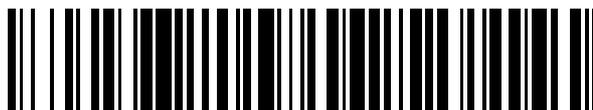


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 434**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2008** **E 08786331 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016** **EP 2185712**

54 Título: **Dispensación génica en el SNC usando administración periférica de vectores de VAA**

30 Prioridad:

23.07.2007 EP 07301263

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

14.10.2016

73 Titular/es:

**GENETHON (50.0%)
1 BIS RUE DE L'INTERNATIONALE BOITE
POSTALE 60
91002 EVRY CEDEX, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

BARKATS, MARTINE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 586 434 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

Dispensación génica en el SNC usando administración periférica de vectores de VAA

La presente invención está relacionada con composiciones y métodos para la dispensación de proteínas terapéuticas al SNC usando vectores de VAA9 bicatenarios autocomplementarios. Más específicamente, la invención está relacionada con composiciones y métodos para dispensar proteínas dentro del líquido cefalorraquídeo de sujetos mamíferos a través de la administración periférica de vectores de VAA9 bicatenarios autocomplementarios. La invención puede usarse para tratar diversos trastornos del sistema nervioso central, incluyendo enfermedades degenerativas y enfermedades de las motoneuronas

Antecedentes

La producción a largo plazo de proteínas terapéuticas en los ventrículos cerebrales representa una estrategia reconocida para la neuroprotección en las enfermedades del sistema nervioso central. Por ejemplo, se publicó que la dispensación intracerebroventricular (ICV) de la proteína recombinante VEGF (siglas en inglés de factor de crecimiento del endotelio vascular) retrasaba la degeneración motoneuronal en un modelo de rata de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) {Storkebaum, 2005 n.º 22}. En este estudio, se dispensó VEGF en los ventrículos cerebrales mediante la implantación estereotáxica de un catéter ligado a una mini bomba osmótica.

La inyección ICV de vectores de genes recombinantes es una forma conveniente de inducir la producción continua de proteínas terapéuticas dentro del líquido cefalorraquídeo (LCR) a través de la transducción de células del epéndimo y del plexo coroideo {Broekman, 2007 n.º 37}. Se ha publicado que esta estrategia es eficaz para la corrección de la neuropatología en modelos animales de enfermedades lisosómicas, mediando la dispensación génica de enzimas lisosómicas al cerebro. Por ejemplo, un estudio reciente demostró que la ICV neonatal directa de un VAA que expresa la β -galactosidasa ácida lisosómica fue capaz de mediar la dispensación de la enzima al cerebro y de restaurar los niveles normales de glucoesfingolípidos {Broekman, 2007 n.º 48}.

La dispensación de proteínas dentro del LCR representa, por tanto una estrategia eficaz para el tratamiento de las patologías del sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, las técnicas existentes para lograr dicha dispensación necesitan de la inyección directa de vectores génicos dentro del cerebro y/o cirugía y los riesgos sustanciales relacionados con el procedimiento de inyección (p. ej., cirugía intracerebral, infección o inflamación debida a la ruptura de la barrera hematoencefálica, etc.), dificultan las aplicaciones clínicas de esta estrategia.

El documento WO2005/056807 está relacionado con la identificación de VAA bovinos y propone el uso de los mismos para la dispensación génica *in vivo*, incluida para el tratamiento de los trastornos del SNC. Esta solicitud incluye una discusión de la propiedad de la transcitosis (es decir., el transporte activo por la membrana) de VAA a través de la barrera epitelial. Se ha sugerido la posibilidad de lograr la dispensación génica al SNC bien a través del trasplante *ex vivo* o la inyección de células modificadas mediante VAA, o bien a través de la inyección directa *in vivo* de los vectores.

Sin embargo, la solicitud está basada en experimentos *in vitro* que muestran VAA bovino e infección por VAA4 de células de endotelio cerebral primario bovino en cultivo.

Compendio de la invención

La presente invención está relacionada con composiciones y métodos para la dispensación de proteínas terapéuticas al SNC usando vectores de VAA recombinantes. Más específicamente, la invención está relacionada con composiciones y métodos para dispensar proteínas dentro del líquido cefalorraquídeo de sujetos mamíferos a través de la administración periférica de vectores de VAA9 bicatenarios autocomplementarios.

Un objeto de esta invención está relacionado más específicamente con el uso de un vector de VAA que codifica una proteína terapéutica para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno del SNC en un sujeto, en donde dicho vector de VAA se administra mediante inyección periférica a dicho sujeto, permitiendo dicha inyección la infección de células secretoras del líquido cefalorraquídeo del cerebro (p. ej., las células epiteliales del plexo coroideo y/o del epéndimo y/o una membrana meníngea) y la secreción posterior de la proteína terapéutica dentro del líquido cefalorraquídeo, en donde dicho vector de VAA es un vector de serotipo humano VAA9 y en donde el vector de VAA es un vector de VAA bicatenario autocomplementario.

Un objeto más de esta invención reside en el uso de un vector de VAA que codifica una proteína terapéutica para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno del SNC a través de la secreción de dicha proteína terapéutica dentro del líquido cefalorraquídeo tras la inyección periférica de dicho vector, en donde dicho vector de VAA es un vector de serotipo humano VAA9 y en donde el vector de VAA es un vector de VAA bicatenario autocomplementario.

Otro objeto de esta invención está relacionado con el uso de un vector de VAA para la fabricación de un medicamento para segregar una proteína dentro del líquido cefalorraquídeo de un sujeto mediante la inyección periférica de dicho vector en condiciones que permiten la infección de las células secretoras del líquido

cefalorraquídeo del cerebro (p. ej., las células epiteliales del plexo coroideo y/o del epéndimo y/o una membrana meníngea), en donde dicho vector de VAA es un vector de serotipo humano VAA9 y en donde el vector de VAA es un vector de VAA bicatenario autocomplementario.

5 La invención también está relacionada con el uso de un vector de VAA para la fabricación de un medicamento para expresar una proteína recombinante dentro de las células secretoras del líquido cefalorraquídeo del cerebro (p. ej., las células epiteliales del plexo coroideo y/o del epéndimo y/o una membrana meníngea) de un sujeto, en donde dicho vector se administra al sujeto mediante inyección periférica y en donde dicho vector de VAA es un vector de serotipo humano VAA9 y en donde el vector de VAA es un vector de VAA bicatenario autocomplementario.

10 Aún un objeto más de esta invención es un método para dispensar una proteína al líquido cefalorraquídeo de un sujeto, comprendiendo el método administrar por vía periférica a dicho sujeto un vector de VAA que codifica dicha proteína, permitiendo dicha administración periférica la infección de células secretoras del líquido cefalorraquídeo del cerebro (p. ej., las células epiteliales del plexo coroideo y/o del epéndimo y/o una membrana meníngea) en dicho sujeto y la secreción de dicha proteína dentro del líquido cefalorraquídeo, y en donde dicho vector de VAA es un vector de serotipo humano VAA9 y en donde el vector de VAA es un vector de VAA bicatenario autocomplementario.

15 Un objeto más de esta invención es un método de infectar células secretoras del líquido cefalorraquídeo del cerebro (p. ej., las células epiteliales del plexo coroideo y/o del epéndimo y/o una membrana meníngea) de un sujeto, que comprende administrar por vía periférica al sujeto una cantidad de un vector de VAA eficaz para infectar dichas células y en donde dicho vector de VAA es un vector de serotipo humano VAA9 y en donde el vector de VAA es un vector de VAA bicatenario autocomplementario.

20 Un objeto más de esta invención es un método para tratar un trastorno del SNC en un sujeto dispensando una proteína terapéutica dentro del líquido cefalorraquídeo de dicho sujeto, comprendiendo el método administrar por vía periférica al sujeto una cantidad de un vector de VAA que codifica dicha proteína eficaz para permitir la infección de células secretoras del líquido cefalorraquídeo del cerebro (p. ej., las células epiteliales del plexo coroideo y/o del epéndimo y/o una membrana meníngea) mediante dichos vectores de VAA en el sujeto, causando dicha infección la expresión de la proteína terapéutica codificada dentro del líquido cefalorraquídeo y tratando dicho trastorno y en donde dicho vector de VAA es un vector de serotipo humano VAA9 y en donde el vector de VAA es un vector de VAA bicatenario autocomplementario.

25 Un objeto más de esta invención es una mejora de los métodos para tratar un trastorno del SNC en un sujeto mediante la dispensación de una proteína terapéutica dentro del líquido cefalorraquídeo de dicho sujeto, comprendiendo la mejora dispensar dicha proteína terapéutica a través de la administración periférica al sujeto de un vector de VAA en una cantidad eficaz para causar la infección de las células secretoras del líquido cefalorraquídeo del cerebro (p. ej., las células epiteliales del plexo coroideo y/o el epéndimo y/o una membrana meníngea), y en donde dicho vector de VAA es un vector de serotipo humano VAA9 y en donde el vector de VAA es un vector de VAA bicatenario autocomplementario.

35 Según se describirá en la presente solicitud, esta invención representa un medio seguro y conveniente para dispensar proteínas terapéuticas al SNC a través de su secreción dentro del LCR. La invención es adecuada para dispensar cualquier proteína terapéutica, en cualquier sujeto mamífero, incluyendo sujetos humanos, para tratar diversas afecciones del SNC.

Leyenda de las figuras

40 Figura 1. Dispensación génica diseminada al sistema nervioso central (SNC) y los músculos de ratones neonatos tras la inyección intramuscular con diferentes serotipos y genomas de vectores de VAA. Secciones representativas que muestran tinción histoquímica de mSEAP de cada grupo (n= 3 ratones/grupo) (A) Secciones transversales de los músculos gemelos inyectados con VAA. (B) Vistas aumentadas del plexo coroideo del tercer ventrículo de ratones inyectados con VAA y de un control no inyectado. (C) Vista aumentada de los vasos sanguíneos del cerebro y la médula espinal de ratones inyectados con VAA9ac. PN4, posnatal 4; PN8, posnatal 8; mc, monocatenario; ac: autocomplementario. (D) Comparación de la eficacia de la transducción en el cerebro de ratones inyectados con VAA por vía i.p. (3.10e9 gv). Secciones cerebrales ilustrativas de ratones inyectados por vía i.p. con los 4 vectores de VAA. Las secciones se trataron para la histoquímica de mSEAP. Se detectó una expresión de mSEAP muy intensa en el plexo coroideo de ratones inyectados con VAA9ac. Se detectó una actividad mSEAP casi similar en el plexo coroideo de ratones inyectados con VAA1mc, VAA1ac, y VAA9mc.

Figura 2. Dispensación génica diseminada al sistema nervioso central (SNC) y los músculos de ratones neonatos tras la inyección intraperitoneal con vectores de VAA9 ac y mc. Secciones representativas que muestran la tinción histoquímica de mSEAP en (A) músculos y (B) coroides. La flecha y las puntas de flechas muestran células epiteliales transducidas de la coroides y del epéndimo, respectivamente, en el ratón inyectado con VAA.

55 Figura 3. Expresión de GFP en el SNC de ratones neonatos siete días después de la inyección intraperitoneal de scAA9-GFP. Microfotografías representativas de secciones histológicas de cerebro y médula espinal que muestran inmunotinción con GFP. Se detectó expresión transgénica en (A, B) el plexo coroideo, (A, C, el hipocampo (la flecha y las puntas de flecha indican células con morfología glial y neuronal, respectivamente), (D) la corteza entorrinal (las

flechas indican células con una morfología neuronal típica) y (E) el conducto corticoespinal (al nivel de la decusación piramidal en la médula espinal cervical)

Figura 4. Microfotografías representativas de la expresión de GFP en el SNC de ratones neonatos tras la inyección intramuscular de vectores de VAA9ac que expresan GFP. Las secciones histológicas de cerebro y médula espinal se trataron con inmunotinción de GFP a los siete días de la inyección. Se detectó expresión transgénica en (A) las células epiteliales del plexo coroideo (flecha) y del epéndimo (puntas de flecha) (B) células neuronales del tabique (flechas) y (C) fibras del conducto corticoespinal de la médula espinal (flechas).

Figura 5. Expresión de GFP en el SNC de ratones neonatos siete días después de la inyección intravenosa de vectores de VAA9ac. Microfotografías representativas de secciones histológicas de cerebro tratadas para inmunotinción con GFP. Se detectaron células positivas para GFP en (A) las células epiteliales del plexo coroideo (flecha) y el epéndimo (puntas de flecha), (B) células neuronales de la corteza entorrinal, (C, D) células de tipo neuronal y de tipo glial del hipocampo.

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria describimos un nuevo procedimiento de transferencia génica para la dispensación de proteínas terapéuticas al SNC a través de la inyección periférica de vectores génicos de VAA. Este método está basado en la dispensación transgénica a células secretoras del líquido cefalorraquídeo del cerebro (es decir, poblaciones o tipos celulares que, dentro del cerebro, permiten la secreción de un producto dentro del líquido cefalorraquídeo, tales como las células epiteliales del plexo coroideo y/o del epéndimo y/o una membrana meníngea) a través de la dispensación periférica de vectores génicos recombinantes de VAA, permitiendo la secreción de las proteínas terapéuticas codificadas dentro del LCR.

Según se describe en los ejemplos, se analizó la distribución de la expresión transgénica después de la administración periférica (p. ej., inyecciones i.m., i.p. o i.v.) de vectores de recombinantes de VAA monocatenarios (mc) o bicatenarios autocomplementarios (ac) en ratones C57B1/6 neonatos o adultos. Estos vectores expresaban, bien la fosfatasa alcalina segregada (SEAP, por sus siglas en inglés) murina, o bien la proteína verde fluorescente (GFP), bajo el control del promotor de CMV. Los resultados presentados en la sección experimental muestran sorprendentemente que, tras la(s) inyección(es) periférica(s) de VAA9-GFP, bien convencionales, o bien autocomplementarios en ratones neonatos, se detecta un alto nivel de expresión transgénica en las células del plexo coroideo y del epéndimo, así como en las membranas meníngeas. Se encontró que la eficacia de la transducción aumentó tras la inyección periférica en el ratón adulto de soluciones altamente concentradas de VAA9ac. Después de la dispensación sistémica en ratones adultos tanto de VAA1 como de VAA9 que expresaban mSEAP, se encontró un incremento significativo de actividad mSEAP en las muestras de SNC. También se detectó expresión de mSEAP en el plexo coroideo de ratones inyectados con VAA9mc y VAA1 (mc y ac), según se ve en secciones cerebrales tratadas para histoquímica de mSEAP (figura 1D).

Dicha dispensación periférica de vectores recombinantes de VAA permite el uso como diana y la secreción a largo plazo de proteínas terapéuticas dentro del LCR. La inyección i.v. de un VAA9ac que codifica el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en ratones neonatos permitió la producción de la proteína segregada en el SNC hasta 5 meses tras la inyección (la última vez que se examinó). Esta estrategia de transferencia genética representa, por tanto, un procedimiento eficaz y no invasivo para alcanzar el SNC que permite evitar los riesgos ligados al procedimiento quirúrgico y eludir el problema de la barrera hematoencefálica. La presente invención tiene, por tanto, numerosas implicaciones y utilizadas en el tratamiento de trastornos del SNC, incluyendo enfermedades neurodegenerativas y enfermedades de las motoneuronas.

Vectores de VAA

Dentro del contexto de la presente invención, la expresión "vector de VAA" designa cualquier vector que comprende o procede de componentes de VAA y que es adecuado para infectar células de mamífero, preferiblemente células humanas. La expresión vector de VAA designa típicamente una partícula viral (o virión) de tipo VAA que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica. Según se discutirá más adelante, el VAA puede proceder de diversos serotipos, incluyendo combinaciones de serotipos (es decir, VAA "pseudotipificados") o de diversos genomas (p. ej., monocatenarios o autocomplementarios. Además, el vector de VAA puede ser de replicación defectuosa y/o dirigido.

El virus adenoasociado (VAA) es un parvovirus dependiente, de aproximadamente veinte nanómetros de tamaño. Al igual que otros parvovirus, VAA es un virus de ADN monocatenario, no envuelto, que tiene un genoma de alrededor de 5000 nucleótidos de longitud, que contiene dos fases de lectura abierta. La fase de lectura abierta de la izquierda codifica las proteínas responsables de la replicación (Rep), mientras que la fase de lectura abierta de la derecha codifica las proteínas estructurales de la cápside (Cap). Las fases de lectura abierta están flanqueadas por dos secuencias ITR, que sirven como origen de replicación del genoma viral. Además, el genoma también contiene una secuencia empaquetadora que permite el empaquetamiento del genoma viral en una cápside de VAA.

El VAA también necesita de funciones colaboradoras (que pueden proporcionarse, p. ej., mediante un adenovirus, o mediante células empaquetadoras o plásmidos colaboradores adecuados) para sufrir una infección productiva en

células cultivadas. En ausencia de dichas funciones colaboradoras, los viriones de VAA entran esencialmente en las células, migran al núcleo como una molécula de ADN monocatenario y se integran dentro del genoma de la célula anfitriona. VAA tiene una amplia gama de anfitriones para su infectividad, incluyendo células humanas, es ubicuo en los seres humanos y es completamente inocuo.

5 Los vectores de VAA se han diseñado, producido y usado para mediar la dispensación génica en sujetos humanos, incluida para fines terapéuticos. Actualmente hay ensayos clínicos en curso en diversos países que usan vectores de VAA. Típicamente, los vectores de VAA para su uso en la transferencia génica comprenden un genoma de VAA de replicación defectuosa que carece de secuencias virales codificantes de Rep y Cap funcionales. Dichos vectores de VAA de replicación defectuosa carecen más preferiblemente de la mayoría o de todas las secuencias codificantes de Rep y Cap y retienen esencialmente una o dos secuencias ITR y una secuencia empaquetadora de VAA.

10 En la bibliografía se han descrito métodos para producir dichos vectores de VAA, incluyendo el uso de células empaquetadoras, virus o plásmidos auxiliares, y/o sistemas de baculovirus (Samulski et al, (1989) J. Virology 63, 3822; Xiao et al, (1998) J. Virology 72, 2224; Inoue et al, (1998) J. Virol. 72, 7024; los documentos WO98/22607; WO2005/072364). También se han publicado métodos para producir vectores de VAA pseudotipificados (p. ej., el documento WO00/28004), así como diversas modificaciones o formulaciones de vectores de VAA, para reducir su inmunogenicidad tras la administración *in vivo* (véanse, p. ej., los documentos WOO 1/23001; WO00/73316; WO04/112727; WO05/005610; WO99/06562).

Los vectores de VAA pueden prepararse o proceder de diversos serotipos de VAA, los cuales pueden incluso mezclarse entre sí o con otros tipos de virus para producir virus VAA quiméricos (p. ej., pseudotipificados).

20 En una realización particular, el vector de VAA para su uso en la presente descripción es un vector de serotipo humano de VAA. Dicho VAA humano puede proceder de cualquier serotipo conocido, p. ej., de uno cualquiera de los serotipos 1-11, más preferiblemente de VAA1, VAA2, VAA4, VAA6 y VAA9. Ejemplos específicos de dichos vectores de VAA son los vectores que comprenden un genoma procedente de VAA1 (una molécula de ácido nucleico que comprende una ITR procedente de VAA1 y una secuencia empaquetadora procedente de VAA1, unida operativamente a un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica, preferiblemente dos ITR procedentes de VAA1 que flanquean una secuencia empaquetadora procedente de VAA1 y un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica) en una cápside procedente de VAA1; vectores que comprenden un genoma procedente de VAA2 en una cápside procedente de VAA2; vectores que comprenden un genoma procedente de VAA4 en una cápside procedente de VAA4; vectores que comprenden un genoma procedente de VAA6 en una cápside procedente de VAA6 o vectores que comprenden un genoma procedente de VAA9 en una cápside procedente de VAA9.

25 En otra realización particular, el vector de VAA es un vector de VAA pseudotipificado, es decir, comprende secuencias o componentes que se originan a partir de al menos dos serotipos de VAA distintos. En una realización particular, el vector de VAA pseudotipificado comprende un genoma de VAA procedente de un serotipo de VAA y una cápside procedente, al menos en parte, de un serotipo de VAA distinto. Los ejemplos específicos de dichos vectores de VAA pseudotipificados incluyen, sin limitación, vectores que comprenden un genoma procedente de VAA2 en una cápside procedente de VAA1; o vectores que comprenden un genoma procedente de VAA2 en una cápside procedente de VAA6; o vectores que comprenden un genoma procedente de VAA2 en una cápside procedente de VAA4 o vectores que comprenden un genoma procedente de VAA2 en una cápside procedente de VAA9.

30 En una realización particular adicional, que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el vector de VAA puede comprender una cápside modificada, que incluye proteínas o péptidos de origen no viral o estructuralmente modificados, para alterar el tropismo del vector. Como ejemplo particular, la cápside puede incluir un ligando de un receptor particular, o un receptor de un ligando particular, para dirigir el vector hacia el(los) tipo(s) celular(es) que expresan dicho receptor o ligando, respectivamente.

35 En los vectores de VAA usados en la presente descripción, el genoma de VAA puede ser, bien un ácido nucleico monocatenario o bien un ácido nucleico autocomplementario bicatenario (McCarty et al, Gene Therapy, 2001). En la presente invención, el genoma de VAA del vector de VAA es un ácido nucleico autocomplementario bicatenario.

40 Según se discute anteriormente, el genoma procedente de VAA comprende un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica. Típicamente, el ácido nucleico también comprende secuencias reguladoras que permiten la expresión y, preferiblemente, la secreción de la proteína codificada, tal como, p. ej., un promotor, potenciador, señal de poliadenilación, sitios internos de entrada al ribosoma (SIER), secuencias que codifican dominios de transducción de proteína (DTP) y similares. A este respecto, el ácido nucleico comprende lo más preferiblemente una región promotora, unida operativamente a la secuencia codificante, para causar o mejorar la expresión de la proteína terapéutica en las células infectadas. Dicho promotor puede ser ubicuo, específico de tejido, fuerte, débil, regulado, quimérico, etc., para permitir la producción eficaz y adecuada de la proteína en el tejido infectado. El promotor puede ser homólogo a la proteína codificada, o heterólogo, incluyendo promotores celulares, virales, fúngicos, vegetales o sintéticos. Los promotores más preferidos para su uso en la presente invención serán funcionales en las células humanas, particularmente en las células epiteliales humanas, lo más preferiblemente en las células del plexo

5 coroideo o del epéndimo. Los ejemplos de dichos promotores regulados incluyen, sin limitación, promotores que contienen elementos tet on/off, promotores inducibles por rapamicina y promotores de metalotioneína. Los ejemplos de promotores específicos para las células epiteliales del plexo coroideo o del epéndimo incluyen el de acuaporina 1 (AQP1) o el homólogo 4 de *forkhead/HNF-3* (HFH-4, por sus siglas en inglés) o el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo II. Los ejemplos de promotores ubicuos incluyen promotores virales, particularmente el promotor de CMV, el promotor de VRS, el promotor de SV40, etc., y promotores celulares tales como el promotor de PGK (fosfoglicerato cinasa).

10 En una realización preferida, el ácido nucleico comprende una secuencia líder que permite la secreción de la proteína codificada. La fusión del transgén de interés con una secuencia que codifica un péptido señal de secreción (localizado habitualmente en el N terminal de los polipéptidos segregados) permitirá la producción de la proteína terapéutica en una forma que puede segregarse a partir de la célula transducida dentro del LCR. Los ejemplos de dichos péptidos señal incluyen los péptidos señal secretores de la albúmina, la β -glucuronidasa, la proteasa alcalina o la fibronectina.

15 Según otra realización, el transgén está fusionado con secuencias DTP, tales como las secuencias Tat o VP22, con el fin de causar o mejorar la secreción de la proteína terapéutica a partir de las células transducidas y la recaptación por las vecinas.

En una realización particular el ácido nucleico comprende, engarzador operativo, un promotor y una secuencia líder, para permitir la expresión y secreción de la proteína codificada.

20 En una realización particular adicional, el ácido nucleico comprende, engarzador operativo, un promotor, una secuencia líder y una secuencia DTP, para permitir la expresión y secreción de la proteína codificada.

En una realización lo más preferida, el promotor es específico para las células epiteliales del plexo coroideo o el epéndimo, es decir, permite la expresión preferente del transgén en dichas células.

Según se discute anteriormente, los vectores de VAA pueden producirse mediante técnicas conocidas en sí en la técnica, según se ilustra adicionalmente en los ejemplos.

25 Administración periférica

La invención está basada en la demostración de que la expresión eficaz y a largo plazo de proteínas en el LCR puede lograrse con técnicas no invasivas, a través de la administración periférica de vectores de VAA. Dicha administración periférica incluye, sin limitación, cualquier vía de administración que no implique la inyección directa dentro del cerebro. Más particularmente, la administración periférica comprende inyecciones sistémicas, tales como inyecciones intramusculares (i.m.), intravenosas (i.v.), intraperitoneales (i.p.), intraarteriales, subcutáneas o transdérmicas. La administración periférica también incluye la administración oral de vectores de VAA (documento WO96/40954), implantes para uso en dispensación (documento WO01/91803), o administración mediante instilación a través del sistema respiratorio, p. ej., usando pulverizadores, aerosoles o cualquier otra formulación apropiada.

35 La administración periférica más preferida incluye la inyección periférica, en particular la inyección sistémica, lo más preferiblemente, la inyección i.m., i.p. o i.v.

El experto en la técnica puede adaptar fácilmente las dosis de vectores de VAA, p. ej., dependiendo de la patología, el sujeto, la pauta de tratamiento, etc. Típicamente, se administran de 10^5 a 10^{14} genomas virales (unidades de transducción) por dosis, típicamente de 10^5 a 10^{12} , de 10^6 a 10^{11} , de 10^7 a 10^{11} , de 10^8 a 10^{11} . Las dosis de ejemplo para lograr efectos terapéuticos son títulos de virus de al menos aproximadamente 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} o 10^{11} unidades de transducción o más, preferiblemente entre aproximadamente 10^{10} y 10^{13} . Una dosis eficaz preferida dentro del contexto de esta invención es una dosis que permite la infección de células del plexo coroideo o del epéndimo.

45 El vector de VAA puede administrarse en cualquier forma adecuada, bien como una solución o suspensión líquida, como una forma sólida adecuada para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o bien como un gel, o como una emulsión. Los vectores de VAA se formulan típicamente con cualquier excipiente, vehículo, adyuvante, diluyente, etc. apropiado y farmacéuticamente aceptable. Para la inyección, el excipiente puede ser un líquido, solución isotónica, tampón, tal como un agua estéril y libre de pirógeno o una solución salina tamponada con fosfato estéril y libre de pirógeno. Para la inhalación, el excipiente puede estar en forma particulada.

50 Los vectores de VAA se administran típicamente en una cantidad "terapéuticamente eficaz", es decir, una cantidad que es suficiente para aliviar (p. ej., disminuir, reducir) al menos uno de los síntomas asociados con el estado de la enfermedad, o para proporcionar mejoría en la afección del sujeto. Debe señalarse que pueden realizarse administraciones repetidas, si es necesario, usando, bien la misma, o bien diferente vía de administración periférica y/o el mismo o distintos serotipos de VAA.

Trastorno del SNC

La invención puede usarse para tratar una variedad de trastornos a través de la dispensación de un producto terapéutico dentro del LCR. El producto terapéutico puede ser cualquier proteína, péptido o ARN que pueda aliviar o reducir síntomas que resultan de una ausencia o defecto en una proteína en una célula o sujeto o que confieren de otra forma un beneficio a un sujeto. Los ejemplos de proteínas terapéuticas incluyen factores de crecimiento, citocinas, hormonas, neurotransmisores, enzimas, factores antiapoptóticos, factores angiogénicos y cualquier proteína que se sabe que está mutada en trastornos patológicos tales como la proteína de "supervivencia de la motoneurona" (SMN).

Dependiendo del producto terapéutico, la invención puede usarse para tratar diversas enfermedades, incluyendo cualquier enfermedad que pueda tratarse o prevenirse expresando proteínas terapéuticas dentro del tejido nervioso. Dichas enfermedades incluyen trastornos del SNC, seleccionados preferiblemente de entre enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neuromusculares, enfermedades lisosómicas, traumatismos, lesiones de la médula ósea, cánceres del sistema nervioso, enfermedades desmielinizantes, enfermedades autoinmunes del sistema nervioso, síndromes neurotóxicos, trastornos del sueño.

Los ejemplos específicos de enfermedades incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, esquizofrenia, enfermedad de Sly, enfermedad de Hunter, demencia, paranoia, trastorno obsesivo compulsivo, discapacidades específicas del aprendizaje, ELA, atrofia medular muscular, enfermedad de Charcot-Marie Tooth, enfermedad de Kennedy, glioblastoma, neuroblastoma, autismo, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Hurler, enfermedad de Krabbe y alteraciones del comportamiento (p.ej., trastornos del sueño, la percepción o la función cognitiva).

La invención puede usarse en cualquier mamífero, particularmente en sujetos humanos, incluyendo adultos, para el tratamiento preventivo o curativo.

En la sección experimental siguiente se discutirán aspectos y ventajas adicionales de la presente invención, que se considerarán únicamente como ilustrativos y no limitantes del alcance de esta solicitud.

Ejemplos**1. Materiales y métodos****1.1. Producción de los vectores recombinantes de VAA** {Riviere, 2006 n.º 39}.

Los vectores de VAAmc de serotipos 1 y 9 monocatenarios (mc) y bicatenarios autocomplementarios (ac) se generaron empaquetando genomas de VAA2 en cápsides de VAA1 y VAA9. Brevemente, los vectores se produjeron usando una transfección de tres plásmidos colaboradores libres de virus con (1) el plásmido colaborador de adenovirus (2) el plásmido empaquetador de VAA que codifica los genes rep y cap (3) el plásmido vector de VAA2 que contiene mSEAP o GFP (bajo el control del promotor de citomegalovirus) como genoma mc o ac. Éste último plásmido se construyó eliminando las secuencias "D" y del sitio de resolución terminal (TRS, por sus siglas en inglés) en el extremo 5' del genoma {Veron, 2007 n.º 40}.

Los vectores recombinantes se purificaron mediante doble ultracentrifugación en CsCl seguida por diálisis contra solución salina tamponada con fosfato. Las partículas físicas se cuantificaron mediante Taqman y los títulos de los vectores se expresaron como genomas virales (gv) por ml.

1.2. Animales. Se adquirieron ratonas C57B1/6 gestantes de Charles River Laboratories (Les Oncins, Francia) y se inyectó a los neonatos el día de su nacimiento (PN1). Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices europeas para la atención a seres humanos y el uso de animales de experimentación.

1.3. Inyecciones *in vivo* de vectores de VAA*- Inyecciones intramusculares:*

Se inyectaron soluciones de vectores de VAA (VAA1mc (n= 2), VAA9mc (n=2), VAA1ac (n= 2) o VAA9ac (n= 3) que codifican mSEAP o GFP tanto en tríceps como en músculos gemelos a ratones C57B16 de un día de vida (1 sitio de inyección por músculo, 5 microlitros por inyección, de $8 \cdot 10^{+9}$ a $2 \cdot 10^{+10}$ genomas virales por ratón).

- Inyecciones intraperitoneales:

Las soluciones virales (VAA1mc, n= 2, VAA9mc, n= 1, VAA1ac, n= 1 y VAA9ac, n= 2) que codifican mSEAP o GFP se inyectaron en la cavidad peritoneal de ratones C57B16 de un día (100 µl, de $3 \cdot 10^{+10}$ a 10^{+11} genomas virales por ratón).

50

- *Inyecciones intravenosas:*

Las soluciones virales (VAA9mc-GFP, n= 3) se inyectaron en la vena temporal de ratones C57B16 de un día de vida (50 μ l, $1,5 \cdot 10^{+10}$ genomas virales por ratón).

1.4. Evaluación de la expresión transgénica

5 *Histoquímica de mSEAP*

Los músculos, cerebros y médulas espinales se extrajeron a los uno (PN2), tres (PN4) o siete (PN8) días de la inyección, se congelaron en isopentano frío (-50 °C), y se mantuvieron a -80 °C para su uso extemporal.

10 Se realizaron secciones tisulares en un criostato, de 16 μ m de espesor para cerebro y médula espinal y de 8 μ m de espesor para músculos y se procesaron posteriormente para la expresión transgénica. Las secciones se lavaron con PBS y la fosfatasa alcalina endógena se inactivó durante 30 min a 65 °C. Las secciones se incubaron después durante toda la noche a 37 °C en 0,165 mg/ml 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y 0,33 mg/ml de nitroazul de tetrazolio en Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM y MgCl₂ 50 mM, se contratiñeron con hematoxilina-eosina y se montaron con Eukit.

Inmunohistoquímica de GFP:

15 Los músculos, cerebros y médulas espinales se extrajeron a los uno, tres o siete días de la inyección y se fijaron durante 4 h con paraformaldehído al 4 % en PBS. Los tejidos se crioprotegieron durante toda la noche a 4 °C en sacarosa al 15 % para cerebros y músculos y sacarosa al 30 % para médula espinal y después se congelaron en isopentano frío (-50 °C). Se cortaron secciones en serie en un criostato y se almacenaron a -80 °C para su análisis posterior.

20 Las secciones se lavaron en PBS y se incubaron durante 30 min en una solución de peróxido de hidrógeno (Peroxidase-Blocking solution, Dako) para la inhibición de las peroxidasas endógenas. Tras lavar en PBS, las secciones se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente en PBS con suero de cabra al 10 % (Dako) y Triton al 0,4 % y después se incubaron durante toda la noche con un policlonal de conejo anti GFP (Abeam; 1/3000). Se usaron un anticuerpo secundario conjugado con biotina (Vectastain, 1:200) y el kit Vectastain Elite ABC y la tinción con DAB se reveló con el kit de sustrato de DAB para peroxidasa, de Vector Laboratories. Las secciones se deshidrataron en alcohol y xileno y se montaron con Eukit.

1.5. Ensayo de cuantificación de mSEAP

30 Los tejidos congelados se lisaron en 700 μ l de tampón de lisis de núcleos incluido en el kit Wizard de extracción de ADN genómico (Promega Corporation, Madison, WI) que contiene un cóctel de inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los tejidos se homogeneizaron primero durante 30 segundos con un homogeneizador Ultra-Turrax y después se sometieron a tres homogeneizaciones sucesivas para conseguir la lisis completa. Las membranas y los restos celulares se sedimentaron mediante centrifugación durante 2 minutos a 10.000 g a 4 °C y la actividad mSEAP se midió en el sobrenadante usando un ensayo de quimioluminiscencia. Brevemente, la fosfatasa alcalina endógena se inactivó por calor durante 5 min a 65 °C y la mSEAP termorresistente se midió mediante la adición del tampón de reacción y sustrato quimioluminiscente CPSD, según las instrucciones del fabricante (Tropix, Applied Biosystems, Forster City, EE.UU.). La quimioluminiscencia se cuantificó usando un luminómetro (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.). Los niveles de expresión se expresan como ng de mSEAP por lisado según una curva patrón de fosfatasa alcalina de placenta humana y se normalizan por μ g de proteína usando un ensayo NanoOrange® de cuantificación de proteínas (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.).

40 **1.6. Análisis ELISA de VEGF**

El análisis cuantitativo de los niveles de VEGF se realizó usando un kit de inmunoensayo de VEGF de ratón (Quantikine, R&D Systems). Cinco meses después de la inyección de VAA9ac-VEGF, los animales se anestesiaron profundamente con pentobarbital y se sacrificaron mediante decapitación. Las muestras de tejido se extrajeron y se congelaron a -80 °C. Los tejidos se homogeneizaron en tampón TSAI (Tris-HCl 50 mM, NaCl 250mM, EDTA 5 mM, NP40 0,1 %, DTT 5mM, NaF 10 mM) que contiene un cóctel de inhibidor de proteasa (Complete mini, Roche) usando un mortero de motor para cerebro y médula espinal y un Ultra-Turrax par corazón e hígado. Los lisados se centrifugaron después durante 20 min a 4 °C, se recogieron los sobrenadantes y se realizó el ELISA siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración de proteína se evaluó usando el BCA Protein Assay Kit (Pierce).

2. Inyecciones intramusculares de VAA que expresan mSEAP

50 Los VAA1mc, VAA9mc, VAA1ac, o VAA9ac que codifican mSEAP se inyectaron tanto en tríceps como en músculos gemelos a ratones C57B16 de un día de vida (de $8 \cdot 10^{+9}$ a $2 \cdot 10^{+10}$ genomas virales por ratón). Los músculos, cerebros y médulas espinales inyectados se extrajeron a los uno, tres o siete días de la inyección y la expresión de mSEAP se determinó usando histoquímica (véanse materiales y métodos).

La expresión de mSEAP se detectó en los músculos de 3 días después de la inyección de cada serotipo de VAA, bien convencionales o bien autocomplementarios (excepto con VAA9mc), aumentando drásticamente el nivel de expresión con el tiempo (figura 1A).

- 5 También se detectó expresión transgénica en el SNC tras la inyección i.m. de VAA9ac y, de forma interesante, la expresión se detectó específicamente en las células del plexo coroideo y del epéndimo (figura 1B), que son un epitelio altamente especializado en la secreción y aclaramiento de numerosas proteínas y toxinas en el LCR {Redzic, 2005 n.º 38}. La expresión de mSEAP en el SNC se encontró ya a los 3 días de la inyección al usar VAA9 y los niveles de expresión volvieron a aumentar con el tiempo. Se encontró una expresión débil con VAA1ac, pero podría deberse a tinción inespecífica con la mSEAP endógena.
- 10 También se detectó una expresión transgénica débil en la médula espinal tras la inyección i.m. del vector VAA9. En este caso, la tinción de mSEAP era casi visible dentro y alrededor de los vasos sanguíneos del parénquima medular (figura 1C).

3- Inyecciones intraperitoneales de VAA que expresan mSEAP

- 15 Se inyectaron por vía intraperitoneal VAA1mc, VAA9mc, VAA1ac y VAA9ac en ratones C57B16 de un día de vida (100 µl, de 3.10^{+10} a 1.10^{+11} genomas virales por ratón) y se valoró la expresión transgénica en músculo o SNC a los 1, 3 o 7 días de la inyección. Se encontró una expresión de mSEAP tanto en las fibras musculares como en las células del plexo coroideo y del epéndimo ya a los 3 días tras la inyección de VAA9ac, que aumentó considerablemente a los 7 días tras la inyección (figura 2). También se detectó expresión transgénica dentro de los vasos sanguíneos, tanto en cerebro como a lo largo de la médula espinal.

20 **4- Expresión transgénica en el SNC tras la inyección periférica de VAA-GFP**

Para determinar si la expresión de mSEAP observada en el plexo coroideo (tras la intraperitoneal i.p. e i.m. de VAA9ac recombinante) resultaba de la difusión de proteína o de la expresión transgénica dentro de las células del plexo coroideo, analizamos el patrón de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP), una proteína no segregada, 7 días después de la inyección periférica del vector de VAA correspondiente en ratones neonatos.

- 25 Tras la inyección i.p. (100 µl, 3.10^{+10} gv) e i.m. (5 µl por músculo, 8.10^{+9} gv) de VAA9-GFP, se observaron células inmunorreactivas a GFP tanto en las células del plexo coroideo como del epéndimo (fig. 3A, B y fig. 4A). De manera importante, observamos una fuerte expresión de GFP en numerosas células cerebrales localizadas, por ejemplo, en el hipocampo (fig. 3A, C), en la corteza entorrinal (fig. 3D) o en el tabique (fig. 4B). Se observó un número mayor de células inmunopositivas para GFP tras la inyección i.p que tras la inyección i.m, pero esto podría deberse al mayor título de vector usado en el procedimiento de la inyección i.p. Se necesitan datos adicionales para confirmar esta observación.
- 30

Se encontró una expresión de GFP particularmente alta en el hipocampo, debida probablemente a su localización cerca de los ventrículos cerebrales y a la difusión preferente de los vectores a través de la barrera hematoencefálica al nivel del plexo coroideo. De forma interesante, también se observaron células neuronales altamente transducidas en la corteza entorrinal, probablemente como resultado del transporte axónico retrógrado de los vectores de VAA desde el hipocampo. La presencia de células neuronales transducidas en el tabique también podría resultar de mecanismos similares de transporte axónico.

35

La expresión de GFP se detectó adicionalmente en los vasos sanguíneos a lo largo del cerebro y la médula espinal.

- 40 También se observaron numerosas fibras positivas para GFP en las células neuronales que inervan la materia gris medular (que se identificaron usando inmunotinción con GFP/NeuN). Estas fibras se originan probablemente a partir del ganglio de la raíz posterior que también apareció como fuertemente positivo (fig. 3E y 4C).

5- Inyecciones intravenosas de VAA que expresan GFP en ratones neonatos:

- 45 Se inyectó un vector de VAA9ac que expresa GFP por vía intravenosa en la vena temporal de ratones C57B16 de un día de vida (50 µl, $1,5.10^{+10}$ genomas virales por ratón) y se analizó la expresión transgénica a los 7 días de la inyección usando inmunohistoquímica frente a GFP.

El análisis inmunohistoquímico de las secciones de tejido cerebral reveló una fuerte expresión de GFP tanto en las células del plexo coroideo como del epéndimo (fig. 5A), y en los vasos sanguíneos cerebrales. De nuevo, encontramos expresión de GFP dentro de las células cerebrales, tanto con un fenotipo neuronal como con un fenotipo glial, situadas, por ejemplo, en el hipocampo o en la corteza entorrinal (fig. 5B-D).

- 50 Se obtuvieron resultados similares cuando se inyectaron por vía intravenosa vectores de VAA9mc-GFP en ratones neonatos de un día. En este caso, el análisis de la expresión se realizó a las tres semanas después de las inyecciones de VAA, que es el tiempo necesario para la conversión del genoma en ADN bicatenario.

6- Actividad mSEAP en tejidos de ratones adultos inyectados por vía i.v. con VAA:

La formación de la BHE es incompleta en los ratones neonatos. Por tanto, investigamos si la transferencia génica en el SNC de los ratones recién nacidos estaba conservada en los adultos. Se inyectaron diferentes serotipos (VAA1 y VAA9) de VAA que expresan mSEAP en la vena caudal de ratones adultos con dosis aumentadas de vector (de 3x10¹¹ a 2x10¹² de gv en 500 µl por ratón) y la dosis de 1x10¹² de VAA9ac-mSEAP resultó en la transducción eficaz de células epiteliales de los vasos cerebrales y del plexo coroideo. La eficacia de la transducción celular volvió a ser mayor para los vectores bicatenarios que para los vectores convencionales de VAA9mc. Para confirmar la eficacia de este método para la transferencia génica sistémica en el SNC del ratón adulto, se inyectaron vectores mc y ac de VAA1 y VAA9 que codifican mSEAP en la vena caudal de ratones adultos (3 x 10¹¹ o 1x10¹² gv por ratón) y la actividad mSEAP se analizó 4 semanas más tarde, mediante análisis bioquímico. Hubo una gran tendencia para una dispensación génica sistémica superior en todos los tejidos de ratones inyectados por vía i.v. con vector VAA9ac (incluyendo órganos no nerviosos como el corazón, músculo esquelético, hígado y riñón) aunque también se encontró que la actividad mSEAP estaba aumentada en el SNC con respecto a lo que se había observado entre ratones inyectados con VAA1. En comparación con los otros serotipos, se encontró un aumento de 4 a 9 veces en la actividad mSEAP media en el cerebro y un aumento de 2 a 17 veces en la médula espinal. También se encontró que la actividad mSEAP fue hasta 33 veces, 70 veces, 9 veces y 7 veces mayor en el corazón, tríceps, hígado y riñón de animales inyectados con VAA9ac en comparación con los inyectados con los otros vectores (tabla 1). De forma inesperada, la actividad mSEAP fue mayor en la médula espinal de los ratones inyectados con VAA1mc en comparación con los ratones inyectados con VAA9mc (y posiblemente en la de los ratones inyectados con VAA1ac, aunque estadísticamente no significativa).

En su conjunto, estos resultados demostraron que la dispensación i.v. de vectores VAA9ac puede mediar la transferencia génica en el SNC de ratones adultos, en los cuales, la BHE está completamente formada. Esto sugiere la eficacia de la dispensación periférica de VAA9 y VAA1 para mediar la producción de una proteína terapéutica en el SNC.

7- Expresión a largo plazo de la dispensación de VEGF en el SNC mediada por VAA

Además de la dispensación de transgenes indicadores, también ensayamos la eficacia y duración de la transferencia sistémica mediada por VAA9 de un gen terapéutico, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Algunos estudios dirigidos a la dispensación de VEGF a las MN demostraron de forma eficaz una mejoría del fenotipo de ELA en los modelos animales 15, 19. Se inyectaron 5x10⁹ gv de un vector de VAA9ac que codificaba VEGF bajo el control del promotor ubicuo de fosfoglicerato cinasa (VAA9ac-VEGF) en la vena temporal de ratones de un día de vida. Se realizó un análisis de ELISA a los 5 meses tras la inyección i.v. del vector para cuantificar los niveles de proteína VEGF en muestras de SNC y tejido no nervioso de los ratones VAA9ac-VEGF y ratones de control inyectados. El análisis mostró un aumento global de los niveles de VEGF en numerosos tejidos de los ratones inyectados con VAA9ac-VEGF, incluyendo la médula espinal (fig. 6). Estos resultados sugieren una expresión eficaz y a largo plazo del transgén de VEGF en todos los tejidos de ratón, incluyendo SNC, tras la transferencia génica de VEGF mediada por VAA9ac en ratones.

Que sepamos, estos resultados muestran, por primera vez, que puede obtenerse expresión transgénica eficaz en células del plexo coroideo o del epéndimo, tras la administración periférica de un vector de transferencia génica. Estos resultados también representan la primera demostración de que pueden segregarse proteínas recombinantes dentro del líquido cefalorraquídeo tras la administración periférica de un vector de transferencia génica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de VAA que codifica una proteína terapéutica para uso en un método para tratar un trastorno del SNC en un sujeto mediante la administración periférica de dicho vector de VAA a dicho sujeto, permitiendo dicha administración la infección de células secretoras de líquido cefalorraquídeo del cerebro y la posterior secreción de la proteína terapéutica dentro del líquido cefalorraquídeo, en donde dicho vector de VAA es un vector de serotipo humano VAA9, y en donde el vector de VAA es un vector de VAA bicatenario autocomplementario.
- 10 2. Un vector de VAA que codifica una proteína terapéutica para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno del SNC a través de la secreción de dicha proteína terapéutica dentro del líquido cefalorraquídeo tras la inyección periférica de dicho vector en donde dicho vector de VAA es un vector de serotipo humano VAA9, y en donde el vector de VAA es un vector de VAA bicatenario autocomplementario.
- 15 3. Un vector de VAA para uso en el tratamiento de un trastorno del SNC en un sujeto mediante la secreción de una proteína dentro del líquido cefalorraquídeo de un sujeto mediante la inyección periférica de dicho vector en condiciones que permiten la infección de células secretoras de líquido cefalorraquídeo del cerebro, particularmente las células epiteliales del plexo coroideo y/o del epéndimo y/o una membrana meníngea en donde dicho vector de VAA es un vector de serotipo humano VAA9, y en donde el vector de VAA es un vector de VAA bicatenario autocomplementario.
- 20 4. El vector de VAA para uso de las reivindicaciones 1 o 3 o el vector de la reivindicación 2 para la fabricación de un medicamento en donde dicha inyección periférica comprende la inyección intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.), intraarterial, subcutánea, transdérmica o intravenosa (i.v.).
- 25 5. El vector de VAA para el uso de las reivindicaciones 1, 3 o 4, o el vector de la reivindicación 2 para la fabricación de un medicamento, en donde el vector de VAA es un vector de VAA pseudotipificado.
6. El vector de VAA para el uso de las reivindicaciones 1, 3, 4 o 5, o el vector de la reivindicación 2 para la fabricación de un medicamento en donde el vector de VAA comprende un genoma de VAA de replicación defectuosa que carece de secuencias virales codificantes de Rep y Cap funcionales.
- 30 7. El vector de VAA para el uso de las reivindicaciones 1, 3-6 o el vector de la reivindicación 2 para la fabricación de un medicamento, en donde la proteína terapéutica se selecciona de entre factores de crecimiento, citocinas, hormonas, neurotransmisores, enzimas, factores antiapoptóticos, factores angiogénicos y cualquier proteína que se sabe que está mutada en trastornos patológicos tales como la proteína de "supervivencia de la motoneurona" (SMN).
- 35 8. El vector de VAA para el uso de las reivindicaciones 1, 3-7, o el vector de la reivindicación 2 para la fabricación de un medicamento en donde el trastorno del SNC se selecciona de entre enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neuromusculares, enfermedades lisosómicas, traumatismos, lesiones de la médula ósea, cánceres del sistema nervioso, enfermedades desmielinizantes, enfermedades autoinmunes del sistema nervioso, síndromes neurotóxicos, trastornos del sueño.
- 40 9. El vector de VAA para el uso de las reivindicaciones 1, 3-8, o el vector de la reivindicación 2 para la fabricación de un medicamento, en donde el vector es un vector de VAA pseudotipificado que comprende un genoma procedente de VAA2 empaquetado en una cápside procedente de VAA9.
10. El vector de VAA para el uso de las reivindicaciones 1, 3-9, o el vector de la reivindicación 2 para la fabricación de un medicamento en donde la expresión de la proteína terapéutica en el vector está controlada por un promotor ubicuo, regulado y/o específico del tejido.
- 45 11. Un vector de serotipo humano VAA9 bicatenario autocomplementario que codifica una proteína terapéutica, en donde la proteína terapéutica es la proteína SMN.

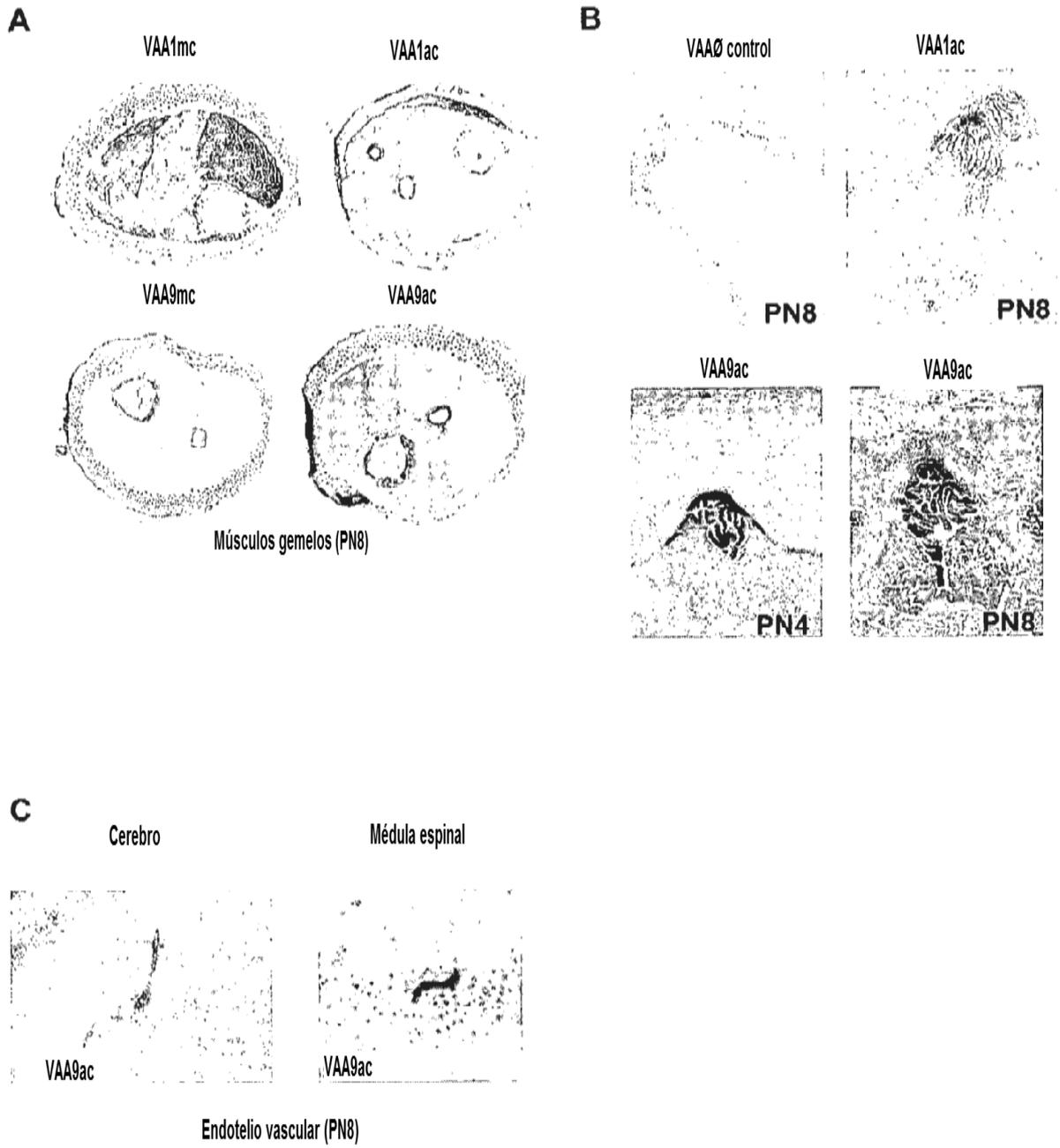
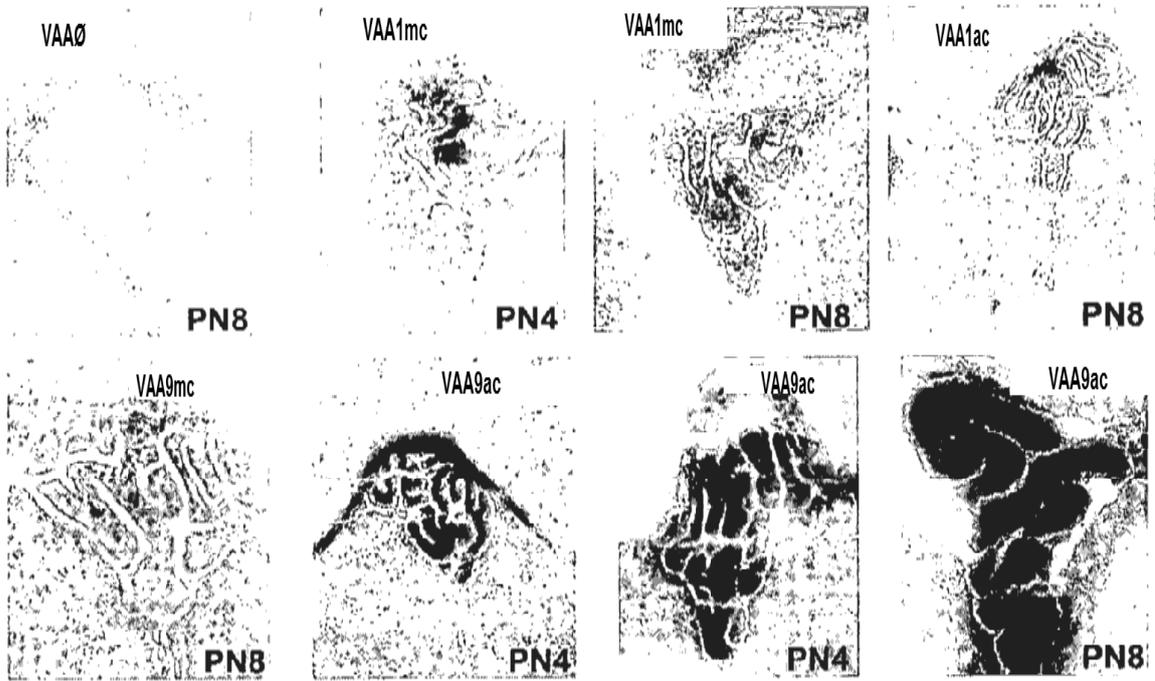


Figura 1



D

Figura 1 (continuación)

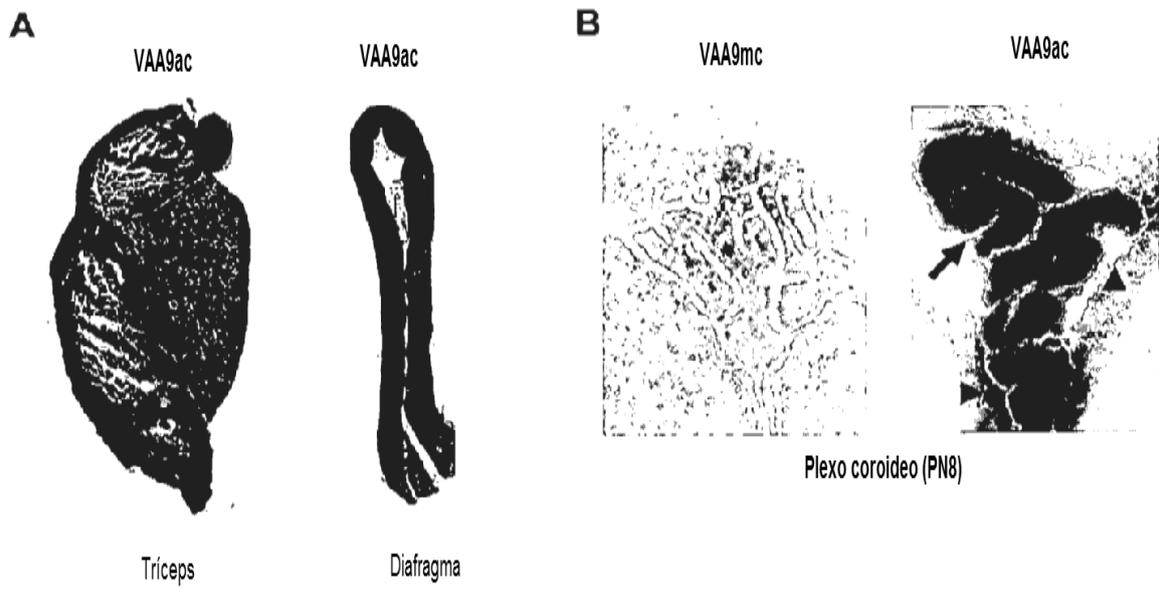


Figura 2

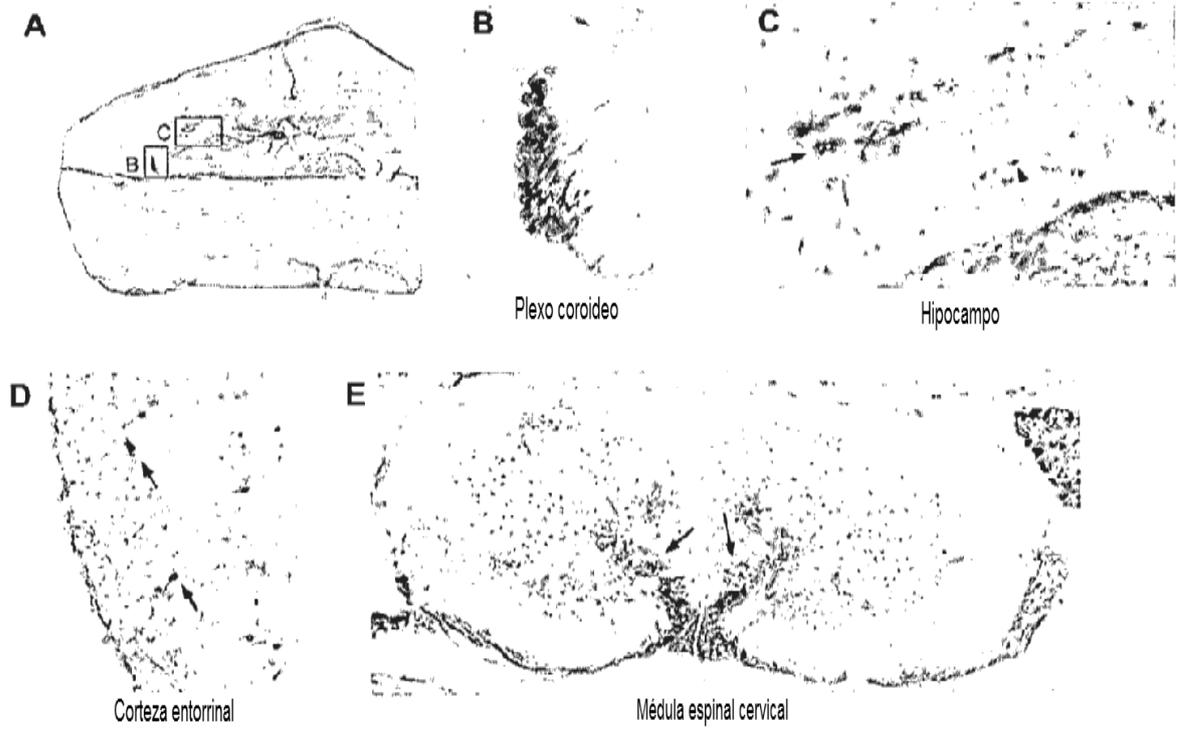


Figura 3

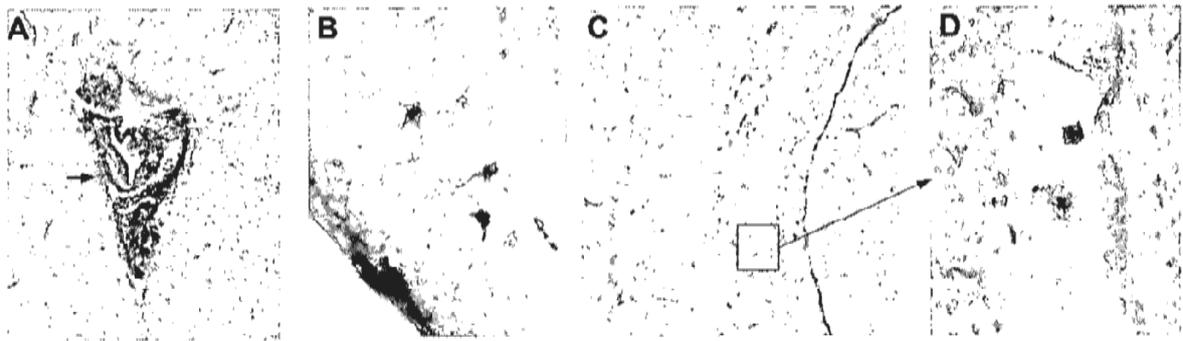
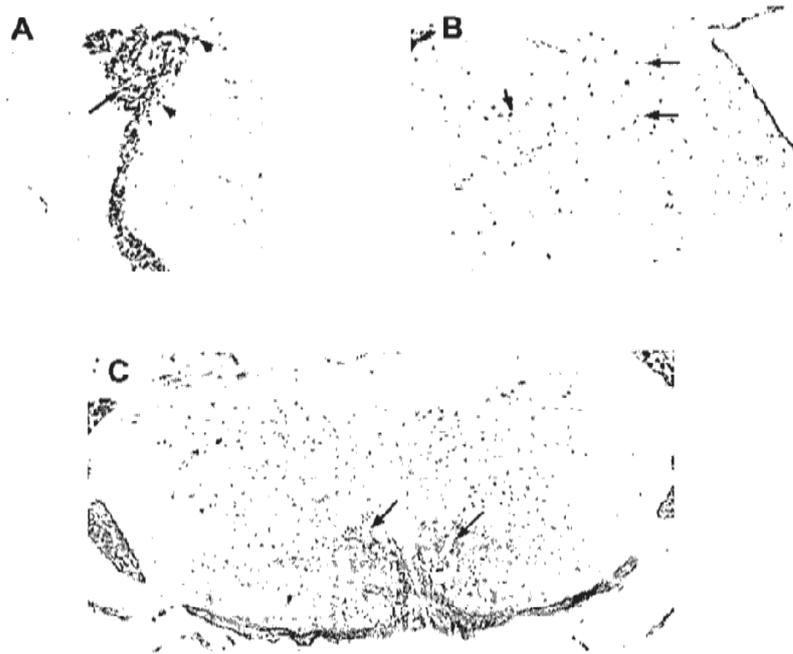


Figura 5