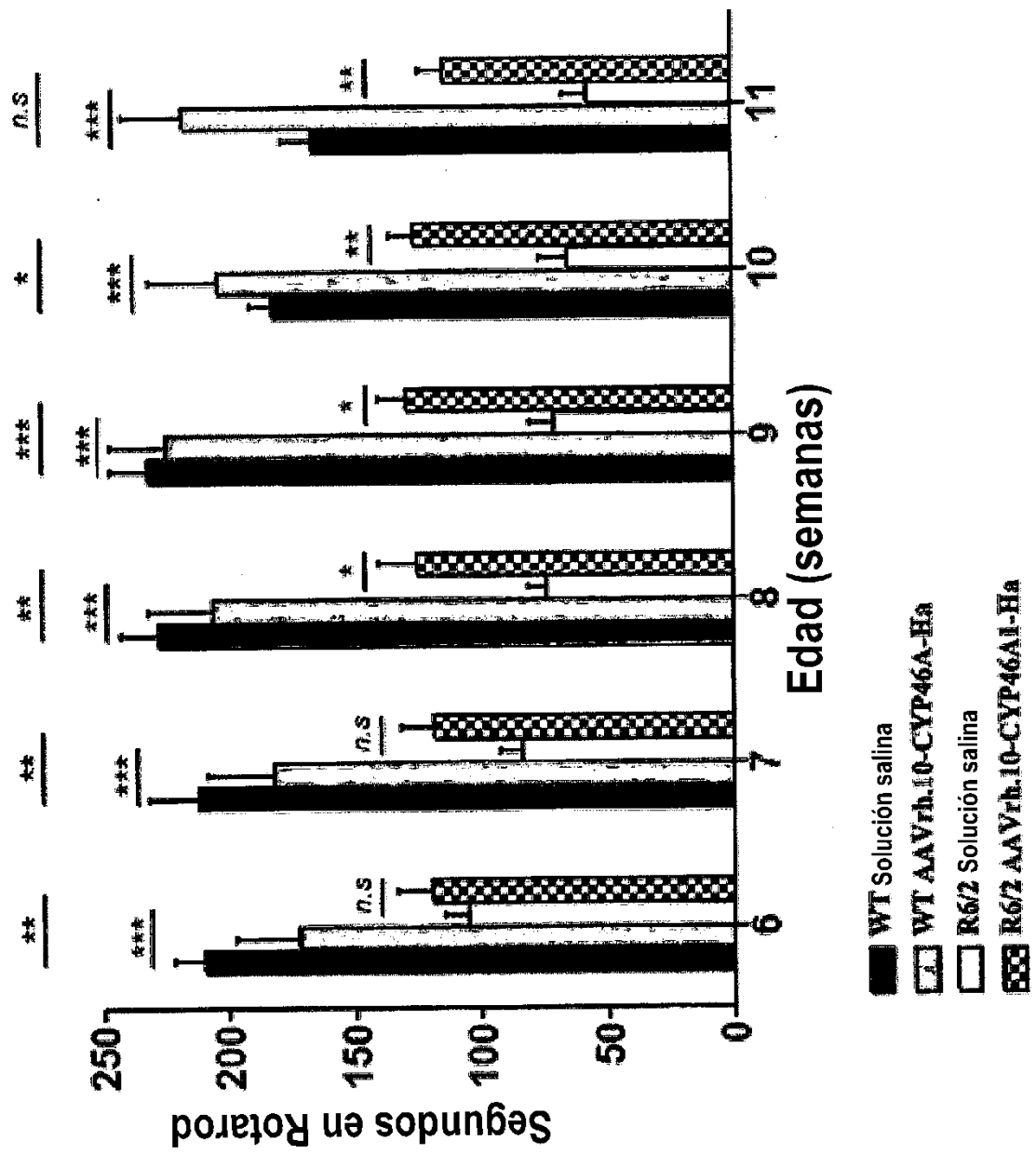


Figura 9

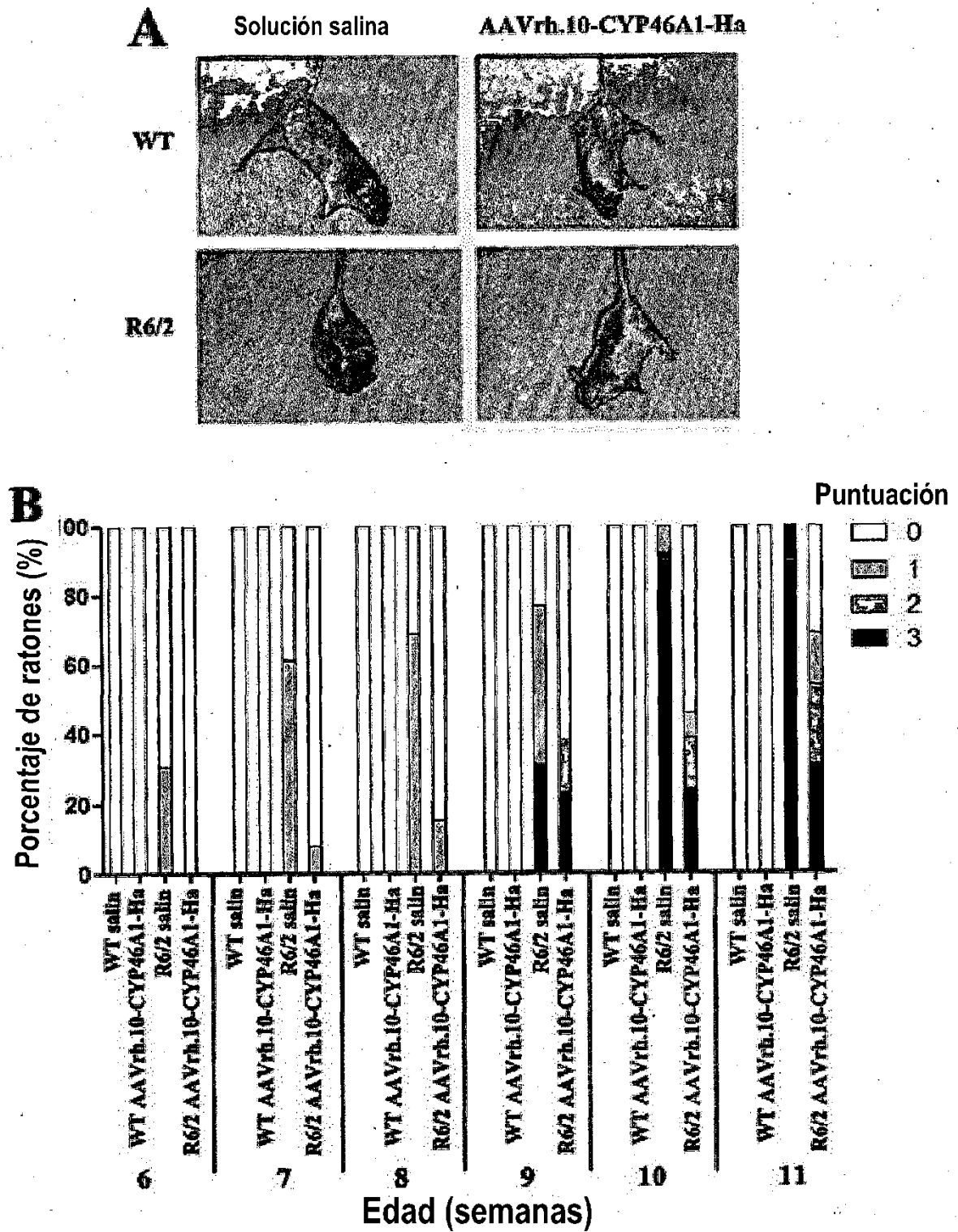


Figura 10