

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 200**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/76** (2015.01)

**A61K 38/44** (2006.01)

**C12N 15/864** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2008 E 08804014 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2187898**

54 Título: **Utilización de vectores víricos portadores del gen CYP46A1 para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

**12.09.2007 US 971624 P**

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

**09.09.2016**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (100.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75654 Paris Cedex 13, FR**

72 Inventor/es:

**AUBOURG, PATRICK;  
CARTIER-LACAVE, NATHALIE y  
HUDRY, ELOISE**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 582 200 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

Utilización de vectores víricos portadores del gen CYP46A1 para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la utilización del gen CYP46A1 para la utilización en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Más particularmente, la invención se refiere a la utilización de un vector vírico, preferentemente un vector virus adenoasociado (VVA) para la transferencia del gen CYP46A1 al cerebro de un paciente afectado por la enfermedad de Alzheimer.

**Antecedentes de la invención**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más prevalente de todos los trastornos neurodegenerativos. Aproximadamente 100.000 víctimas mueren y se diagnostican 360.000 nuevos casos de enfermedad de Alzheimer cada año. Actualmente no existe ningún tratamiento eficaz para la enfermedad de Alzheimer. La investigación ha sugerido varios posibles enfoques al tratamiento, tales como las estrategias colinérgicas: los inhibidores de la acetilcolinesterasa (por ejemplo Tacrine®, Cognex® o Exelon®) y los agonistas de receptores muscarínicos M1, factores neurotróficos (por ejemplo el factor de crecimiento nervioso), los inhibidores de oxidación (por ejemplo la vitamina E), los agentes quelantes de metales, fármacos inmunotrópicos, analgésicos no narcóticos (por ejemplo ibuprofeno), inhibidores de la agregación de beta-A4, estrógeno, etc. Sin embargo, hasta el momento, no se ha demostrado que ninguno de dichos enfoques cause una mejora significativa en la mayoría de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer. De esta manera, existe una necesidad médica antigua y acuciante de nuevos fármacos con un nuevo modo de acción para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Los mecanismos exactos que conducen a la EA no se entienden por completo, pero desde el aislamiento de la isoforma E4 de ApoE como el factor de riesgo más significativo de EA (Strittmatter W.J. et al., 1993), se ha establecido una conexión mecanicista entre el metabolismo del colesterol y la formación de las placas amiloides. En el ser humano, un nivel elevado de colesterol a mediana edad se asocia a un riesgo más alto de EA (Kivipelto M. et al., 2002) y las concentraciones de colesterol se encuentran incrementadas en los cerebros con EA (Cutler R.G. et al., 2004). La ApoE, que se une al colesterol y podría regular el transporte de los lípidos al interior de las neuronas, se observa en las placas seniles (Namba Y. et al., 1991) conjuntamente con el colesterol mismo (Mori T. et al., 2001). En la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, debido a una mutación del gen *NPC1* que codifica una proteína que participa en el transporte intracelular de colesterol a destinos postlisosómicos, el colesterol se acumula en las neuronas conjuntamente con el péptido A $\beta$  en los endosomas tardíos (Jin L.W. et al., 2004). En el modelo de ratón de EA, el colesterol en la dieta acelera la deposición de A $\beta$ , mientras que los fármacos reductores del colesterol lo reducen (Refolo L.M. et al., 2001). La inhibición de la acil-coenzima A colesterol aciltransferasa (ACAT), un enzima que controla el equilibrio entre el colesterol libre y los ésteres de colesterol se ha demostrado que reduce la patología amiloide (Hutter-Paier B. et al., 2004). Sin embargo, la inactivación de los genes que participan en el transporte del colesterol (ApoE, ABCA1 y receptor de LDL) en diversos ratones con EA transgénicos ha conducido a resultados divergentes, probablemente debido a que los cambios en el metabolismo del colesterol también resultaron inducidos durante el desarrollo, causando mecanismos compensatorios incontrolables. En vRT10, los cambios en el contenido de colesterol de la membrana induce cambios paralelos en la secreción de A $\beta$  (Simons M. et al., 1998; Eehalt R. et al., 2003). Se cree que dicha modulación se produce al nivel de las balsas lipídicas. Un contenido elevado de colesterol podría facilitar la agregación de la  $\beta$  secretasa incluidas en las balsas con PPA (Eehalt R. et al., 2003), la traslocación del complejo de la  $\gamma$ -secretasa a la balsa podría presentar una consecuencia similar (Vetrivel K.S. et al., 2005). Por otra parte, existe un mecanismo de retroalimentación negativa entre el procesamiento de la PPA y el metabolismo de los lípidos neuronales ya que A $\beta$ 40 inhibe la actividad de la HMG-CoA reductasa y, de esta manera, la síntesis del colesterol (Grimm M.O. et al., 2005).

La solicitud de patente internacional n° WO2004/055201 describe la colesterol 24-hidroxilasa como diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La colesterol 24-hidroxilasa es un enzima neuronal que se encuentra codificado por el gen CYP46A1. Convierte el colesterol en 24-hidroxicolesterol y presenta un papel crítico en el flujo de salida del colesterol del cerebro (Dietschy J.M. et al., 2004). El colesterol cerebral es producido esencialmente, aunque no puede ser degradado, *in situ*, y una barrera hematocefálica intacta restringe el transporte directo del colesterol desde el cerebro (Dietschy J.M. et al., 2004). El 24-hidroxicolesterol puede cruzar la membrana plasmática y la barrera hematocefálica y alcanza el hígado, en donde es degradado. Durante los estadios tempranos de la EA, las concentraciones de 24-hidroxicolesterol son elevadas en el líquido cerebroespinal (LCE) y en la circulación periférica. En estadios posteriores de la EA, las concentraciones de 24-hidroxicolesterol pueden caer, reflejando probablemente la pérdida neuronal (Kolsch H. et al., 2004). CYP46A1 se expresa en el entorno del núcleo amiloide de las placas neuríticas en el cerebro de los pacientes de EA (Brown J. III et al., 2004).

## Sumario de la invención

La presente invención proporciona un vector vírico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo el vector un ácido nucleico codificante de colesterol 24-hidroxiase, para la utilización en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, en el que el vector debe administrarse directamente en el cerebro del sujeto, o mediante inyección intravenosa o intratecal.

Preferentemente, el vector puede administrarse en el núcleo rojo, cuerpo amigdaloides, córtex entorrinal y neuronas en el ventral lateral, o en los núcleos anteriores del tálamo, mediante microinyección estereotáxica.

El vector vírico preferentemente comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2. Más preferentemente, el vector vírico comprende la secuencia SEC ID nº 1.

En una forma de realización preferida, el vector vírico puede ser un vector virus adenoasociado (VAA), preferentemente el vector VAA5.

## Descripción detallada de la invención

Los inventores han demostrado que la administración de un vector adenoasociado que expresa el gen *CYP46A1* en el cerebro de ratones PPA23, un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer, resulta en una reducción marcada de la neuropatología y en una mejora de los déficits cognitivos.

Sobre esta base los inventores proporcionan un vector vírico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en el que el vector expresa *CYP46A1* en las células del sistema nervioso central.

### Las secuencias de *CYP46A1*

El término "gen" se refiere a un polinucleótido que contiene por lo menos un marco de lectura abierto que puede codificar un polipéptido o proteína particular tras ser transcrito o traducido.

La expresión "secuencia codificante" o "una secuencia que codifica una proteína particular", se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que es transcrita (en el caso de ADN) y traducida (en el caso de ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* al situarse bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante están determinados por un codón de inicio en el extremo 5'(amino)-terminal y un codón de parada traduccional en el extremo 3'(carboxi)-terminal. Una secuencia codificante puede incluir de manera no limitativa ADNc de ARNm procariótico o eucariótico, secuencias de ADN genómico de ADN procariótico o eucariótico e incluso secuencias de ADN sintético.

El gen *CYP46A1* codifica la colesterol 24-hidroxiase. Este enzima es un miembro de la superfamilia de enzimas de la citocromo P450. Se da a conocer una secuencia de ADNc para *CYP46A1* en GenBank número de acceso NM\_006668 (SEC ID nº 1). Se muestra la secuencia de aminoácidos en SEC ID nº 2.

La invención utiliza un constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia SEC ID nº 1 o una variante de la misma para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Entre las variantes se incluyen, por ejemplo, variantes naturales debido a variaciones alélicas entre individuos (por ejemplo polimorfismos), formas de procesamiento alternativo, etc. El término variante incluye además secuencias del gen *CYP46A1* de otros orígenes u organismos. Las variantes preferentemente son sustancialmente homólogas respecto a SEC ID nº 1, es decir, muestran una identidad de secuencia de nucleótidos de típicamente por lo menos aproximadamente 75%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 85%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 90%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 95% respecto a SEC ID nº 1. Las variantes del gen *CYP46A1* incluyen además secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan con una secuencia tal como se ha definido anteriormente (o una cadena complementaria de la misma) bajo condiciones restrictivas de hibridación. Entre las condiciones restrictivas de hibridación típicas se incluyen las temperaturas superiores a 30°C, preferentemente superiores a 35°C, más preferentemente superiores a 42°C, y/o una salinidad inferior a aproximadamente 500 mM, preferentemente inferior a 200 mM. Las condiciones de hibridación pueden ser ajustadas por el experto en la materia mediante la modificación de la temperatura, salinidad y/o concentración de otros reactivos, tales como SDS, SSC, etc.

### Los vectores víricos

Los vectores víricos de administración génica útiles en la práctica de la presente invención pueden construirse utilizando métodos bien conocidos en la ciencia de la biología molecular. Típicamente, se ensamblan vectores víricos que portan transgenes a partir de polinucleótidos codificantes del transgén, elementos reguladores adecuados y elementos necesarios para la producción de proteínas víricas que median en la transducción celular.

La expresión "transferencia génica" o "administración génica" se refiere a métodos o sistemas para insertar fiablemente ADN extraño en las células hospedadoras. Dichos métodos pueden resultar en la expresión transitoria de ADN transferido no integrado, replicación extracromosómica y expresión de replicones transferidos (por ejemplo episomas) o la integración de material genético transferido en el ADN genómico de las células hospedadoras.

5 Entre los ejemplos de vectores víricos se incluyen vectores adenovíricos, retrovíricos, virus herpes y virus adenoasociados (VAA).

10 Dichos virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas, tal como mediante transfección de células empaquetadoras o mediante transfección transitoria con plásmidos ayudante o virus. Entre los ejemplos típicos de células empaquetadoras de virus se incluyen células PA317, células PsiCRIP, células G $\Psi$ env<sup>+</sup>, células 293, etc. Los protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes sin capacidad de replicación pueden encontrarse en, por ejemplo, los documentos n<sup>o</sup> WO95/14785 y n<sup>o</sup> WO96/22378, en las patentes US n<sup>o</sup> 5.882.877, n<sup>o</sup> 6.013.516, n<sup>o</sup> 4.861.719 y n<sup>o</sup> 5.278.056, y en el documento n<sup>o</sup> WO94/19478.

15 En una forma de realización preferida, se utilizan vectores víricos adenoasociados (VAA). En una forma de realización más preferida, el vector VAA es VAA5.

20 La expresión "vector VAA" se refiere a un vector derivado de un serotipo de virus adenoasociado, incluyendo, aunque sin limitación, VAA-1, VAA-2, VAA-3, VAA-4, VAA-5, VAA-6, VAA9, VAA10, etc. Los vectores VAA pueden presentar uno o más de los genes de tipo salvaje de VAA deletionados totalmente o en parte, preferentemente los genes *rep* y/o *cap*, aunque conservan secuencias RTI flanqueantes funcionales. Las secuencias RTI funcionales resultan necesarias para el rescate, replicación y empaquetamiento del virión de VAA. De esta manera, un vector VAA se define en la presente memoria para que incluya por lo menos aquellas secuencias requeridas en cis para la replicación y empaquetamiento (por ejemplo las RTI funcionales) del virus. Las RTI no son necesariamente secuencias de nucleótidos de tipo salvaje y pueden alterarse, por ejemplo mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos, con la condición de que las secuencias proporcionen el rescate funcional, la replicación y el empaquetamiento. Los vectores de expresión VAA se construyen utilizando técnicas conocidas para proporcionar por lo menos como componentes unidos funcionalmente en la dirección de transcripción, incluyendo los elementos de control una región de inicio de traducción, el ADN de interés (es decir, el gen CYP46A1) y una región de terminación de la transcripción.

35 Los elementos de control se seleccionan para que resulten funcionales en una célula de mamífero. El constructo resultante que contiene los componentes unidos operablemente se encuentra unido (5' y 3') a secuencias RTI del VAA funcionales. La expresión "repeticiones terminales invertidas de virus adenoasociado" o "RTI de VAA" se refiere a las regiones reconocidas en la técnica que se observan en cada extremo del genoma del VAA que funcionan conjuntamente en cis como orígenes de la replicación del ADN y como señales de empaquetamiento para el virus. Las RTI de VAA, conjuntamente con la región codificante *rep* del VAA, proporcionan una extracción y rescate eficientes y la integración de una secuencia de nucleótidos interpuesta entre dos RTI flanqueantes en un genoma de célula de mamífero. Las secuencias de nucleótidos de las regiones RTI del VAA son conocidas. Ver, por ejemplo, Kotin, 1994; Berns K.I., "Parvoviridae and their Replication", en: Fundamental Virology, 2a edición (B.N. Fields y D.M. Knipe, editores) para la secuencia VAA-2. Tal como se utiliza en la presente memoria, una "RTI de VAA" no comprende necesariamente la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje, pero puede resultar alterada, por ejemplo, mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos. Además, la RTI de VAA puede obtenerse de cualquiera de entre varios serotipos de VAA, incluyendo de manera no limitativa VAA-1, VAA-2, VAA-3, VAA-4, VAA-5, VAA-6, etc. Además, las RTI 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector VAA no deben ser necesariamente idénticas u obtenerse del mismo serotipo o aislado de VAA, con la condición de que funcionen tal como se requiere, es decir, que permitan la extracción y rescate de la secuencia de interés de un genoma de células hospedadoras o vector, y que permitan la integración de la secuencia heteróloga en el genoma de la célula receptora en el caso de que se encuentren presentes productos génicos Rep del VAA en la célula.

45 Resultan particularmente preferidos los vectores obtenidos de serotipos de VAA que presentan tropismo y una eficiencia de transducción elevada en células del SNC de mamífero, en particular neuronas. Se proporciona una revisión y comparación de las eficiencias de transducción de los diferentes serotipos en Davidson et al., 2000. En un ejemplo preferido, se ha demostrado que los vectores basados en VAA2 dirigen la expresión a largo plazo de los transgenes en el SNC, preferentemente transduciendo neuronas. En otros ejemplos no limitativos, entre los vectores preferidos se incluyen vectores derivados de los serotipos VAA4 y VAA5, los cuales también se ha demostrado que transducen células del SNC (Davidson et al., supra). En particular, el vector puede ser un vector VAA que comprende un genoma derivado de VAA5 (en particular las RTI son RTI de VAA5) y una cápside derivada del VAA5.

60 En una forma de realización particular de la invención, el vector es un vector VAA pseudotipado. Específicamente un vector VAA pseudotipado comprende un genoma del VAA derivado de un primer serotipo del VAA y una cápside derivada de un segundo serotipo del VAA. Preferentemente, el genoma del vector VAA se deriva de VAA2. Además, la cápside preferentemente se deriva del VAA5. Entre los ejemplos no limitativos específicos de vectores VAA pseudotipados se incluyen un vector VAA que comprende un genoma derivado de VAA2 en una cápside derivada de VAA5, un vector VAA que comprende un genoma derivado de VAA2 en una cápside derivada de VAA10, etc.

La secuencia de nucleótidos seleccionada se encuentra ligada funcionalmente a elementos de control que dirigen la transcripción o expresión de la misma en el sujeto *in vivo*. Dichos elementos de control pueden comprender secuencias de control normalmente asociadas al gen seleccionado. En particular, dichos elementos de control pueden incluir el promotor del gen CYP46A1, en particular el promotor del gen CYP46A1 humano (Ohyama Y et al., 2006).

Alternativamente, pueden utilizarse secuencias de control heterólogas. Entre las secuencias de control heterólogas útiles generalmente se incluyen las derivadas de secuencias codificantes de genes de mamífero o víricos. Entre los ejemplos se incluyen de manera no limitativa el promotor de fosfoglicerato cinasa (PKG), el promotor temprano del SV40, el promotor LTR del virus del tumor mamario del ratón, el promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP), un promotor del virus del herpes simple (HSV), un promotor del citomegalovirus (CMV), tal como la región promotora inmediata temprana del CMV (CMVIT), el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), los promotores sintéticos, los promotores híbridos, y similares. Además, también encuentran utilidad en la presente memoria las secuencias derivadas de genes no víricos, tales como el gen murino de la metalotioneína. Dichas secuencias de promotor se encuentran disponibles comercialmente de, por ejemplo, Stratagene (San Diego, CA). En el contexto de la presente invención, resultan de particular utilidad ambos promotores heterólogos y otros elementos de control, tales como promotores específicos del SNC e inducibles, intensificadores y similares.

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

Entre los ejemplos de promotores inducibles se incluyen los elementos sensibles al ADN para la ecdisona, la tetraciclina, y la andaufina de la hipoxia.

El vector de expresión VAA que aloja la molécula de ADN de interés unida mediante RTI del VAA, puede construirse mediante la inserción directa de la secuencia o secuencias seleccionadas en un genoma del VAA del que se han extraído los marcos de lectura abierta ("MLA") principales del VAA. Otras partes del genoma del VAA también pueden eliminarse, con la condición de que permanezca una parte suficiente de las RTI para permitir las funciones de replicación y empaquetamiento. Dichos constructos pueden diseñarse utilizando técnicas bien conocidas. Ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.173.414 y nº 5.139.941; las publicaciones de patente internacional nº WO 92/01070 (publicada el 23 de enero de 1992) y el documento nº WO 93/037 69 (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 extraerse los RTI de VAA del genoma vírico o de un vector VAA que los contiene y fusionado en 5' y 3' de un constructo de ácidos nucleicos seleccionado que se encuentra presente en otro vector, utilizando técnicas de ligación estándares. Se han descrito vectores VAA que contienen RTI en, por ejemplo, la patente US nº 5.139.941. En particular, se describen en dicha patente varios vectores VAA que se encuentran disponibles de la American Type Culture Collection ("ATCC") bajo los números de acceso 53222, 53223, 53224, 53225 y 53226. Además, pueden producirse genes quiméricos sintéticamente para que incluyen secuencias de RTI de VAA dispuestas 5' y 3' respecto a una o más secuencias de ácidos nucleicos seleccionados. Pueden utilizarse codones preferidos para la expresión de la secuencia del gen quimérico en las células del SNC de mamífero. La secuencia quimérica completa se ensambla a partir de oligonucleótidos solapantes preparados mediante métodos estándares. Ver, por ejemplo, Edge, 1981; Nambair et al., 1984; Jay et al., 1984. Con el fin de producir viriones VAAr, se introdujo un vector de expresión VAA en una célula huésped adecuada utilizando técnicas conocidas, tal como mediante transfección. Se conocen generalmente en la técnica varias técnicas de transfección. Ver, por ejemplo, Graham et al., 1973; Sambrook et al., Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, 1989; Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, 1986, y Chu et al., 1981. Entre los métodos de transfección particularmente adecuados se incluyen la coprecipitación de fosfato de calcio (Graham et al., 1973), la microinyección directa en células en cultivo (Capecchi, 1980), la electroporación (Shigekawa et al., 1988), la transferencia génica mediada por liposomas (Mannino et al., 1988), la transducción mediada por lípidos (Felgner et al., 1987) y la administración de ácidos nucleicos utilizando microproyectiles de alta velocidad (Klein et al., 1987).

Por ejemplo, un vector preferido, tal como VAA5-CYPwt utilizado en los ejemplos, posteriormente, comprende, además de una secuencia de ácidos nucleicos codificante de colesterol 24-hidroxilasa, el esqueleto del vector VAA con RTI derivado de VAA-5, el promotor del gen PGK (fosfoglicerato cinasa) de ratón y el elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE).

#### Administración de los vectores víricos

En la presente memoria se proporciona un método para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar un vector vírico tal como se ha definido anteriormente, que comprende un ácido nucleico codificante de colesterol 24-hidroxilasa, y

(b) administrar el vector vírico en el sistema nervioso central (SNC) del sujeto, en el que dicho vector transduce células en el SNC, y en el que la colesterol 24-hidroxilasa es expresada por las células transducidas a un nivel terapéuticamente eficaz.

5 Se proporciona además la utilización de un vector tal como se ha definido anteriormente, que comprende un ácido nucleico codificante de la colesterol 24-hidroxilasa, para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, en el que el vector debe administrarse en el sistema nervioso central (SNC) del sujeto, preferentemente directamente en el cerebro del sujeto o mediante inyección intravenosa o intratecal.

10 Se proporciona además el vector tal como se ha definido anteriormente, que comprende un ácido nucleico codificante de colesterol 24-hidroxilasa, para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, en el que el vector debe administrarse en el sistema nervioso central (SNC) del sujeto, preferentemente directamente en el cerebro del sujeto o mediante inyección intravenosa o intratecal.

15 Los métodos de administración de vectores víricos en neuronas y/o astrocitos incluyen generalmente cualquier método adecuado para vectores de administración en las neuronas y/o astrocitos de manera que se transduzca por lo menos una parte de las células de una población celular conectada sinápticamente seleccionada. El vector puede administrarse en cualesquiera células del sistema nervioso central, células del sistema nervioso periférico, o ambas, Generalmente, el vector se administra en las células del sistema nervioso central, incluyendo, por ejemplo, células de la médula espinal, tallo cerebral (médula, puente troncoencefálico y mesencéfalo), cerebelo, diencefalo (tálamo, hipotálamo), telencéfalo (cuerpo estriado, córtex cerebral o, dentro del córtex, los lóbulos occipital, temporal, parietal o frontal), o combinaciones de los mismos, o preferentemente cualquier subpoblación de los mismos. Entre los sitios preferidos adicionales para la administración se incluyen el núcleo rojo, el cuerpo amigdaloides, el córtex entorrinal y las neuronas del ventral lateral, o en los núcleos anteriores del tálamo.

20 Para administrar el vector específicamente en una región particular y en una población particular de células del SNC, el vector puede administrarse mediante microinyección estereotáctica. Por ejemplo, en el paciente se fija (se atornilla al cráneo) el marco estereotáctico. Se obtienen imágenes del cerebro con el marco estereotáctico (MRI compatible con marcas de referencia) utilizando la MRI de alta resolución. A continuación, las imágenes de MRI se transfieren a un ordenador que ejecuta software estereotáctico. Se utiliza una serie de imágenes coronales, sagitales y axiales para determinar la diana (sitio de inyección de vector VAA) y la trayectoria. El software traduce directamente la trayectoria en coordenadas tridimensionales apropiadas para el marco estereotáctico. Se taladran unos orificios de trépano en la parte superior del sitio de entrada y se sitúa el aparato estereotáctico con la aguja implantada a la profundidad dada. Seguidamente el vector VAA se inyecta en los sitios diana. Debido a que el vector VAA se integra en las células diana en lugar de producir partículas víricas, la posterior extensión del vector es menor y principalmente una función de la difusión pasiva desde el sitio de inyección y evidentemente el transporte trans-sináptico deseado, previamente a la integración. El grado de difusión puede controlarse mediante el ajuste de la proporción de vector a portador líquido.

30 Las vías adicionales de administración pueden comprender además la aplicación local del vector bajo visualización directa, por ejemplo la aplicación cortical superficial u otra aplicación no estereotáctica. El vector puede administrarse generalmente por vía intratecal, para aplicaciones específicas.

40 Las células diana de los vectores de la presente invención son células del sistema nervioso central de un sujeto afectado por la enfermedad de Alzheimer, preferentemente células neurales. Preferentemente, el sujeto es un ser humano, generalmente un adulto.

45 Sin embargo, la invención comprende administrar el vector en modelos biológicos de la enfermedad. En este caso, el modelo biológico puede ser cualquier mamífero en cualquier estadio de desarrollo en el momento de la administración, por ejemplo embrionaria, fetal, infantil, juvenil o adulta, preferentemente adulta. Además, las células diana del SNC pueden ser esencialmente de cualquier origen, especialmente primates no humanos y mamíferos de los órdenes *Rodenta* (ratones, ratas, conejos y hámsters), *Carnívora* (gatos y perros) y *Arteriodactyla* (vacas, cerdos, ovejas, cabras y caballos), así como cualquier otro sistema no humano (por ejemplo el sistema modelo de pez cebra).

50 Preferentemente, el método de la invención comprende la administración intracerebral, por ejemplo directamente en los ventrículos cerebrales.

60 Sin embargo, también pueden adaptarse otros métodos de administración conocidos de acuerdo con la invención. Por ejemplo, para una distribución más generalizada del vector en el SNC, puede inyectarse en el líquido cerebroespinal, 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 en los tejidos (por vía subcutánea o intramuscular) de la parte corporal de interés. En determinadas situaciones, el vector puede administrarse por vía intravascular. Por ejemplo, el vector puede administrarse intraarterialmente (carótida) en situaciones en las que la barrera hematocefálica se encuentra perturbada. Además, para una administración más global, el vector puede

administrarse durante la "apertura" de la barrera hematocefálica que se consigue mediante la infusión de soluciones hipertónicas que incluyen manitol.

5 Los vectores víricos utilizados en la presente memoria pueden formularse en cualquier vehículo adecuado para la administración. Por ejemplo, pueden introducirse en una suspensión, solución o emulsión farmacéuticamente aceptable. Entre los medios adecuados se incluyen la solución salina y las preparaciones liposómicas. Más concretamente, entre los portadores farmacéuticamente aceptables pueden incluirse soluciones estériles de soluciones, suspensiones y emulsiones no acuosas. Son ejemplos de solventes no acuosos, el propilenglicol, el polietilenglicol, aceites vegetales tales como el aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Entre los portadores acuosos se incluyen el agua, las soluciones alcohólicas/acuosas, las emulsiones o suspensiones, incluyendo la solución salina y los medios tamponados. Entre los vehículos intravenosos se incluyen los reabastecedores de líquidos y nutrientes, los reabastecedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares.

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

20 También puede utilizarse un sistema de dispersión coloidal para la administración génica dirigida. Entre los sistemas de dispersión coloidal se incluyen los complejos macromoleculares, las nanocápsulas, las microesferas, las perlas y los sistemas basados en lípidos, incluyendo las emulsiones de aceite en agua, las micelas, las micelas mixtas y los liposomas.

25 Las dosis preferidas y el régimen podrán ser determinados por el médico, y dependen de la edad, sexo y peso del sujeto, y del estadio de la enfermedad. A título de ejemplo, para la administración de colesterol 24-hidroxisilasa utilizando un vector de expresión vírico, cada dosis unitaria de vector que expresa colesterol 24-hidroxisilasa puede comprender entre 2,5 y 25  $\mu$ l de una composición que incluye un vector de expresión vírico en un líquido farmacéuticamente aceptable y que proporciona de 10 10 y hasta 10 15 partículas víricas que expresan colesterol 24-hidroxisilasa por cada ml de composición.

30 Las figuras y ejemplos son ilustrativos de la invención.

### Leyendas de las figuras

35 Las figuras 1A a 1C muestran que la expresión de la forma mutante de PPA en las células neuronales murinas resulta en la producción de péptidos A $\beta$  y la regulación negativa del gen CYP46A1. La figura 1A es un gráfico, acompañado de una transferencia western, que muestra la expresión del péptido A $\beta$ 40 en diversas líneas celulares neuroblastoides. La figura 1B es una transferencia western que muestra que la expresión de CYP46A1 resulta anulada en la línea celular neuroblastoide que expresa la forma mutante de PPA. La figura 1C es un gráfico que muestra la reducción del nivel de 24S-hidroxicolesterol en la línea celular N2A-hPPAsI que expresa la forma mutante de PPA.

40 La figura 2A es un gráfico que muestra que la reexpresión transitoria del gen CYP46A1 en la línea celular neuronal murina que expresa la forma mutante de PPA resulta en una secreción reducida de los péptidos A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42. Las figuras 2B, 2C y 2D son gráficos que muestran que la re-expresión estable del gen CYP46A1 en la línea celular neuronal murina que expresa la forma mutante de PPA resulta en la secreción reducida de los péptidos A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 de una manera dependiente de la dosis génica, con un incremento del 24S-hidroxicolesterol sin cambios en el contenido de colesterol.

50 La figura 3 es un gráfico que muestra que la expresión de CYP46A1 en el cerebro de ratones PPA resulta en un incremento del 24-hidroxicolesterol.

La figura 4 muestra unas placas amiloides en el hipocampo de los ratones PPA. La expresión de CYP46A1 resulta en un número reducido de placas amiloides en los ratones PPA.

55 Las figuras 5A a 5C muestran una comparación entre ratones transgénicos para PPA tratados con VAA-CYPPmt y ratones tratados con VAA-CYPPwt en la etapa de adquisición (longitud de trayectoria y latencia de escape) (figura 5A), velocidad de nado (figura 5B) y ensayo de prueba ("probe trial", figura 5C).

60 Las figuras 6A a 6C muestran que las inyecciones del vector VAA5-CYP46A1 en el córtex cerebral el hipocampo incrementan los niveles de 24S-hidroxicolesterol. (A) Expresión representativa de las formas de tipo salvaje (CYP46A1wt) y mutante (CYP46A1mt) de la proteína CYP46A1 humana en el cerebro de ratones PPA23 de 12 meses de edad tras la inyección del vector VAA. GD: giro dentado, Sbcl: subículo, CA: Cornu Ammonis. Barra de escala=200  $\mu$ m. (B) Marcaje inmunitario de proteína CYP46A1wt etiquetada con HA en neuronas (TNeu, tinción neuronal, panel superior) y colocalización con el marcador Grp78 Bp del retículo endoplasmático (panel inferior). La proteína CYP46mt etiquetada con HA presenta una localización subcelular idéntica (no mostrada). Barra de escala=200  $\mu$ m. (C) Concentraciones de colesterol y de 24S-hidroxicolesterol en el córtex cerebral e hipocampo de

ratones PPA23 de 12 meses de edad en los que se ha inyectado el vector VAA5-CYP46A1wt o el vector VAA5-CYP46A1mt (n=5 ratones en cada grupo) (prueba U de Mann-Whitney, \*\*\*P<0,0005, NS: no significativo).

5 Las figuras 7A a 7G muestran que la administración intracerebral de *CYP46A1* reduce marcadamente la patología amiloide en ratones PPA23. (A) Tinción inmunológica representativa de depósitos amiloides con anticuerpo NT2 en ratones PPA23 de 12 meses de edad en los que se ha inyectado el vector VAA5-CYP46A1wt (panel superior) o el vector VAA5-CYP46A1mt (panel inferior). Barra de escala=200  $\mu$ m. (B) Análisis estereológicos del número y superficie de depósitos amiloides en el córtex e hipocampo de ratones PPA23 en los que se ha inyectado el vector VAA5-CYP46A1wt o el vector VAA5-CYP46A1mt a los 12 meses (3 niveles de sección diferentes en cada ratón, con 3-5 secciones en cada nivel, n=5 ratones en cada grupo). (C) Concentraciones de los péptidos A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 en el córtex e hipocampo cerebrales agrupados de ratones PPA23 de 12 meses de edad en los que se había inyectado el vector VAA5-CYP46A1wt o el vector VAA5-CYP46A1mt. Se cuantificaron los péptidos A $\beta$  utilizando un ELISA tras una etapa de solubilización en guanidina-HCl 5 M (n=5 ratones en cada grupo). (D) Cuantificación de los monómeros, trímeros, hexámeros y dodecámeros de péptidos A $\beta$  mediante transferencia western tras la extracción en los tampones Tris-HCl 10 mM (Tris), Tris-HCl 10 mM/Triton al 2% (Triton) y Tris-HCl 10 mM/SDS al 0,5% (SDS) (n=5 ratones en cada grupo). (E) Transferencia western representativa de PPA de longitud completa (PPA<sub>lc</sub>), BACE1, PSEN1 y los FTC (C83, C99 y dominio intracelular de la PPA (DICP)) en muestras agrupadas de córtex e hipocampo cerebrales procedentes de ratones PPA23 de 12 meses de edad en los que se habían inyectado los vectores VAA5-CYP46A1wt y VAA5-CYP46A1mt (n=5 ratones en cada grupo). (F) Cuantificación de los fragmentos C-terminales de las  $\alpha$ -secretasas y  $\beta$ -secretasas (C83 y C99) en muestras agrupadas de córtex e hipocampo cerebrales procedentes de ratones PPA23 de 12 meses de edad en los que se habían inyectado los vectores VAA5-CYP46A1wt y VAA5-CYP46A1mt. Las cantidades de los fragmentos C-terminales se normalizaron respecto al nivel de actina (n=5 ratones en cada grupo). U.A.=unidad arbitraria. (G) Expresión cuantitativa de los genes de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa murina (*Hmgcr*), proteína 2 de unión a esterol (*Srebp2*), acil-coenzima A: colesterol aciltransferasa 1 (*Acat1*), *Cyp46A1* y *Cyp27A1* en ratones PPA23 en los que se habían inyectado los vectores VAA5-CYP46A1wt o VAA5-CYP46A1mt (n=5 ratones en cada grupo) (prueba U de Mann-Whitney). \*P>0,05; \*\*P<0,005. U.A.=unidades arbitrarias.

30 Las figuras 8A a 8E muestran que se observó una microgliosis reducida y una mejora de los rendimientos cognitivos en los ratones PPA23 tratados con el vector VAA5-CYP46A1wt (A, B). Número de células positivas para Iba-1 en el córtex, hipocampo y cerebelo de ratones PPA23 en los que se había inyectado el vector VAA5-CYP46A1wt o el vector VAA5-CYP46A1mt. Barra de escala=100  $\mu$ m (n=5 ratones en cada grupo; se analizaron 3 niveles de sección de cada ratón) (prueba U de Mann-Whitney). \*P<0,05; NS: no significativo. (C) Longitud de trayectoria. (D) Latencia de escape. (E) Curvas de velocidad de nado durante la etapa de adquisición del procedimiento de laberinto acuático de Morris en ratones PPA23 tratados con el vector VAA5-CYP46A1wt (n=5, símbolos blancos) o con el vector VAA5-CYP46A1mt (de control) (n=4, círculos negros). Los puntos de datos representan resultados de sumas medias ( $\pm$ EEM) de cuatro ensayos diarios. (F) El presente panel representa la proporción del tiempo total en que permanecen en cada cuadrante del laberinto acuático de Morris durante el ensayo de prueba en ratones PPA23 tratados con el vector de control frente a los vectores terapéuticos. Las barras representan el porcentaje medio (EEM) del tiempo total en un cuadrante específico.

45 Las figuras 9A a 9D muestran que la expresión del gen *CYP46A1* reduce la secreción del péptido A $\beta$ <sub>40/42</sub> en células N2a neuroblastoides murinas que expresan PPA humano mutado (PPAs). (A) Secreción de péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> y niveles de ARNm/proteína de PPAsl en las líneas celulares N2a y N2a-hPPAsl (clones 11, 12 y 17). Se detectó una señal débil correspondiente a la proteína PPA murina no mutada en las células N2a. (B) Nivel intracelular de colesterol y 24S-hidroxicolesterol en células N2a y N2a-PPA17. (C) Niveles intracelulares de colesterol y 24S-hidroxicolesterol en dos clones N2a-PPA17 que expresan el gen *CYP46A1* humano (N2a-PPA-CYP-A y -B). (D) Secreción reducida de los péptidos A $\beta$ <sub>40/42</sub> en células N2a-PPA-CYP-A y -B. Las cantidades de los péptidos A $\beta$ <sub>40/42</sub> se normalizaron respecto a 100% en células N2a-PPA17. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado (ANOVA y pruebas t de Student post-hoc). \*P<0,05, \*\*P<0,005, \*\*\*P<0,0005, NS: no significativo.

55 Las figuras 10A a 10C se refieren a la cuantificación de los fragmentos C-terminales en células N2a-PPA17 que expresan el gen de la colesterol-24-hidroxilasa y la medición del colesterol, PPA y PSEN1 en membranas resistentes a detergente (MRD). (A) Transferencia western representativa y cuantificación de los fragmentos C-terminales de las secretasas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (C83, C99 y DICP) en extractos en bruto de células N2a-PPA17, N2a-PPA-CYP-A y N2a-PPA-CYP-B. Columnas negras: N2a-PPA17, columnas grises: N2a-PPA-CYP-A, columnas blancas: N2a-PPA-CYP-B. Las cantidades de fragmentos C-terminales se normalizaron respecto al nivel de actina, U.A.: unidades arbitrarias. (B) Contenido de colesterol en MRD aisladas tras ultracentrifugación en gradiente de yodixanol de células N2a-PPA17, N2a-PPA-CYP-A y N2a-PPA-CYP-B. Tal como se esperaba, el contenido más alto de colesterol se observó en fracciones positivas para flotilina-2 (FLOT-2) de células N2a-PPA17. Columnas negras: N2a-PPA17, columnas grises: N2a-PPA-CYP-A, columnas blancas: N2a-PPA-CYP-B. (C) Análisis de transferencia de proteínas de PPA, BACE1, PSEN1 y FLOT-2 en células N2a-PPA17, N2a-PPA-CYP-A y N2a-PPA-CYP-B. Los porcentajes de PPA y PSEN1 asociados a las fracciones positivas para FLOT-2 n<sup>o</sup> 1 y n<sup>o</sup> 4 se muestran a la derecha. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado (ANOVA y pruebas t de Student post-hoc). \*P<0,05, \*\*P<0,005, NS: no significativo.

## Ejemplos

### Materiales y métodos

#### 5 Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero de feto bovino al 10%, glutamina al 1% y penicilina y estreptomina al 1% (todos de Gibco Laboratories). Se obtuvo ADNc PPA<sup>sl</sup> (que contenía las mutaciones sueca K670NM671L y London V717I) mediante PCR a partir de ratones PPA/PS (L. Pradier, Sanofi-Aventis, Francia) y se clonó bajo un promotor de pCMV en un plásmido pIRES-PURO (Invitrogen). Tras la transfección utilizando el kit de transfección Effectene (Qiagen), se seleccionaron las células N2a-hPPA<sup>sl</sup> resistentes a puomicina mediante el método de dilución limitante y se sometieron a ensayo mediante PCR. A continuación, las células N2a-PPA<sup>sl</sup> se transfectaron establemente con un plásmido pcDNA-pCMV-CYP46A1 que contenía un casete de selección de resistencia a la neomicina. El ADNc CYP46A1 fue generosamente proporcionado por L. Pradier (Sanofi-Aventis, Francia).

#### Determinación del colesterol y el 24S-hidroxicolesterol

La cuantificación del colesterol celular se llevó a cabo utilizando el kit de ensayo de colesterol Amplex Red (Invitrogen). Para la determinación del 24S-hidroxicolesterol, se añadió el estándar interno 24-hidroxicolesterol-2H7 (Medical Isotopes) a homogenizados de cerebro y celulares. Tras la hidrólisis y la extracción, se sulfataron las muestras y se cuantificó el 24S-hidroxicolesterol mediante HPLC-espectrometría de masas en tándem (Quattro II, Micromass, Manchester, Reino Unido) utilizando una curva de calibración con ionización por electropulverización (IEP) en el modo de iones negativos. Se cargaron las muestras en una columna analítica a un caudal de 0,3 ml/min (Alltima C18, 250x2,1 mm, 5 $\mu$  Altech). La fase móvil consistía de amonio al 0,1% en MilliQ (A) y acetonitrilo:H<sub>2</sub>O, 9:1, v/v (B). El gradiente siguiente migró durante un tiempo total de 25 min.: 0 a 10 min. de 85% de A a 50% de A, 10 a 20 min. 100% de A, 20 a 20,1 min. hasta 85% de A, 20,1 a 25 min. 85% de A. Los parámetros de la espectrometría de masas fueron los siguientes: nitrógeno como gas nebulizante; argón como gas de colisión (2,5x10<sup>-3</sup> mBar), energía de colisión: 20 eV, voltaje capilar: 3 kV, temperatura de la fuente: 80°C, voltaje del cono: 25V. Se utilizaron las transiciones siguientes para detectar el 24S-hidroxicolesterol: m/z 280,1→m/z 97 y m/z 283,6→m/z 97 para el estándar interno.

#### Determinación de los niveles de A $\beta$ mediante ELISA

35 Se midieron *in vitro* los péptidos A $\beta$  secretados en el medio 48 horas después de sembrar en placa las células. El córtex y el hipocampo diseccionados *in vivo* en primer lugar se homogeneizaron en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 6,8), se ajustó la concentración a 6 mg de proteína/ml y se extrajeron 50  $\mu$ l en guanidina-HCl 5 M. Se cuantificaron los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> utilizando kits ELISA disponibles comercialmente (Biosource e Innogenetics).

#### 40 Transferencia western

Se llevaron a cabo experimentos de transferencia western utilizando un protocolo estándar (electroforesis en PAGE-SDS al 10%), excepto los análisis de los oligómeros A $\beta$ , los cuales se llevaron a cabo utilizando geles Bis-Tris al 12% CRITERION premoledados (Bio-Rad) en tampón de migración MES NuPAGE (Invitrogen). Todas las muestras se extrajeron en tampón de lisis que contenía cóctel inhibidor de proteasas (Complete, Roche). Los anticuerpos primarios (Tabla 1) se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa específicos de especie. Se utilizó el método de quimioluminiscencia mejorada (GE Healthcare) para el revelado. La cuantificación de la señal se llevó a cabo utilizando análisis densitométrico de los autorradiogramas escaneados con el software ImageJ 1.38x NIH.

50

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios

Antígeno detectado	Anticuerpo	Dilución	Proveedor
Placas amiloides	Monoclonal de ratón, clon 4G8	1/200	Chemicon
	Suero de conejo NT12	1/1000	Staufenbiel M et al., Novartis
Oligómeros A $\beta$	Monoclonal de ratón, clon 6E10	1/1000	Sigma-Aldrich
	PPA <sup>fl</sup>	Monoclonal de ratón, clon 22C11	1/500
PPA CTF	Policlonal de conejo	1/1000	Calbiochem
BACE-1	Policlonal de conejo EE17	1/500	Sigma-Aldrich
Presenilina	Policlonal de conejo	1/100	Abcam
Flotillina-2	Monoclonal de ratón, clon A-3	1/200	Santa-Cruz biotechnology
Hemaglutinina	Monoclonal de ratón, clon 16B12	1/200	Covance
	Policlonal de conejo Y-11	1/100	Santa-Cruz biotechnology
GRP78 Bip	Policlonal de conejo	1/500	Abcam
NeuN, neurona	Monoclonal de ratón NeuN biotina	1/200	Chemicon

Iba1, microglia	Policlonal de conejo IBA-1	1/200	Wako
GFAP, astrocito	Policlonal de conejo GFAP	1/500	SIGMA-ALDRICH
$\beta$ -actina	Policlonal de conejo	1/1000	Abcam

Análisis de oligómeros A $\beta$  solubles

5 En primer lugar se homogeneizó el córtex e hipocampo diseccionados en un homogeneizador Dounce en Tris-HCl 10 mM, pH 6,8, complementado con cóctel inhibidor de proteasas (Complete, Roche). Se ajustó la concentración de proteínas a 6 mg/ml para todas las muestras. Se llevó a cabo una primera etapa de ultracentrifugación (100.000g a 4°C) para recoger el sobrenadante Tris y el sedimento se disolvió en un tampón de Tris-HCl 10 mM, Triton al 2% (pH 6,8). Otra etapa de ultracentrifugación (100.000g, 4°C) permitió eliminar el sobrenadante de Triton y se resuspendió el sedimento en un tampón de Tris-HCl 10 mM, SDS al 0,5% (pH 6,8). Tras una última etapa de ultracentrifugación (100.000g a temperatura ambiente), se recogió el sobrenadante de SDS y el sedimento se disolvió directamente en solución Blue Laemmli.

Aislamiento de membranas resistentes a detergentes (MRD)

15 Se aislaron balsas lipídicas tal como se ha descrito previamente (Vetrivel et al., 2004). En primer lugar se lisó un sedimento de diez millones de células en tampón MBS (MES 25 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 6,5) que contenía Triton X-100 al 1% y cóctel inhibidor de proteasas (Complete, Roche).

20 Todas las etapas se llevaron a cabo a 4°C. Se ajustó la concentración de proteínas a mg/ml y se introdujeron los lisados celulares en yodixanol al 40% (gradiente de densidad OptiPrep, Sigma) diluido en un tampón apropiado (sacarosa 0,25 M, EDTA 6 mM, tricina 120 mM, pH 7,6). Se superpusieron dos capas de tampón de yodixanol al 30% seguido de al 20% en la parte superior del tubo de ultracentrífuga. Tras la ultracentrifugación a 39.000 rpm durante 20 h a 4°C, se recogieron fracciones (de 1 ml) y se analizaron mediante transferencia western siguiendo el protocolo estándar. SE utilizó la detección de flotilina-2 para identificar las fracciones de MRD.

RT-PCR cuantitativa

30 Se llevó a cabo la extracción del ARN mensajero de células o tejidos utilizando el kit RNable (Eurobio Laboratories). Se llevó a cabo la RT-PCR cuantitativa en tiempo real en el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems) tal como se ha descrito (Bieche et al., 2004).

35 Como control de ARN endógeno, los presentes inventores cuantificaron los transcritos del gen de proteína de unión a caja TATA (PUT). Se normalizó la cantidad de transcrito diana ( $N_{diana}$ ) basándose en el contenido de PUT en cada muestra y posteriormente se normalizó respecto a un nivel basal de ARNm utilizando la ecuación:  $N_{diana} = 2^{\Delta Ct_{muestra}}$ , en la que  $\Delta Ct$  es el valor Ct del gen diana menos el valor Ct del gen *PUT*. Se listan los cebadores en la Tabla 2.

Tabla 2. Lista de cebadores utilizados para la RT-PCR en tiempo real

Gen	Cebador	Secuencia
<i>Tbp</i>	For	tgcacaggagccaagagtga (SEC ID nº 3)
	Rev	cacatcacagctcccacca (SEC ID nº 4)
<i>Cyp46a1</i>	For	ggctaagaagtatggtcctgtgtaaga (SEC ID nº 5)
	Rev	ggtggacatcaggaactcttgact (SEC ID nº 6)
<i>CYP46A1</i>	For	agaagtatggacctgttgccg (SEC ID nº 7)
	Rev	tggttgacatcaggaactcttaacc (SEC ID nº 8)
<i>PPA</i>	For	cacaccgtcgccaaagagaca (SEC ID nº 9)
	Rev	ggcagcaacatgccgtagtca (SEC ID nº 10)
<i>Bace1</i>	For	agccgtcatcatggaaggttctat (SEC ID nº 11)
	Rev	gaactcatcgtgcacatggcaa (SEC ID nº 12)
<i>Adam9</i>	For	ggcgaccagacttgaacagac (SEC ID nº 13)
	Rev	tggatgacgtaagagatctgctgtg (SEC ID nº 14)
<i>Adam10</i>	For	cggggctgggaggtcagtat (SEC ID nº 15)
	Rev	gcacgctggtgttttggtgta (SEC ID nº 16)
<i>Adam17</i>	For	tggcaaaactatttcacaaaggaag (SEC ID nº 17)
	Rev	agggtcatgttctgctccaaaatta (SEC ID nº 18)
<i>Psen1</i>	For	gagatacctgcaccttgcctact (SEC ID nº 19)
	Rev	gttctggctgtcattctggct (SEC ID nº 20)
<i>Hmgcr</i>	For	ccccattcactctgacgctct (SEC ID nº 21)
	Rev	gctggcggagcctgacat (SEC ID nº 22)
<i>Abca1</i>	For	caaccctgctccgttatccaa (SEC ID nº 23)
	Rev	gagaacaggcgagacacgatggac (SEC ID nº 24)

<i>Abca2</i>	For	caatatgccactccacggtcac (SEC ID n° 25)
	Rev	ggtcgcactgggtcgaacaa (SEC ID N° 26)
<i>Abcg1</i>	For	tctccaatctcgtgccgtatctga (SEC ID N° 27)
	Rev	ctgatgccacttccatgacaaagtct (SEC ID N° 28)
<i>Abcg4</i>	For	tcgccgagagctgattggcat (SEC ID N° 29)
	Rev	cccttcacccccgactccctgta (SEC ID N° 30)
<i>ApoE</i>	For	gtcacattgctgacaggatgccta (SEC ID N° 31)
	Rev	gggttggtgctttgccactc (SEC ID N° 32)

#### Diseño de plásmido del VAA y producción de vectores

5 Los plásmidos pcADN de CYP46A1 de tipo salvaje y mutante fueron generosamente proporcionados por L. Pradier (Sanofi-Aventis, Francia). Se clonaron tres fragmentos generados mediante PCR que contenían las secuencias completas del promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK) murina de 0,6 kb, el ADNc de *CYP46A1* de 1,5 kb y el elemento regulador de 0,6 kb del elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE), generando los plásmidos pVAA5/PGK-CYP46A1h-WPRE. La funcionalidad de cada plásmido del VAA se comprobó mediante transfección transitoria de células 293T. Se utilizaron estos plásmidos para generar los vectores VAA5/PGK-HACYP46A1 (denominados VAA5-CYP46A1wt o VAA5-CYPwt) y VAA5/PGK-HACYP46A1mut (denominados VAA5-CYP46A1mt o VAA5-CYPmt). Se generaron reservas de vector VAA mediante la transfección transitoria de células 293T y se purificaron utilizando un gradiente de ultracentrifugación de CsCl (Sevin et al., 2006). Los títulos eran de entre  $4 \times 10^{12}$  y  $9 \times 10^{12}$  vg/ml.

#### Línea de ratón transgénico e inyecciones intracerebrales de vectores VAA

20 La línea de ratón transgénico PPA23 (Thy1-hPPAswe) (Sturchler-Pierrat et al., 1997) fue generosamente proporcionada por Matthias Staufienbiel (Novartis Pharma). Estos ratones sobreexpresan el gen *PPA751* humano mutado que contiene la doble mutación sueca (K670N-M671L) bajo el promotor específico neuronal Thy-1. Los animales se alojaron en unas instalaciones animales libres de patógenos. Estos experimentos fueron aprobados por el comité veterinario del INSERM y se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de cuidado y utilización de animales de laboratorio (NIH publicación n° 85-24) y la European Communities Council Directive (86/609/EEC). Además, el protocolo de cribado comportamental fue aprobado por el Animal Ethics Committee de la Universidad of Antwerp. Los ratones PPA23 se anestesiaron mediante la inyección intraperitoneal de quetamina/xilazina (0,1/0,05 mg/g de peso corporal) y se situaron en un marco estereotáctico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Se llevaron a cabo inyecciones de vectores en el córtex cerebral (dos depósitos) y en el hipocampo (un depósito) de cada hemisferio con 2  $\mu$ l de preparación vírica ( $12 \times 10^8$  vg) utilizando una micropipeta roma de calibre 30 incorporada en una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l (Reno, NV, USA) a un caudal de 0,2  $\mu$ l/min. Las coordenadas estereotácticas de los sitios de inyección del bregma eran 1) AP: -0,3, ML:  $\pm 2$ , DV: -1,5 mm; 2) AP: -2, ML:  $\pm 1,2$ , DV: -1,2 mm, y AP: -2, ML:  $\pm 1,2$ , DV: -2 mm.

Los ratones se sacrificaron a los 6 o 12 meses. Se utilizó un hemisferio cerebral para la histoquímica. El hipocampo y córtex cerebral del otro hemisferio se diseccionaron para la bioquímica, expresión génica y análisis de proteínas utilizando la transferencia western.

#### Análisis del comportamiento

40 El laboratorio acuático de Morris (LAM) consistía de una piscina circular (diámetro: 150 cm, altura: 30 cm) llena de agua opacificada (pintura natural no tóxica), mantenida a 25°C y circundada de señales visuales invariables en el exterior del laboratorio. Se introdujo una plataforma de vidrio acrílico redonda (diámetro: 15 cm) 1 cm bajo la superficie del agua en una posición fija en uno de los cuadrantes. La etapa de adquisición comprendió 8 bloques de prueba de 4 pruebas diarias iniciadas semi-aleatoriamente desde cuatro posiciones diferentes en el borde del laberinto con intervalos entre pruebas de 15 in. En el caso de que un ratón no pudiese alcanzar la plataforma en 120 s, se colocaba sobre la plataforma durante 15 s antes de devolverlo a su jaula de origen. Se registraron las trayectorias de nado utilizando un sistema de seguimiento en vídeo computerizado (Ethovision, Noldus, Países Bajos), registrando la trayectoria del camino, la latencia de escape y la velocidad de nado. Cuatro días después de finalizar la etapa de adquisición, se llevó a cabo un ensayo de prueba. Se retiró la plataforma del laberinto y se dejó que cada ratón nadase libremente durante 100 s. La exactitud espacial se expresa como porcentaje del tiempo pasado en cada cuadrante del LAM y el número de cruces a través de la posición diana, es decir, la localización específica de la plataforma durante la etapa de adquisición.

55 Estadísticos para el análisis del comportamiento: el análisis de la varianza de dos factores con medidas repetidas (RM-ANOVA), con tratamiento y bloque de prueba como posibles fuentes de variación, en combinación con el procedimiento post-hoc de HSD de Tukey, sirvió para evaluar la significancia de las diferencias entre puntuaciones medias durante la etapa de adquisición. Se sondeó la agudeza espacial durante el ensayo de prueba utilizando un ANOVA de dos factores con prueba HST de Tukey. Se utilizaron pruebas t de Student de dos factores (prueba t) para evaluar las diferencias en el número de entradas a través de la posición diana anterior y la longitud de

trayectoria durante el ensayo de prueba. Todos los cálculos estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software Sigmapstat (SPSS Inc., Erkrath, Alemania) con el nivel de probabilidad fijado en 95%.

#### Inmunohistoquímica y análisis de microscopía

5 Los animales anestesiados se infundieron transcárdicamente con PBS. Para los análisis bioquímicos, se diseccionó el córtex izquierdo y el hipocampo, se pesaron y se congelaron en nitrógeno. El hemiserebro derecho se fijó posteriormente en paraformaldehído al 4% en PBS durante 24 horas y se incluyó en parafina. Las secciones de cinco micrómetros secuencialmente (a) se desparafinaron en xileno, (b) se rehidrataron en etanol, (c) se permeabilizaron en saponina en PBS al 0,05%, (d) se bloquearon en saponina en PBS al 0,01% y suero de cabra normal al 5%, y (d) se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario. Para el marcaje de las placas amiloides con el anticuerpo monoclonal de ratón 4G8, se llevó a cabo un tratamiento con ácido fórmico al 80% durante 30 minutos. Resultó necesaria una etapa de recuperación del antígeno en tampón de ácido cítrico (0,1 M)/citrato sódico (0,1 M) para varios anticuerpos. Se aplicaron anticuerpos secundarios durante una hora a temperatura ambiente. Se listan todos los anticuerpos en la tabla complementaria 1. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Nikon (Eclipse 800) y una cámara QIMAGING digital (CCD QICAM enfriada más filtro RGB pixel 4,65x4,65  $\mu$ m). Las secciones de control y de ensayo se procesaron el mismo día y bajo las mismas condiciones.

20 Se llevaron a cabo análisis estereológicos en 3 niveles de sección en cada ratón, con 3 a 5 secciones contiguas en cada nivel. Para determinar la superficie y número de depósitos amiloides en la región anatómica de interés, se configuró el software analizador de imágenes Histolab® (Microvision Instruments, París, Francia) para detectar automáticamente de modo ciego los depósitos marcados con DAB. Las placas en las que la intensidad no era suficientemente superior al fondo para la fijación correcta de umbrales no fueron consideradas. La configuración de parámetros no se modificó en ninguno de los análisis. Cada objeto positivo para DAB se consideró que era una placa amiloide y el analizador de imágenes midió directamente su superficie o número. Para cada sección, seguidamente se informó de la cuantificación de depósitos amiloides respecto a la superficie de córtex y de hipocampo de la sección respectiva. El recuento de células positivas para GFAP e Iba-1 se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento.

#### Análisis estadísticos

30 Todos los procedimientos estadísticos, excepto los análisis del comportamiento, se llevaron a cabo utilizando el software StatView 5.0 y JMP 7.0 para Macintosh. Los datos *in vitro* se analizaron mediante ANOVA seguido de comparaciones múltiples post-hoc con pruebas t de Student en el caso apropiado. Debido a que los grupos de animales eran pequeños, se analizaron los datos de los experimentos *in vivo* utilizando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. El error de los valores medios en el texto y en las columnas de los gráficos representa el error estándar de la media (EEM).

#### Resultados

40 La expresión del gen *CYP46A1* presenta una marcada regulación negativa en una línea celular neuronal murina que produce los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>.

45 Los inventores diseñaron líneas celulares N2A neuroblastoides murinas (a continuación denominadas N2A-hPPAsI) que expresan constitutivamente el gen PPA mutado humano que aloja las mutaciones sueca y London y secreta los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> (figura 1A).

50 La línea celular N2A-hPPAsI respondió a diferentes tratamientos hipocolesterolémicos (metil- $\beta$ -ciclodextrina, medio sérico deficiente en lipoproteínas), resultando en una reducción de la secreción de los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>.

55 Tal como se observó en la RT-PCR, la expresión del gen *CYP46A1* murino se redujo marcadamente en N2A-hPPAsI (figura 1B), mientras que la expresión de los otros genes que participan en el metabolismo del colesterol permanecieron sin cambios. Estos resultados fueron confirmados por los estudios de RT-PCR cuantitativa.

De acuerdo con la regulación negativa del gen *CYP46A1*, el nivel de 24-hidroxicolesterol se encontraba marcadamente reducido en la línea celular N2A-hPPAsI, mientras que el contenido intracelular de colesterol no experimentó cambios (figura 1C).

#### Reexpresión del gen *CYP46A1* en la línea celular neuronal murina que expresa la forma mutante de PPA resulta en una secreción reducida de los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> de una manera dependiente de la dosis génica

60 La transfección de la línea celular N2A-hPPAsI con un plásmido pcADN codificante del ADNc *CYP46A1* humano resultó en una secreción reducida de los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> (figura 2A). A continuación, los inventores diseñaron tres líneas celulares N2A-hPPAsI que expresan constitutivamente el gen *CYP46A1* humano (a continuación denominado N2A-hPPAsI-CYP-A, B y C). La expresión forzada del gen *CYP46A1* resultó en un incremento de los niveles intracelulares de 24-hidroxicolesterol sin cambios en el colesterol intracelular (figura 2C y D).

La expresión del gen *CYP46A1* se asoció a una secreción reducida de los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>, que se correlacionaba con los niveles de expresión del gen *CYP46A1* (figura 2B).

5 El corte inicial de PPA que genera fragmentos C-terminales (FTC) y péptidos A $\beta$  es producido por la aspartil-  
proteasa  $\beta$ -secretada, también conocida como enzima de corte PPA en el sitio  $\beta$  (BACE). Para determinar si la  
secreción reducida de los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> en la línea celular N2A-hPPAsl-CYP se encontraba asociada a la  
10 modificación de la agrupación de BACE en las balsas lipídicas, los inventores evaluaron el nivel de proteína BACE1  
en fracciones de membranas resistentes a detergentes (MRD) que se encuentran enriquecidas en colesterol. No se  
observaron cambios en la cantidad de BACE en las fracciones de MRD en las que se encontraba presente proteína  
anti-flotilina.

La administración de VAA-CYP46A1 reduce la patología de tipo Alzheimer en ratones PPA transgénicos

15 El ratón PPA23 (Thy1-hPPA751sl denominado en adelante ratón PPA) desarrolla a los 6 meses placas que son  
similares a las placas seniles en la EA humana (Sturchler-Pierrat et al., 2000) y desarrollan desde los 3 meses de  
edad declive cognitivo que precede a la deposición amiloide (Van Dam et al., 2003).

20 Las formas de tipo salvaje (wt) y mutada (mt) del ADNc CYP46 humano etiquetado con epítipo HA se clonaron en  
plásmidos de virus adenoasociado, generando los vectores VAA5/PGK-hCYP46A1 (denominado VAA5-CYPwt [tipo  
salvaje]) y VAA5/PGK-hCYP46A1mut (denominado VAA5-CYPmt [formas mutantes]) (6x10<sup>12</sup> vp/ml). La forma  
mutada de *CYP46* humana contiene una mutación sin sentido que destruye su estructura de heme, conduciendo a la  
ausencia completa de la actividad de 24-hidroxilasa. La funcionalidad de los plásmidos del VAA se comprobó  
25 mediante transfección transitoria de células 293T. Se inyectaron los vectores VAA5-CYPwt y VAA5-CYPmt en el  
hipocampo y córtex cerebral de ratones PPA de un mes y medio de edad, los cuales todavía no muestran déficits  
cognitivos y placas amiloides.

30 La inmunohistoquímica con un anticuerpo contra HA demostró que la expresión neuronal de CYP-wt y CYP-mt en el  
neocórtex y el hipocampo de ratones tratados de 6 meses de edad. En el hipocampo, la expresión más alta de  
CYPwt o CYPmt se detectó en todo el giro dentado, CA2 y CA3. Las proteínas CYP-wt y CYP-mt se expresaron  
mayoritariamente en las neuronas positivas para NeuN y se colocalizaban, tal como se esperaba, con la proteína  
GRP 78 BiP, que se expresa en el retículo endoplasmático.

35 En comparación con los ratones PPA23 no tratados o los ratones PPA23 tratados con el vector VAA5-CYPmt, los  
ratones PPA23 tratados con el vector VAA5-CYPwt mostraron unos niveles incrementados de 24-hidroxicolesterol  
en el hipocampo y el neocórtex (figura 3).

40 Con el fin de investigar los efectos de la sobreexpresión de CYP46A1 con el vector VAA5-CYPwt sobre el  
procesamiento de PPA y la patogénesis amiloide en los ratones PPA23 transgénicos, los inventores utilizaron el  
análisis inmunohistoquímico para A $\beta$  (figuras. 4A y 4B). En comparación con los ratones transgénicos para PPA  
tratados con VAA-CYPmt, los ratones de 6 meses de edad tratados con VAA-CYPwt mostraron una reducción  
significativa (reducción de 55%, n=6 en cada grupo, p<0,05) del porcentaje de área ocupada por placas A $\beta$ -  
inmunorreactivas en el hipocampo y el neocórtex (sitios de inyección) pero no en otras regiones cerebrales, tales  
45 como el tálamo, en donde no se administraron vectores VAA.

50 Con el fin de determinar si los efectos neuroprotectores de VAA-CYPwt estaban asociados con la mejora de los  
déficits cognitivos y del rendimiento en ratones transgénicos para PPA, se sometieron a ensayo los animales en el  
ensayo de laberinto acuático de Morris de plataforma oculta para explorar el aprendizaje espacial y los déficits de  
memoria, un resultado que recuerda las perturbaciones observadas en los pacientes de EA. En comparación con los  
ratones transgénicos para PPA tratados con VAA-CYPmt, los ratones tratados con VAA-CYPwt mostraron una  
mejora significativa en la etapa de adquisición (longitud de trayectoria y latencia de escape (figura 5A), velocidad de  
nado (figura 5B) y ensayo de prueba (figura 5C).

Deposición amiloide reducida y producción de péptidos A $\beta$  en ratones PPA23 en los que se había inyectado vector VAA5-CYP46A1

60 Los vectores VAA que expresaban ADNc *CYP46A1* de tipo salvaje (VAA5-CYP46A1wt, n=11 hembras) o mutado  
(VAA5-CYP46A1mt, n=11 hembras) etiquetado con epítipo hemaglutinina (HA) se inyectaron en el hipocampo,  
córtex frontal y parietal de ambos hemisferios de ratones PPA23 de 2 meses de edad. La proteína CYP46A1  
mutante contiene una mutación que resulta en la ausencia total de actividad de colesterol 24-hidroxilasa.

65 Las proteínas CYP46A1 de tipo salvaje (wt) o mutantes (mt) en ratones de 6 meses (n=12) y de 12 meses (n=10)  
mostraron una expresión comparable en las neuronas del córtex cerebral y del hipocampo (figura 6A), en donde se  
colocalizaban con el marcador GRP78 Bip en el retículo endoplasmático, al igual que la colesterol-24-hidroxilasa  
endógena (Ramírez et al., 2008) (figura 6B). Con la RT-PCR cuantitativa, se encontró que el nivel de ARNm de  
CYP46A1 era ocho veces superior que el nivel de *CYP46A1* de ratón en ratones PPA23 no inyectados. El nivel de

24S-hidroxicolesterol se incrementó en dos veces en el córtex cerebral e hipocampo diseccionados de ratones en los que se había inyectado el vector VAA5-CYP46A1wt, mientras que el colesterol total no experimentó cambios (figura 6C).

5 La expresión del gen CYP46A1 estaba asociada a una reducción marcada del número de placas amiloides (63% a 68%) y del porcentaje de área ocupada por depósitos amiloides (71%) en el hipocampo y córtex cerebral (figura 7A, B). La mayoría de los depósitos amiloides remanentes se concentraron en regiones en las que muy pocas o ninguna célula expresaba la proteína CYP46A1wt. Los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> evaluados mediante ELISA se redujeron en 50 $\pm$ 3% y 57 $\pm$ 4%, respectivamente, en muestras agrupadas de córtex cerebral e hipocampo (figura 7C). La cantidad de oligómeros A $\beta$  hexaméricos y dodecaméricos se encontraba ligeramente reducida sin alcanzar la significancia estadística. En contraste, los oligómeros A $\beta$  triméricos se redujeron en 30% a 50% (P<0,05, figura 7D). El análisis de transferencia western mostró que la cantidad de producto C83 de corte de la  $\alpha$ -secretasa permanecía sin cambios, mientras que el producto C99 de corte de la  $\beta$ -secretasa se incrementaba en 40% en ratones en los que se había inyectado VAA5-CYP46A1wt (figura 7E, F). Los fragmentos DICP generados por corte y eran prácticamente indetectables (figura 7E), sugiriendo que la expresión de CYP46A1 inducía una reducción del corte de FTC por la  $\gamma$ -secretasa *in vivo*.

La expresión de Adam9, 10, 17, Bace1 y Psen1 y, más inesperadamente, de los genes diana LXR (Abca1, Abca2, Abcg1, Abcg4, Abcg5 y ApoE) no resultó modificada. La expresión de los genes de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (*Hmgcr*) y de la proteína 2 de unión a esterol (*Srebp2*) se incrementó en 1,6 veces (figura 7G) sin cambios en la expresión de los genes de la acil-coenzima A:colesterol aciltransferasa 1 (*Acat1*), del receptor de lipoproteína de baja densidad (*Ldlr*), de la proteína 1 relacionada con lipoproteínas de baja densidad (*Lrp1*), de lecitina:colesterol aciltransferasa (*Lcat*) y de C1 de la enfermedad de Niemann-Pick (*Npc1*).

25 La expresión de CYP46A1 reduce la microgliosis y mejora los déficits cognitivos antes de la aparición de depósitos amiloides

Los depósitos amiloides inducen una respuesta microglial y la astrocitosis en ratones PPA23 (Bornemann et al., 2001). Se redujo el número de células microgliales positivas para Iba-1 en 41 $\pm$ 7% y 46 $\pm$ 4%, respectivamente, en el córtex cerebral y el hipocampo de ratones en los que se había inyectado vector VAA5-CYP46A1wt (figura 8A, B). De manera similar, se redujo el número de células positivas para GFAP en prácticamente el 50% en ratones PPA23 en los que se había inyectado el vector VAA5-CYP46A1wt.

Los ratones PPA23 desarrollan déficits cognitivos a los 3 meses de edad, mientras que los depósitos amiloides sólo se detectan en el cerebro de los mismos a los 6 meses (Van Dam, 2003). Con el fin de evaluar los efectos de la inyección del vector VAA5-CYP46A1wt sobre las funciones cognitivas, los ratones fueron sometidos a ensayo a los 6 meses utilizando el procedimiento del laberinto acuático de Morris (LAM). Todos los ratones que habían recibido inyecciones de vector VAA5-CYP46A1wt o VAA5-CYP46A1mt mostraron rendimientos mejorados durante la etapa de adquisición (P<0,001) (figura 8C, D). Sin embargo, los inventores observaron un efecto significativo de la inyección de VAA5-CYP46A1wt sobre el parámetro longitud de trayectoria (P=0,054, RM-ANOVA de dos factores) sin ninguna interacción significativa entre la inyección del vector y el bloque de ensayo (P=0,583) (figura 8C). La ausencia de efectos de tratamiento sobre la velocidad de nado (figura 8E) indica que la mejora de la longitud de trayectoria no se debe a un mejor rendimiento motor. Los inventores no observaron ningún efecto significativo de la inyección de vector sobre la latencia de escape (figura 8D). Durante el ensayo de prueba, los ratones en los que se había inyectado vector VAA5-CYP46A1wt no permanecieron más tiempo en el cuadrante diana (figura 8F) pero cruzaron la posición anterior de la plataforma más frecuentemente (1,4 $\pm$ 0,4) que los ratones PPA23 con tratamiento simulado (0 $\pm$ 0, P=0,018), indicando que su memoria espacial había mejorado.

50 La expresión de CYP46A1 reduce la cantidad de colesterol y presenilina-1 en membranas resistentes a detergentes aisladas a partir de células neuroblastoides murinas que expresan PPA humano mutado

Con el fin de obtener más información sobre los mecanismos por los que la sobreexpresión de CYP46A1 reduce los fragmentos DICP generados por el corte y *in vivo*, los inventores construyeron líneas celulares N2a neuroblastoides murinas para sobreexpresar constitutivamente el gen PPA humano que incluye las mutaciones sueca y London (PPAsl). Los inventores seleccionaron el clon 17 (en lo sucesivo denominado en la presente memoria N2a-PPA17), que se encontró que secretaba los niveles más altos de péptidos A $\beta$ <sub>40/42</sub> (figura 9A) y demostraron que dicho clon presentaba una expresión reducida del gen CYP46A1 murino y una reducción de 43% del contenido de 24S-hidroxicolesterol (figura 9B).

60 A continuación, los inventores restauraron la expresión de la colesterol-24-hidroxilasa mediante la construcción de células N2a-PPA17 para sobreexpresar el gen CYP46A1 humano. Obtuvieron dos líneas celulares, denominadas N2a-PPA-CYP-A y -B, que mostraron un incremento del 24S-hidroxicolesterol sin cambios significativos en el nivel de colesterol total (figura 9C). En estas células, se observó una reducción de la secreción de los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>, que era inversamente proporcional al contenido incrementado de 24S-hidroxicolesterol (r<sup>2</sup>=0,91) (figura 9D). Los péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> eran prácticamente indetectables en las células que expresaban el nivel más alto de gen CYP46A1. Este efecto no se debía a modificaciones de la expresión del transgén PPAsl ni de Adam9, Adam10,

*Adam17, Bace1 y Presenilin1 (Psen1)* murinos que participan en el procesamiento de PPA, ni del gen de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A reductasa (*Hmgcr*), el enzima limitante de la velocidad de la síntesis del colesterol, y tampoco de los genes del casete transportador A1 de unión a ATP (*Abca1*) y de la apolipoproteína E (ApoE).

5 Con el fin de caracterizar el procesamiento de PPA por las secretasas en las células N2a-PPA-CYP, los inventores cuantificaron los fragmentos C-terminales (FTC) de la PPA mediante transferencia western en extractos celulares brutos. El contenido del producto C83 de corte de la  $\alpha$ -secretasa no resultó modificado en las células N2a-PPA-CYP-A y N2a-PPA-CYP-B. El péptido C99 producto del corte de la  $\beta$ -secretasa se incrementó en 37% en las células N2a-PPA-CYP-A y se redujo en 34% en las células N2a-PPA-CYP-B. El producto DICP de corte de la  $\gamma$ -secretasa se redujo en 50% a 65% tanto en células N2a-PPA-CYP-A como células N2a-PPA-CYP-B (figura 10A). La reducción concomitante de DICP y el incremento de  $\beta$ -FTC en las células N2a-PPA-CYP-A son consistentes con el hecho de que la sobreexpresión de CYP46A1 actúa principalmente al nivel del corte de FTC por la  $\gamma$ -secretasa. Al nivel más alto de expresión, CYP46A1 aparentemente también reduce el  $\beta$ -FTC sin modificar la cantidad de BACE1 en las MRD, lo que sugiere un efecto adicional sobre la actividad de la  $\beta$ -secretasa.

15 Existen cada vez más pruebas de que las balsas lipídicas, definidas bioquímicamente como membranas resistentes a detergentes (MRD), son los microdominios de membrana principales en los que se produce el procesamiento amiloidogénico de la PPA (Cordy et al., 2006). Las balsas lipídicas se encuentran enriquecidas en colesterol y el complejo de  $\gamma$ -secretasa co-reside con la PPA y la  $\beta$ -secretasa en estos microdominios (Li et al., 2000; Wahrle et al., 2002; Vetrivel et al., 2004). Los cambios en el contenido de colesterol en las balsas lipídicas puede influir marcadamente sobre la producción de A $\beta$  (Ehehalt et al., 2003; Won et al., 2008).

20 En las células N2a-PPA17 que sobreexpresan el gen *CYP46A1*, la cantidad de colesterol se redujo en 28% y 45% en las dos fracciones de MRD positivas para flotilina-2 de células N2a-PPA-CYP-A y N2a-PPA-CYP-B, respectivamente (figura 10B). La PPA reside tanto en dominios de balsa como en dominios no de balsa y el porcentaje de PPA localizado en las dos fracciones de MRD positivas para flotilina-2 de las células N2a-PPA17 representa el 40% de la cantidad total de PPA (figura 10C). En las mismas fracciones enriquecidas en colesterol de las células N2a-PPA-CYP-A y N2a-PPA-CYP-B, la cantidad de BACE1 no resultó modificada pero la PPA se redujo en 32% y 45%, mientras que PSEN1, un componente de la  $\gamma$ -secretasa, se redujo en 25% y 67%, respectivamente (figura 10C). Conjuntamente, estos resultados sugieren que la reducción del corte de FTC por la  $\gamma$ -secretasa en células N2a-PPA17 que sobreexpresan *CYP46A1* resulta de una reducción del colesterol en las MRD que se asociaba a un menor reclutamiento o a una estabilización de la PPA y de PSEN1 en los mismos microdominios.

## Referencias

- 35 Berns, KI "Parvoviridae and their Replication" in Fundamental Virology, 2nd Edition, (B. N. Fields and D. M. Knipe, eds.  
 Bieche, I. et al. Clin Cancer Res, 10, 6789-95 (2004).  
 Bornemann, K.D., et al. Am J Pathol, 158, 63-73 (2001).  
 40 Brown, J., 3rd et al. J Biol Chem 279, 34674-81 (2004).  
 Capecchi, M. R. , Cell, 22: 479-488, (1980).  
 Carter, B. J. , Current Opinion in Biotechnology, 3: 533-539, (1992).  
 Cordy, J.M., et al. Mol Membr Biol, 23, 111-22 (2006).  
 Chu et al., Gene, 13: 197, (1981).  
 45 Cutler, R. G. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 2070-5 (2004).  
 Davidson et al. , PNAS USA, 97 (7): 3428-3432 (2000).  
 Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier.  
 Dietschy, J. M. & Turley, S. D. J Lipid Res 45, 1375-97 (2004).  
 Edge, Nature, 292: 756, (1981).  
 50 Ehehalt, R., et al, J Cell Biol, 160, 113-23, (2003).  
 Felgner et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. , USA, 84: 7413-7417, (1987).  
 Graham et al. , Virology, 2: 456-467, (1973).  
 Grimm, M. O. et al. Nat Cell Biol 7, 1118-23 (2005).  
 Hutter-Paier, B. et al. Neuron 44, 227-38 (2004).  
 55 Jay et al., J. Biol. Chem., 259: 6311, (1984).  
 Jin, L. W., et al. Am J Pathol 164, 975-85 (2004).  
 Kivipelto, M. et al. Ann Intern Med 137, 149-55 (2002).  
 Klein et al. , Nature, 327: 70-73, (1987).  
 Kolsch, H. et al. Neurosci Lett 368, 303-8 (2004).  
 60 Kotin, R. M., Human Gene Therapy, 5: 793-801 (1994).  
 Lebkowski et al., Molec. Cell. Biol. 8: 3988-3996, (1988).  
 Li, Y.M., et al. Nature, 405, 689-94 (2000).  
 Mannino et al. , BioTechniques, 6: 682-690, (1988).  
 Mori, T. et al. J Neuropathol Exp Neurol 60, 778-785. (2001).  
 65 Muzyczka, N. , Current Topics in Microbiol. And Immunol. , 158: 97-129, (1992).  
 Namba, Y., et al, Brain Res 541, 163-166, (1991).

Nambair et al., Science, 223: 1299,(1984).  
 Ohyama, Y., et al. J Biol Chem 281, 3810-3820 (2006)  
 Ramirez, D.M., et al. J Comp Neurol, 507, 1676-93 (2008).  
 Refolo, L. M. et al. Neurobiol Dis 8, 890-9. (2001).  
 5 Shelling and Smith, Gene Therapy: 165-169,(1994).  
 Shigekawa et al., BioTechniques, 6: 742-751, (1988).  
 Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York.  
 Sevin, C., et al. Hum Mol Genet, 15, 53-64 (2006).  
 Simons, M. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 6460-6464 (1998).  
 10 Strittmatter, W. J. et al. Proc Natl Acad Sci USA 90, 1977-1981 (1993).  
 Sturchler-Pierrat, C., et al. Proc Natl Acad Sci USA, 94, 13287-92 (1997).  
 Sturchler-Pierrat, CC & Staufenbiel, M. Ann N Y Acad Sci, 920, 134-9 (2000).  
 Van Dam, D. et al. Eur J Neurosci, 17, 388-96 (2003).  
 Vetrivel, K.S. et al. J Biol Chem, 279, 44945-54 (2004).  
 15 Vetrivel, K. S. et al. J Biol Chem 280, 25892-900 (2005).  
 Vincent et al. , Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1990.  
 Wahrle, S., et al. Neurobiol Dis, 9, 11-23 (2002).  
 Won, J.S., et al. J Neurochem, 105, 1536-49 (2008).  
 Zhou et al., J Exp. Med. 179: 1867-1875, (1994).  
 20

**Listado de secuencias**

- <110> INSERM  
 25 <120> Utilización del gen *CYP46* para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer  
 <130> B627  
 <160> 32  
 30 <170> PatentIn versión 3.3  
 <210> 1  
 <211> 2138  
 <212> ADN  
 35 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1503)  
 40 <400> 1

ES 2 582 200 T3

atg	agc	ccc	ggg	ctg	ctg	ctg	ctc	ggc	agc	gcc	gtc	ctg	ctc	gcc	ttc	48
Met	Ser	Pro	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Ser	Ala	Val	Leu	Leu	Ala	Phe	
1			5					10						15		
ggc	ctc	tgc	tgc	acc	ttc	gtg	cac	cgc	gct	cgc	agc	cgc	tac	gag	cac	96
Gly	Leu	Cys	Cys	Thr	Phe	Val	His	Arg	Ala	Arg	Ser	Arg	Tyr	Glu	His	
		20						25					30			
atc	ccc	ggg	ccg	ccg	cgg	ccc	agt	ttc	ctt	cta	gga	cac	ctc	ccc	tgc	144
Ile	Pro	Gly	Pro	Pro	Arg	Pro	Ser	Phe	Leu	Leu	Gly	His	Leu	Pro	Cys	
		35					40					45				
ttt	tgg	aaa	aag	gat	gag	gtt	ggc	cgt	gtg	ctc	caa	gat	gtg	ttt		192
Phe	Trp	Lys	Lys	Asp	Glu	Val	Gly	Gly	Arg	Val	Leu	Gln	Asp	Val	Phe	
	50					55					60					
ttg	gat	tgg	gct	aag	aag	tat	gga	cct	ggt	gtg	cgg	gtc	aac	gtc	ttc	240
Leu	Asp	Trp	Ala	Lys	Lys	Tyr	Gly	Pro	Val	Val	Arg	Val	Asn	Val	Phe	
65					70				75						80	
cac	aaa	acc	tca	gtc	atc	gtc	acg	agt	cct	gag	tgc	ggt	aag	aag	ttc	288
His	Lys	Thr	Ser	Val	Ile	Val	Thr	Ser	Pro	Glu	Ser	Val	Lys	Lys	Phe	
				85					90					95		
ctg	atg	tca	acc	aag	tac	aac	aag	gac	tcc	aag	atg	tac	cgt	gcg	ctc	336
Leu	Met	Ser	Thr	Lys	Tyr	Asn	Lys	Asp	Ser	Lys	Met	Tyr	Arg	Ala	Leu	
			100					105					110			
cag	act	gtg	ttt	ggt	gag	aga	ctc	ttc	ggc	caa	ggc	ttg	gtg	tcc	gaa	384
Gln	Thr	Val	Phe	Gly	Glu	Arg	Leu	Phe	Gly	Gln	Gly	Leu	Val	Ser	Glu	
		115					120					125				
tgc	aac	tat	gag	cgc	tgg	cac	aag	cag	cgg	aga	gtc	ata	gac	ctg	gcc	432
Cys	Asn	Tyr	Glu	Arg	Trp	His	Lys	Gln	Arg	Arg	Val	Ile	Asp	Leu	Ala	
	130					135					140					
ttc	agc	cgg	agc	tcc	ttg	gtt	agc	tta	atg	gaa	aca	ttc	aac	gag	aag	480
Phe	Ser	Arg	Ser	Ser	Leu	Val	Ser	Leu	Met	Glu	Thr	Phe	Asn	Glu	Lys	
145					150					155					160	
gct	gag	cag	ctg	gtg	gag	att	cta	gaa	gcc	aag	gca	gat	ggg	cag	acc	528
Ala	Glu	Gln	Leu	Val	Glu	Ile	Leu	Glu	Ala	Lys	Ala	Asp	Gly	Gln	Thr	
				165					170					175		
cca	gtg	tcc	atg	cag	gac	atg	ctg	acc	tac	acc	gcc	atg	gac	atc	ctg	576
Pro	Val	Ser	Met	Gln	Asp	Met	Leu	Thr	Tyr	Thr	Ala	Met	Asp	Ile	Leu	
			180					185					190			

ES 2 582 200 T3

gcc aag gca gct ttt ggg atg gag acc agt atg ctg ctg ggt gcc cag 624  
 Ala Lys Ala Ala Phe Gly Met Glu Thr Ser Met Leu Leu Gly Ala Gln  
 195 200 205

aag cct ctg tcc cag gca gtg aaa ctt atg ttg gag gga atc act gcg 672  
 Lys Pro Leu Ser Gln Ala Val Lys Leu Met Leu Glu Gly Ile Thr Ala  
 210 215 220

tcc cgc aac act ctg gca aag ttc ctg cca ggg aag agg aag cag ctc 720  
 Ser Arg Asn Thr Leu Ala Lys Phe Leu Pro Gly Lys Arg Lys Gln Leu  
 225 230 235 240

cgg gag gtc cgg gag agc att cgc ttc ctg cgc cag gtg ggc agg gac 768  
 Arg Glu Val Arg Glu Ser Ile Arg Phe Leu Arg Gln Val Gly Arg Asp  
 245 250 255

tgg gtc cag cgc cgc cgg gaa gcc ctg aag agg ggc gag gag gtt cct 816  
 Trp Val Gln Arg Arg Arg Glu Ala Leu Lys Arg Gly Glu Glu Val Pro  
 260 265 270

gcc gac atc ctc aca cag att ctg aaa gct gaa gag gga gcc cag gac 864  
 Ala Asp Ile Leu Thr Gln Ile Leu Lys Ala Glu Glu Gly Ala Gln Asp  
 275 280 285

gac gag ggt ctg ctg gac aac ttc gtc acc ttc ttc att gct ggt cac 912  
 Asp Glu Gly Leu Leu Asp Asn Phe Val Thr Phe Phe Ile Ala Gly His  
 290 295 300

gag acc tct gcc aac cac ttg gcg ttc aca gtg atg gag ctg tct cgc 960  
 Glu Thr Ser Ala Asn His Leu Ala Phe Thr Val Met Glu Leu Ser Arg  
 305 310 315 320

cag cca gag atc gtg gca agg ctg cag gcc gag gtg gat gag gtc att 1008  
 Gln Pro Glu Ile Val Ala Arg Leu Gln Ala Glu Val Asp Glu Val Ile  
 325 330 335

ggt tct aag agg tac ctg gat ttc gag gac ctg ggg aga ctg cag tac 1056  
 Gly Ser Lys Arg Tyr Leu Asp Phe Glu Asp Leu Gly Arg Leu Gln Tyr  
 340 345 350

ctg tcc cag gtc ctc aaa gag tcg ctg agg ctg tac cca cca gca tgg 1104  
 Leu Ser Gln Val Leu Lys Glu Ser Leu Arg Leu Tyr Pro Pro Ala Trp  
 355 360 365

ggc acc ttt cgc ctg ctg gaa gag gag acc ttg att gat ggg gtc aga 1152  
 Gly Thr Phe Arg Leu Leu Glu Glu Glu Thr Leu Ile Asp Gly Val Arg  
 370 375 380

gtc ccc ggc aac acc ccg ctc ttg ttc agc acc tat gtc atg ggg cgg 1200  
 Val Pro Gly Asn Thr Pro Leu Leu Phe Ser Thr Tyr Val Met Gly Arg  
 385 390 395 400

atg gac aca tac ttt gag gac ccg ctg act ttc aac ccc gat cgc ttc 1248  
 Met Asp Thr Tyr Phe Glu Asp Pro Leu Thr Phe Asn Pro Asp Arg Phe  
 405 410 415

ggc cct gga gca ccc aag cca cgg ttc acc tac ttc ccc ttc tcc ctg 1296  
 Gly Pro Gly Ala Pro Lys Pro Arg Phe Thr Tyr Phe Pro Phe Ser Leu  
 420 425 430

ggc cac cgc tcc tgc atc ggg cag cag ttt gct cag atg gag gtg aag 1344  
 Gly His Arg Ser Cys Ile Gly Gln Gln Phe Ala Gln Met Glu Val Lys  
 435 440 445

gtg gtc atg gca aag ctg ctg cag agg ctg gag ttc cgg ctg gtg ccc 1392  
 Val Val Met Ala Lys Leu Leu Gln Arg Leu Glu Phe Arg Leu Val Pro  
 450 455 460

ggg cag cgc ttc ggg ctg cag gag cag gcc aca ctc aag cca ctg gac 1440

ES 2 582 200 T3

Gly Gln Arg Phe Gly Leu Gln Glu Gln Ala Thr Leu Lys Pro Leu Asp  
 465 470 475 480  
 ccc gtg ctg tgc acc ctg cgg ccc cgc ggc tgg cag ccc gca ccc cca 1488  
 Pro Val Leu Cys Thr Leu Arg Pro Arg Gly Trp Gln Pro Ala Pro Pro  
 485 490 495  
 cca ccc ccc tgc tga gggggcctcc aggcaggacg agactcctcg ggcaagggcc 1543  
 Pro Pro Pro Cys  
 500  
 gtgcccgcc acctctgctg cccacggcca cccacccttc tcccctgccc cgtcccctgg 1603  
 gccacccttc acgctggctt ccagcgggcc ctctgccgac cgctgcttc acaccctca 1663  
 gcgctccctg tcgctgcgg actccatggc cttcctgga ctggcccttg cccaactccc 1723  
 agccaccacc actgtcccta ccaactgagcc cttgcacagg ccacttgctc agacgagaca 1783  
 ccctaactct tgctactcc ctaaagccct cttcaggggt cacctcctcc aagaagccct 1843  
 ccttgccacc ccccgccggc aggggcccct cctctgtgct ccctcggta cctgtgctac 1903  
 ctctaacacc aactgacca cactgtatcg tgagtgtccg ttgacgtgac caattgccct 1963  
 gccaggctgt cagcgcctca agggtagggc ctgctgtga tttgtctctg agccccctgt 2023  
 gccacccag ggcccggcac agagtcgatg ctcaataaat gtgtgttgac tgcaaaaaaa 2083  
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaa 2138

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

5

<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

10

ES 2 582 200 T3

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  
 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

ES 2 582 200 T3

			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												

5 <210> 3  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> cebador

<400> 3  
 tgcacaggag ccaagagtga a 21

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

20 <220>  
 <223> cebador

<400> 4  
 cacatcacag ctccccacca 20

25 <210> 5  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> artificial

30 <220>  
 <223> cebador

<400> 5  
 ggctaagaag tatgtcctg ttgtaaga 28

35 <210> 6  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> artificial

40 <220>  
 <223> cebador

<400> 6

ggtggacatc aggaacttct tgact 25  
 <210> 7  
 <211> 23  
 5 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 10 <400> 7  
 agaagtatgg acctgttg cgg 23  
 <210> 8  
 15 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 20 <223> cebador  
 <400> 8  
 tggttgacat caggaactc ttaacc 26  
 25 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 30 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 9  
 35 cacaccgtcg ccaaagagac a 21  
 <210> 10  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 40 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 10  
 45 ggcagcaaca tgccgtagtc a 21  
 <210> 11  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 50 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 55 <400> 11  
 agccgtcatc atggaaggtt tctat 25  
 <210> 12  
 <211> 22  
 60 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 65 <400> 12

gaactcatcg tgcacatggc aa 22

5 <210> 13  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> artificial

10 <220>  
<223> cebador

<400> 13  
ggcgaccaga cttggaacag ac 22

15 <210> 14  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> artificial

20 <220>  
<223> cebador

<400> 14  
tggatgacgt aagagatctg ctgtg 25

25 <210> 15  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> artificial

30 <220>  
<223> cebador

<400> 15  
cggggctggg aggtcagtat 20

35 <210> 16  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> artificial

40 <220>  
<223> cebador

<400> 16  
gcacgctggt gttttggtg ta 22

45 <210> 17  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> artificial

50 <220>  
<223> cebador

<400> 17  
tggcaaaact attctcaca aggaag 26

55 <210> 18  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> artificial

60 <220>  
<223> cebador

65 <400> 18

ES 2 582 200 T3

agggtcatgt tctgctccaa aatta 25  
<210> 19  
<211> 26  
5 <212> ADN  
<213> artificial  
  
<220>  
<223> cebador  
10  
<400> 19  
gagatacctg caccttggc ctactt 26  
  
<210> 20  
<211> 22  
15 <212> ADN  
<213> artificial  
<220>  
<223> cebador  
20  
<400> 20  
gttctggct gtcattctgg ct 22  
  
<210> 21  
25 <211> 24  
<212> ADN  
<213> artificial  
  
<220>  
30 <223> cebador  
  
<400> 21  
ccccacattc actcttgacg ctct 24  
35  
<210> 22  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> artificial  
  
<220>  
40 <223> cebador  
  
<400> 22  
45 gctggcggac gcctgacat 19  
  
<210> 23  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> artificial  
50  
<220>  
<223> cebador  
  
<400> 23  
55 caaccctgc ttccgttatc caa 23  
  
<210> 24  
<211> 24  
<212> ADN  
60 <213> artificial  
  
<220>  
<223> cebador  
  
<400> 24  
65 gagaacaggc gagacacgat ggac 24

<210> 25  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 5 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 10 <400> 25  
 caatatgcca actccacggt cac 23  
  
 <210> 26  
 <211> 20  
 15 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 20  
 <400> 26  
 ggtcgactg ggtcgaaca 20  
  
 <210> 27  
 <211> 24  
 25 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 30  
 <400> 27  
 tctccaatct cgtgccgtat ctga 24  
  
 35 <210> 28  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 40  
 <400> 28  
 ctgatgccac ttccatgaca aagtct 26  
 45  
 <210> 29  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 50  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 29  
 55 tgcgccgagag ctgattggca t 21  
  
 <210> 30  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 60 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 30  
 65 cccttcatcc ccgactccct gta 23

# ES 2 582 200 T3

<210> 31  
<211> 24  
<212> ADN  
5 <213> artificial  
  
<220>  
<223> cebador  
  
10 <400> 31  
gtcacattgc tgacaggatg ccta 24  
  
<210> 32  
<211> 21  
15 <212> ADN  
<213> artificial  
  
<220>  
<223> cebador  
20  
<400> 32  
gggttggttg cttgccact c 21

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Vector vírico que comprende un ácido nucleico codificante de la colesterol 24-hidroxilasa para su utilización en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, en el que dicho vector vírico debe administrarse directamente en el cerebro del sujeto o mediante inyección intravascular o intratecal.
2. Vector vírico según la reivindicación 1, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2.
- 10 3. Vector vírico según la reivindicación 2, que comprende la secuencia de SEC ID nº 1.
4. Vector vírico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se selecciona de entre el grupo que consiste en vectores de adenovirus, retrovirus, herpesvirus y virus adenoasociado (VAA).
- 15 5. Vector vírico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un vector VAA.
6. Vector vírico según la reivindicación 5, que es un vector VAA5, VAA6, VAA9 o VAA10.
- 20 7. Vector vírico según la reivindicación 5, que es un vector VAA pseudotipado.
8. Vector vírico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el vector debe administrarse en el núcleo rojo, cuerpo amigdalóide, córtex entorrinal, lóbulo temporal del córtex, córtex cerebral, neuronas en el ventral lateral o los núcleos anteriores del tálamo, mediante microinyección estereotáctica.
- 25 9. Vector vírico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el vector debe administrarse mediante inyección intravenosa o intraarterial.
10. Vector vírico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el vector debe administrarse mediante inyección intratecal.
- 30 11. Vector vírico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el vector debe administrarse mediante inyección en el líquido cefalorraquídeo.
12. Vector vírico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo dicho vector un ácido nucleico codificante de la colesterol 24-hidroxilasa y que es un vector VAA.
- 35 13. Vector vírico según la reivindicación 12, que es un vector VAA5, VAA6, VAA9 o VAA10.
14. Vector vírico según la reivindicación 12, que es un vector VAA pseudotipado.
- 40 15. Vector vírico según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que comprende una secuencia de control vírica o un promotor específico del SNC.
- 45 16. Vector vírico según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que comprende una secuencia de control heteróloga seleccionada de entre el grupo que consiste en un promotor de la fosfoglicerato cinasa (PKG), un promotor temprano del SV40, un promotor LTR del virus del tumor mamario de ratón, un promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP), un promotor del virus del herpes simple (HSV), un promotor del citomegalovirus (CMV), un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), un promotor de la proteína básica de la mielina (MBP), un promotor de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y un promotor de la enolasa específica neuronal (NSE).
- 50

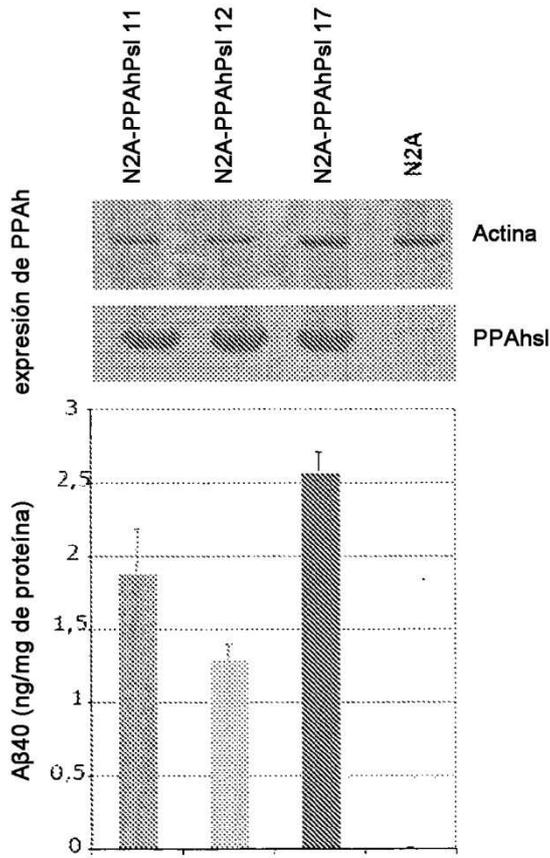


FIGURA 1A

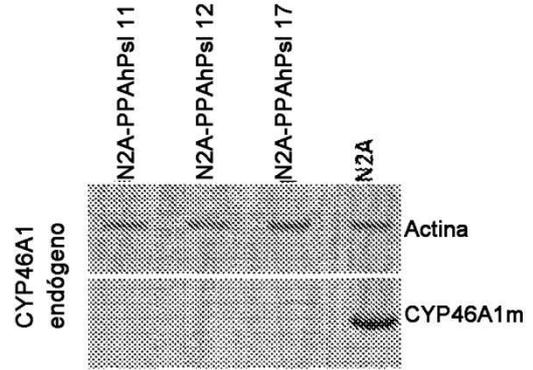


FIGURA 1B

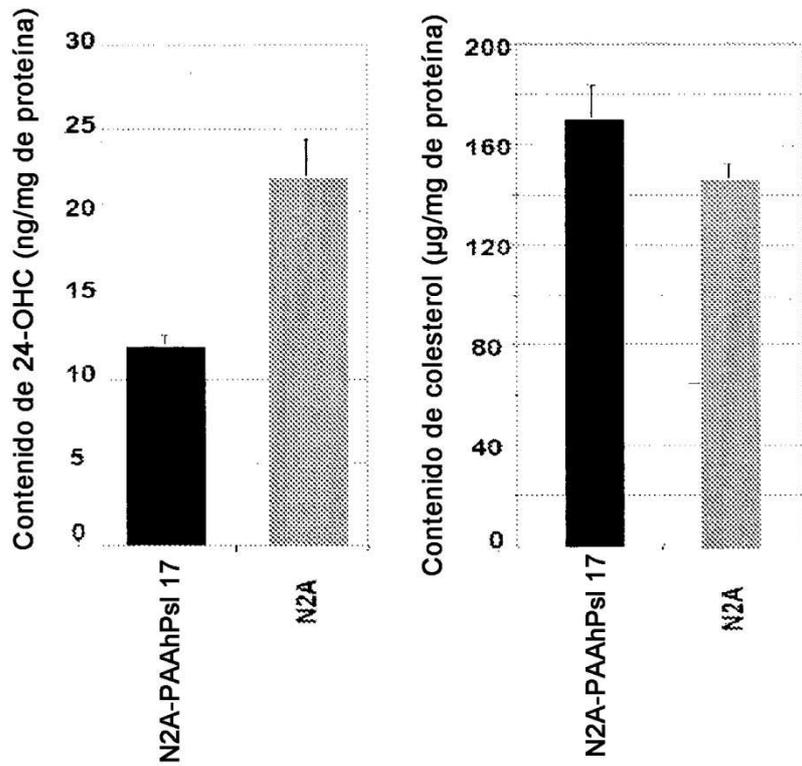


FIGURA 1C

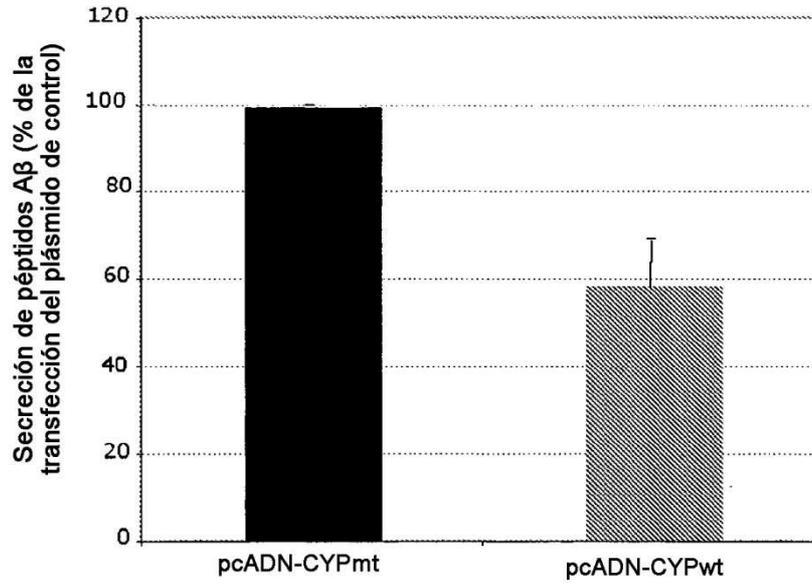


FIGURA 2A

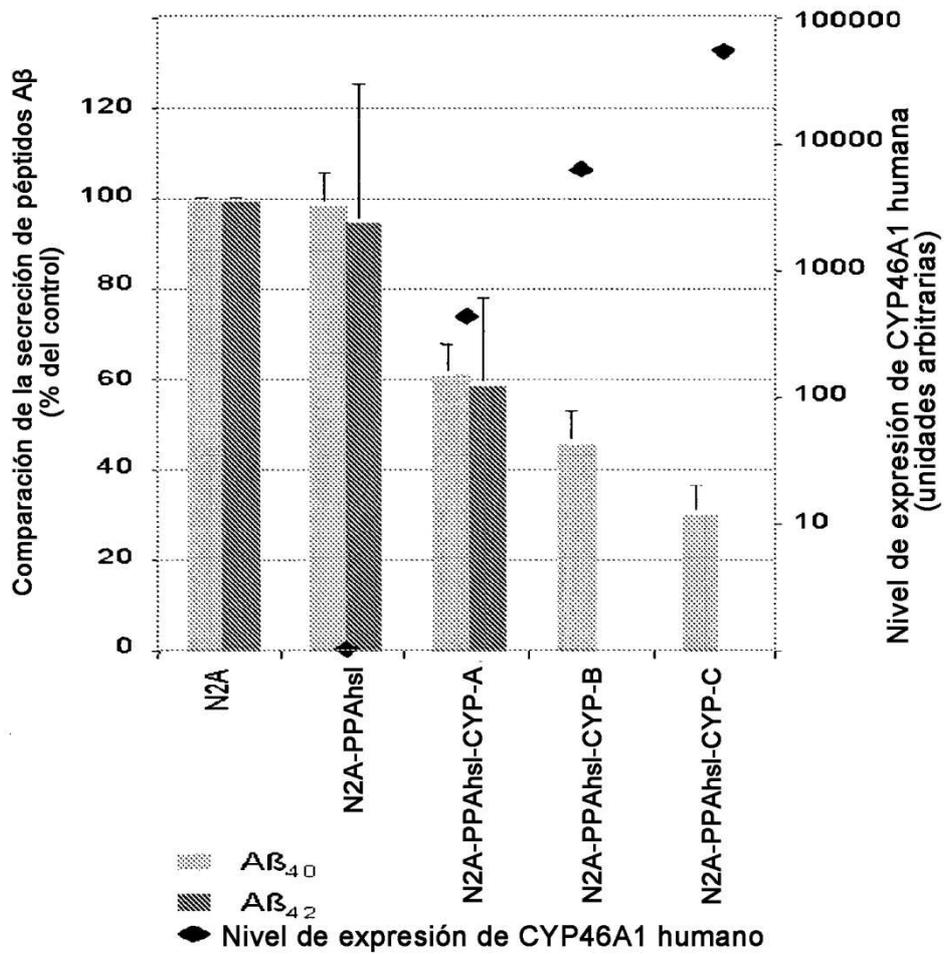


FIGURA 2B

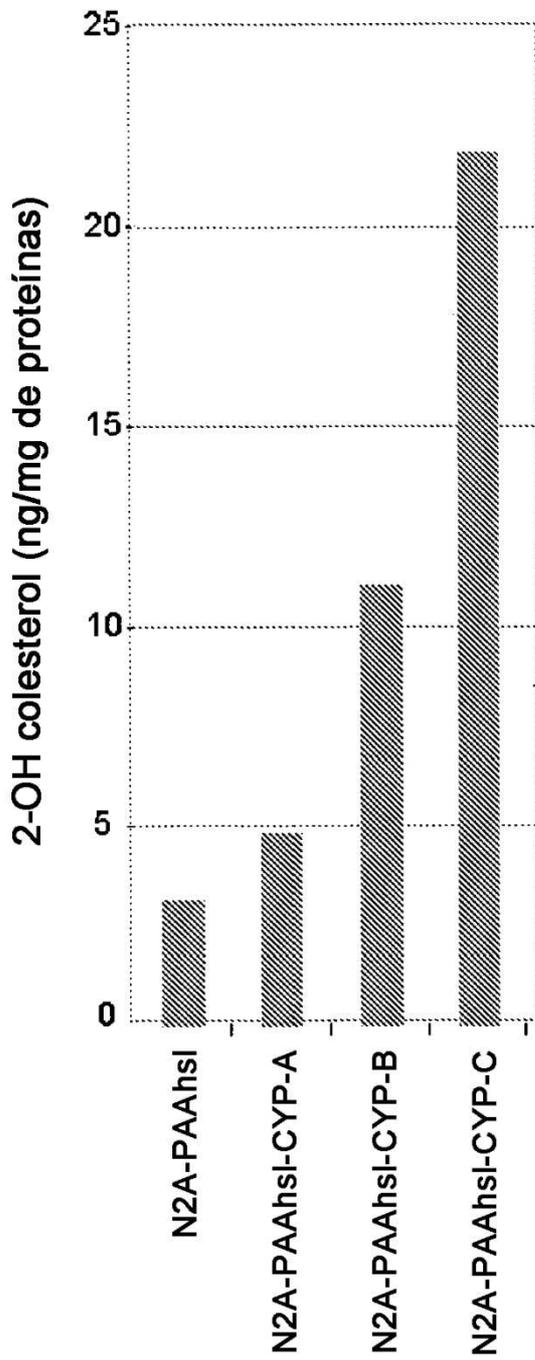


FIGURA 2C

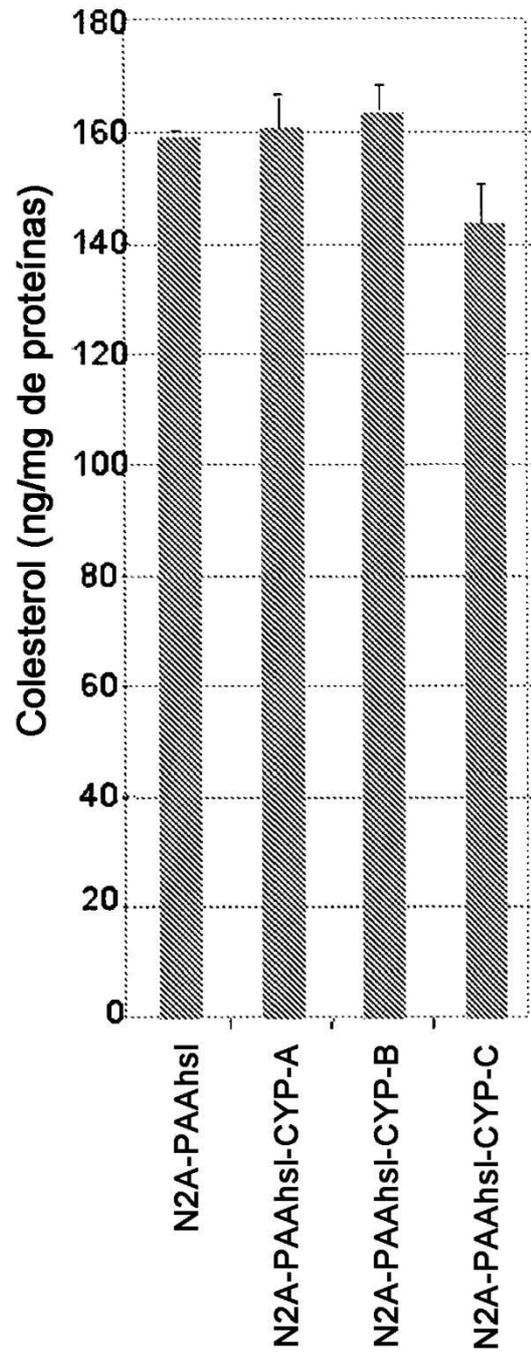


FIGURA 2D

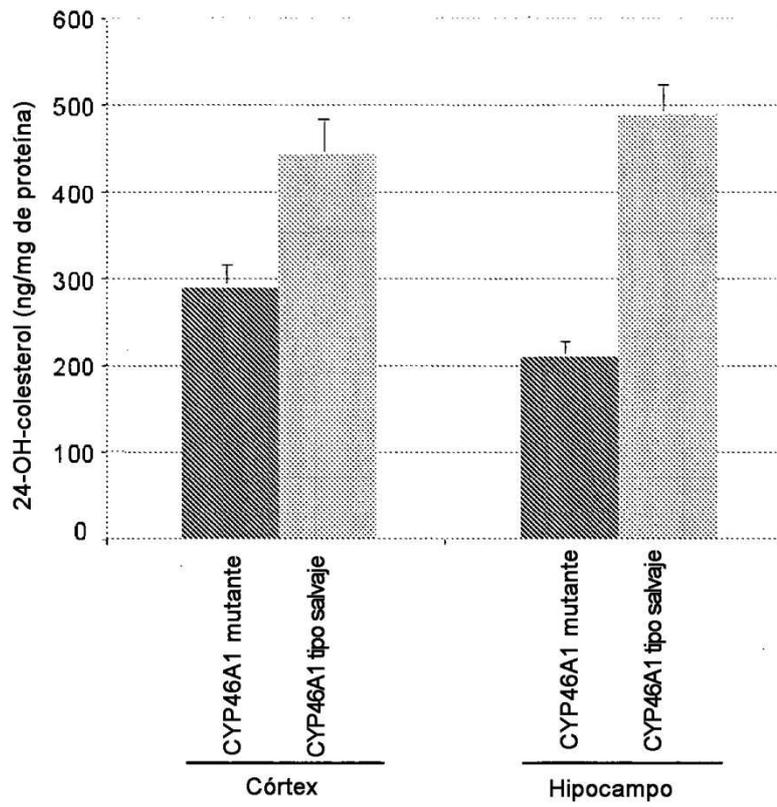


FIGURA 3

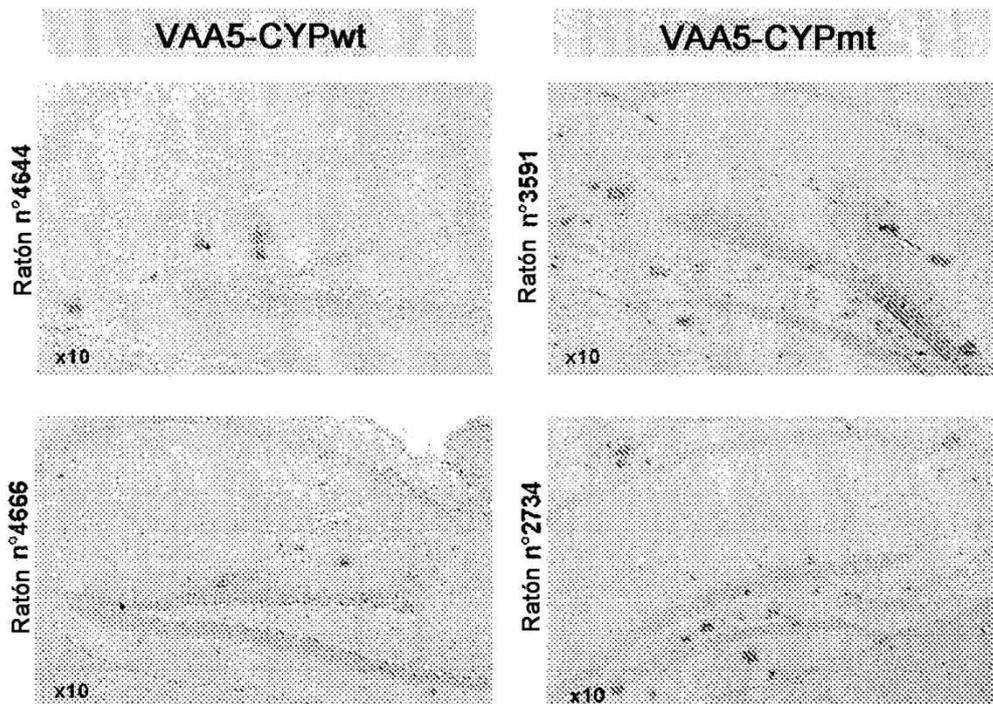


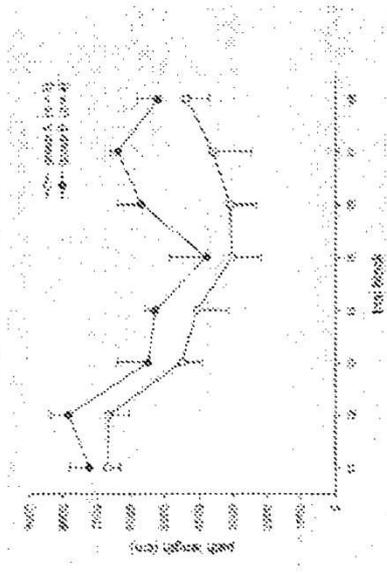
FIGURA 4A

FIGURA 4B

A. ratones APP con inyección de CYPwt  
 B. ratones APP con inyección de control

A: Etapa de adquisición

Longitud de trayectoria



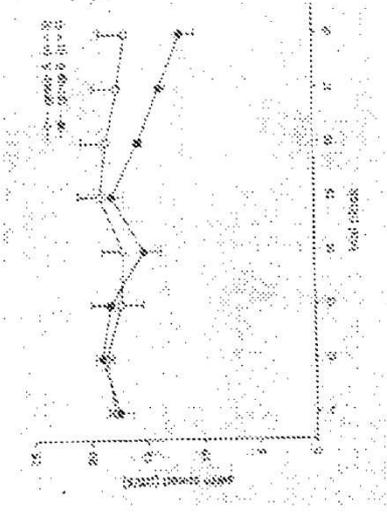
RM-ANOVA 2 factores

Efecto del tratamiento:  $p=0,054$

Efecto bloque prueba:  $p<0,001$

Efecto interacción tratamientoxbloque prueba:  $p=0,583$

B: Velocidad de nado



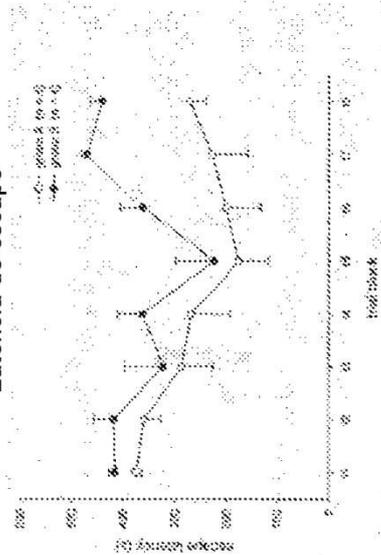
RM-ANOVA 2 factores

Efecto del tratamiento:  $p=0,401$

Efecto bloque prueba:  $p<0,001$

Efecto interacción tratamientoxbloque prueba:  $p=0,059$

Latencia de escape



RM-ANOVA 2 factores

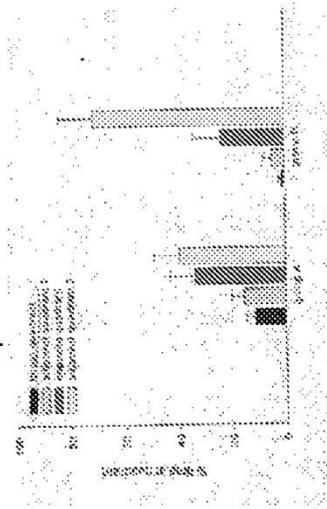
Efecto del tratamiento:  $p=0,091$

Efecto bloque prueba:  $p<0,001$

Efecto interacción tratamientoxbloque prueba:  $p=0,098$

C: Ensayo de prueba:

% de tiempo en diferentes cuadrantes del LAM



	Grupo A	Grupo B
Entradas diana	1.4 $\pm$ 0.4	0 $\pm$ 0
Long. trayectoria (cm)	1703 $\pm$ 295	1244 $\pm$ 146
		$p=0,013$
		$p=0,329$

Figura 5

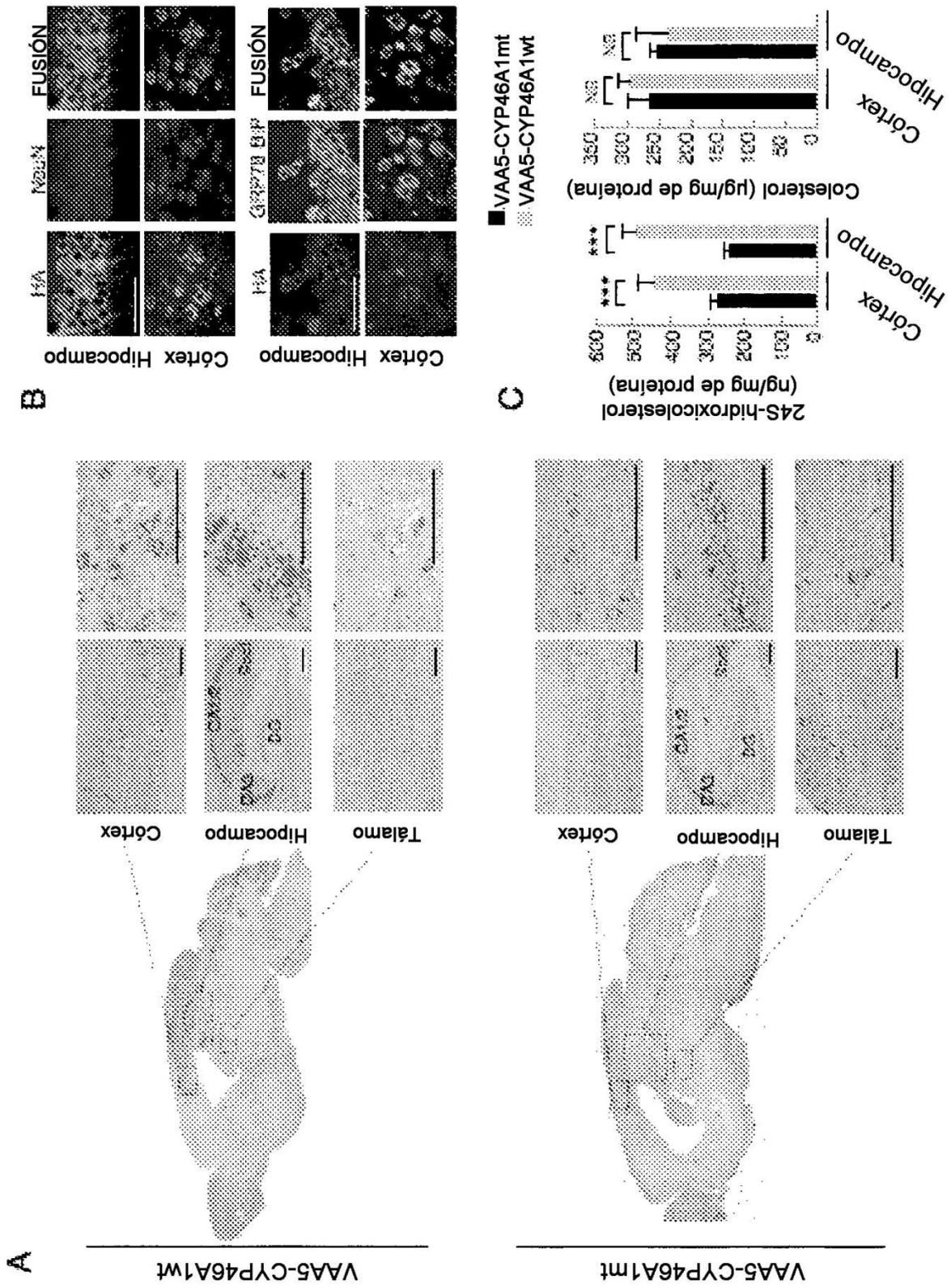


Figura 6

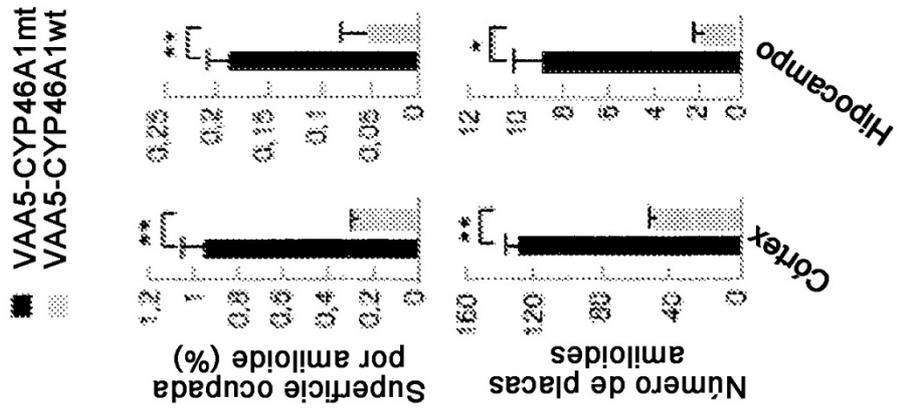


Figure 7B

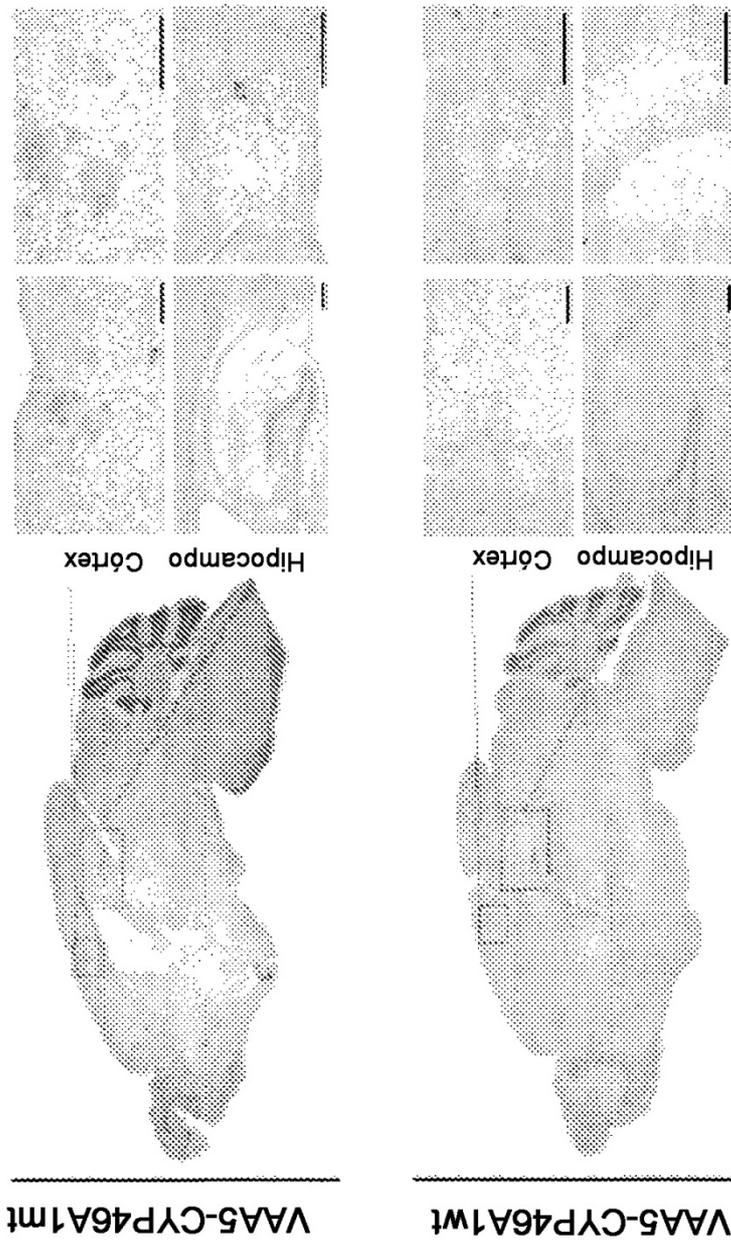


Figure 7A

■ VAA5-CYP46A1mt  
 ● VAA5-CYP46A1wt

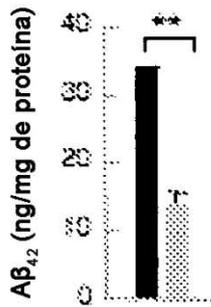
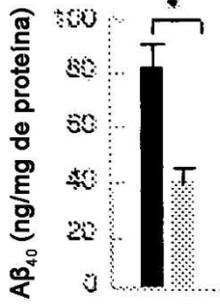


Figura 7C

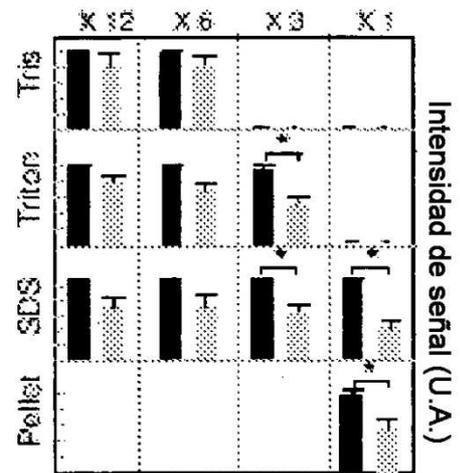
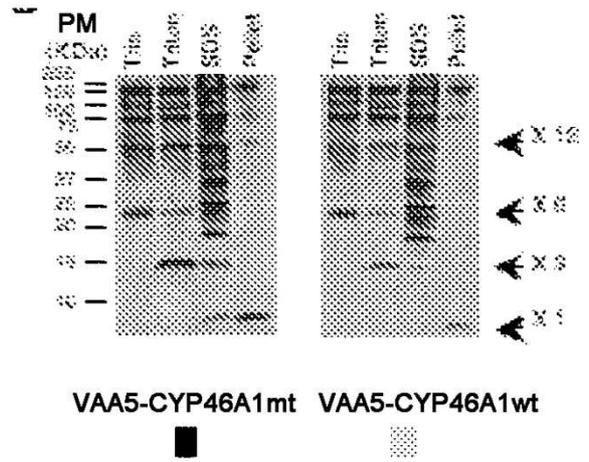


Figura 7D

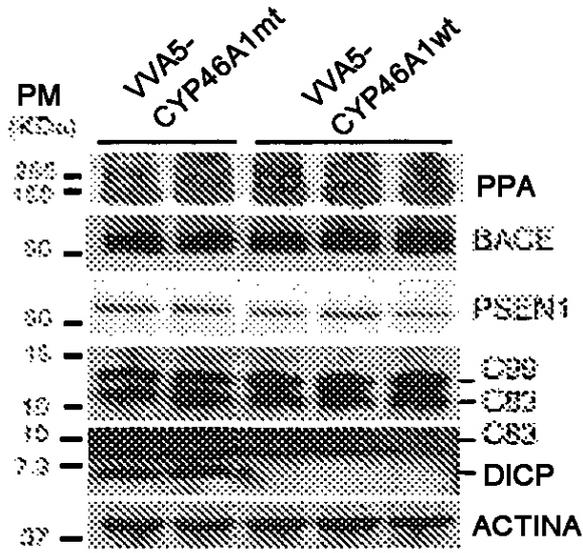


Figura 7E

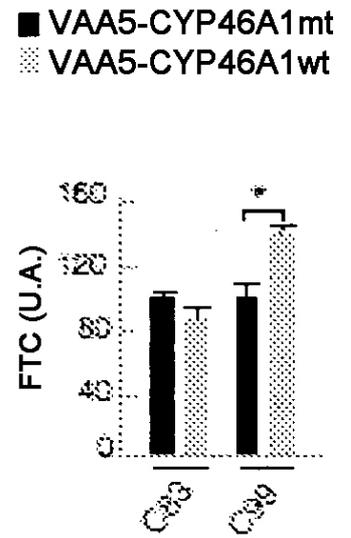


Figura 7F

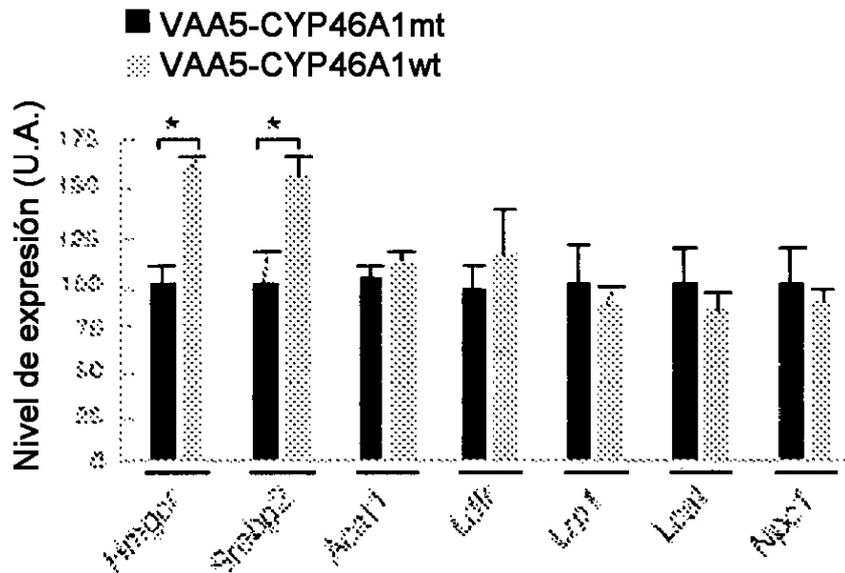


Figura 7G

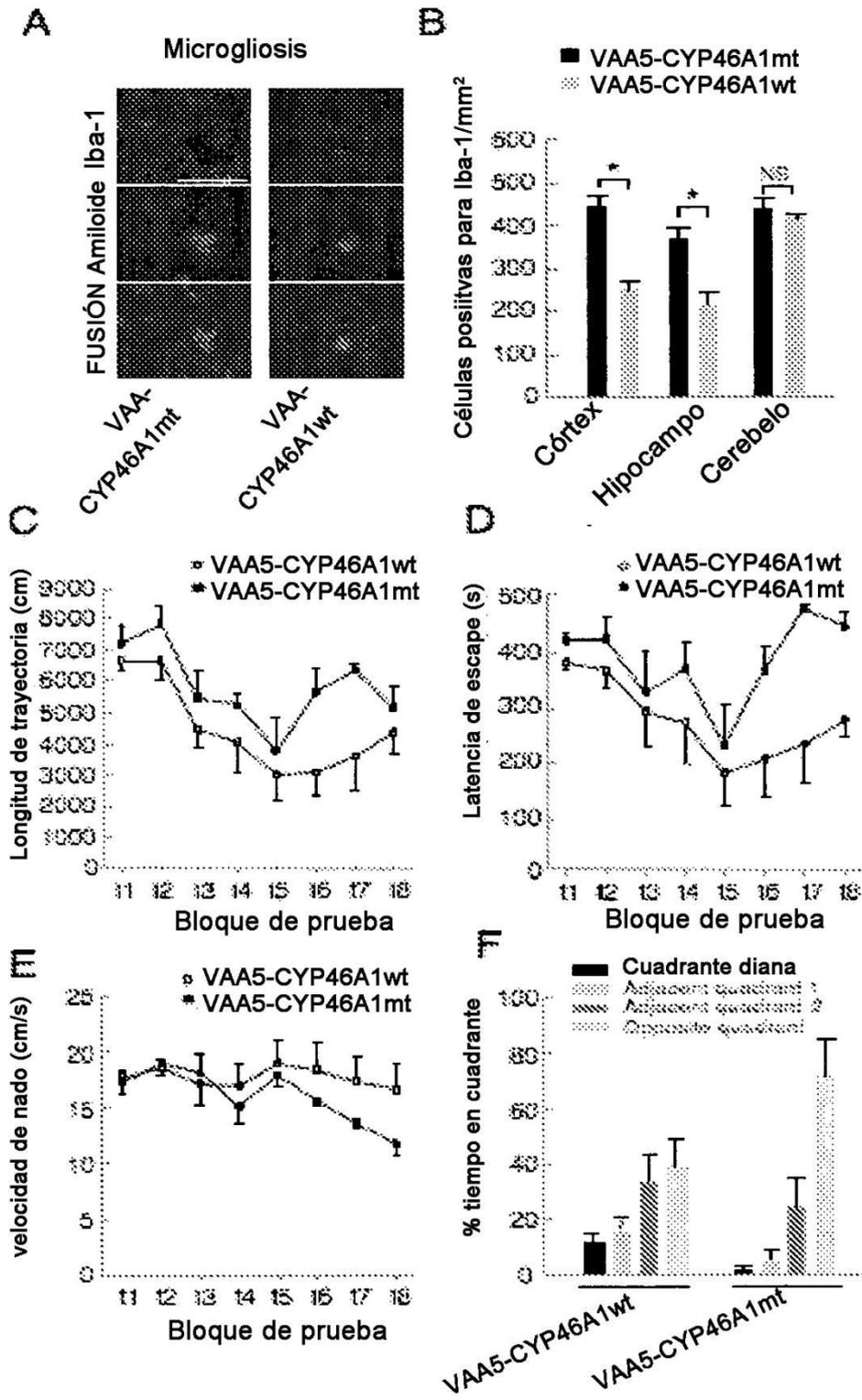


Figura 8

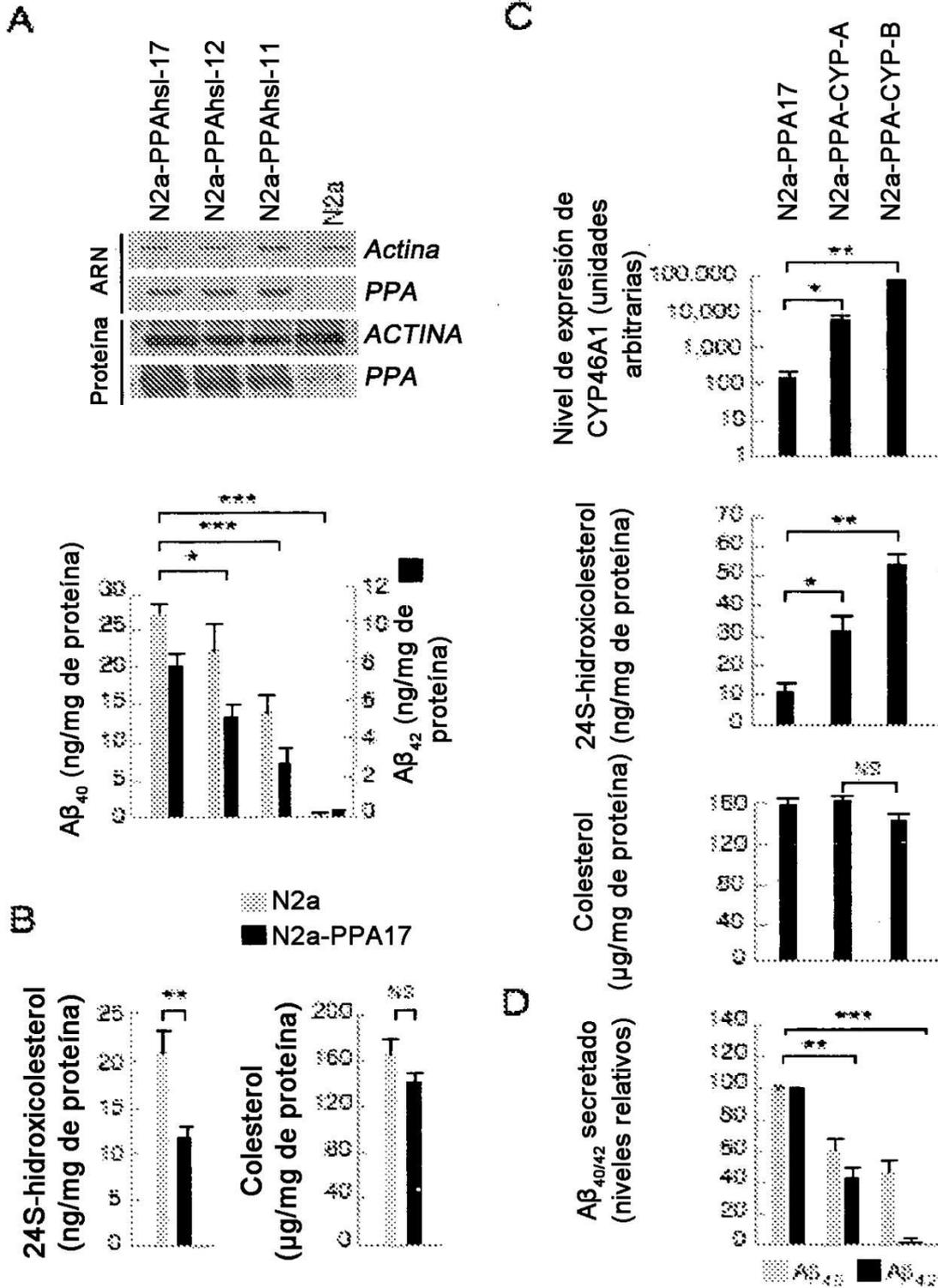


Figura 9

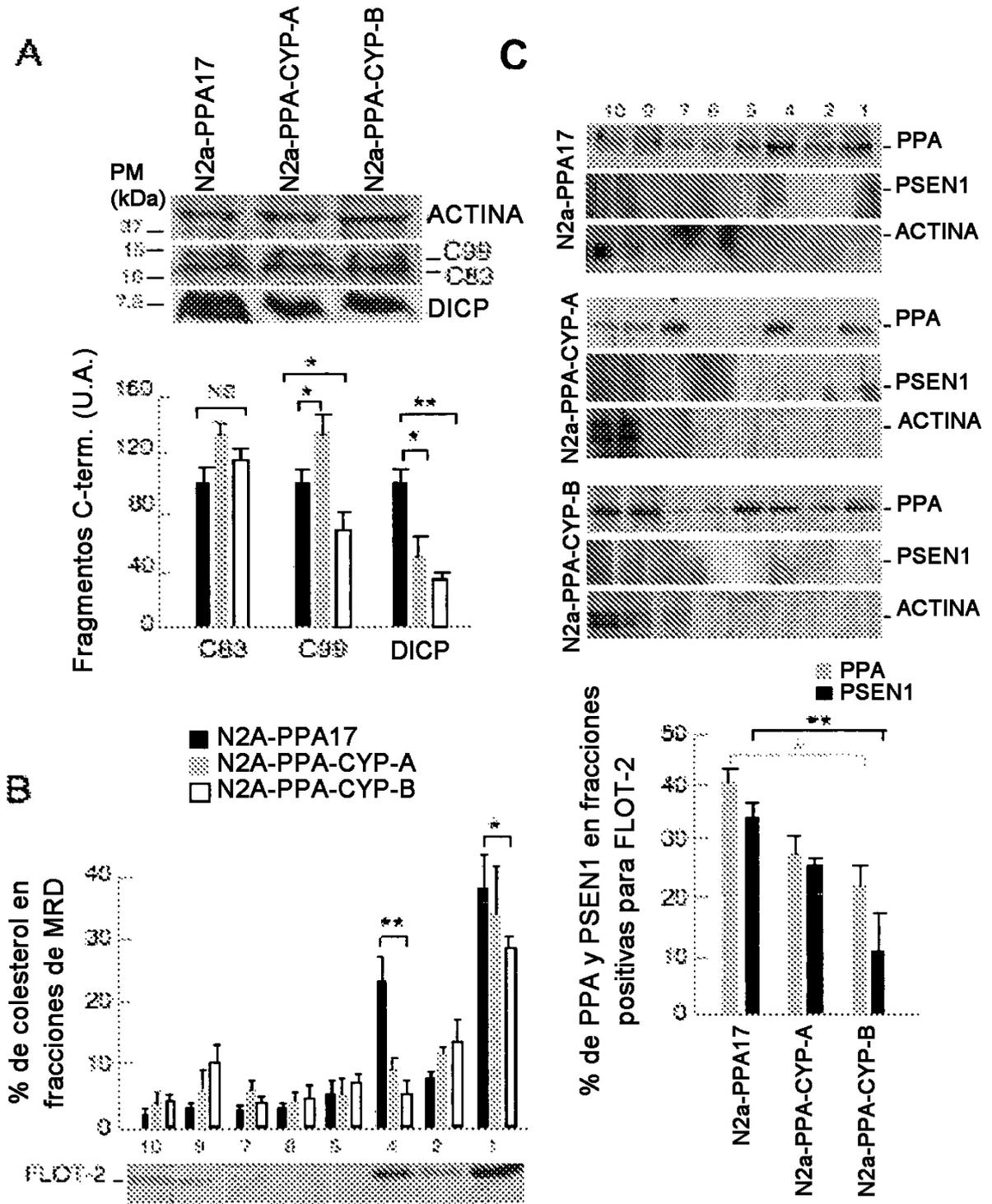


Figura 10