

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 852**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00	(2006.01)
C12N 9/00	(2006.01)
C12N 9/78	(2006.01)
C12N 9/88	(2006.01)
C12N 15/867	(2006.01)
C12N 9/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2009 PCT/GB2009/002645**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.05.2010 WO10055290**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2009 E 09760254 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2361309**

54 Título: **Método**

30 Prioridad:

11.11.2008 GB 0820628
01.10.2009 GB 0917241

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.01.2017

73 Titular/es:

OXFORD BIOMEDICA (UK) LIMITED (100.0%)
Medawar Centre Robert Robinson Avenue Oxford
Science Park
Oxford OX4 4GA, GB

72 Inventor/es:

KINGSMAN, SUSAN;
RALPH, SCOTT;
MITROPHANOUS, KYRIACOS;
PALFI, STÉPHANE y
JARRAYA, BÉCHIR

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 596 852 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

Método

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a terapia génica de remplazo de dopamina para su uso en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

10 Antecedentes de la invención

Se cree que el remplazo dopaminérgico es la estrategia terapéutica más eficaz para la enfermedad de Parkinson (PD) actualmente en uso. Inicialmente, los pacientes con PD experimentan excelentes beneficios del tratamiento farmacológico con el precursor de dopamina L-Dopa. Sin embargo, con ingesta crónica de L-Dopa, la mayoría de pacientes con PD presentan fluctuaciones en la respuesta motora al fármaco, y desarrollan movimientos anormales involuntarios llamados disquinesias. En muchos casos, los pacientes oscilan entre períodos con fármaco activo, que se complican por disquinesias incapacitantes, y períodos sin fármaco en que los pacientes son acinéticos. Se cree que las disquinesias y las fluctuaciones motoras están al menos parcialmente causadas por la ingesta oral intermitente de L-Dopa y posterior estimulación pulsátil de receptores de dopamina en el estriado. Este concepto sugiere que el suministro continuo de dopamina puede evitar las disquinesias, restaurando el tono dopaminérgico en el estriado.

Un modo de conseguir una producción continua de dopamina en el estriado es usar injerto celular de tejido fetal o células madre. Sin embargo, el injerto de células madre en la sustancia negra ha cumplido con éxito limitado (Lindvall O. y Bjorklund A. (2004) *NeuroRx* 1: 382-393; Kordower J.H. *et al.* (2008) *Nature Med* 14: 504-506; Li J-Y *et al.* (2008) *Nature Med* 14: 501-503; Braak H. y Del Tredici K. (2008) *Nature Med* 14: 483-485). Existe, por lo tanto, una necesidad de una terapia para la enfermedad de Parkinson que restaure o mantenga el tono dopaminérgico en el estriado, pero que evite los problemas asociados con los enfoques de tejido fetal/células madre.

El segundo tipo de complicación asociado con el tratamiento oral con L-Dopa es la alteración cognitiva. PD se caracteriza principalmente por reducción de dopamina en el estriado dorsal (estriado "motor"), mientras que la función de la dopamina en el estriado ventral (estriado "cognitivo") y también la corteza prefrontal está relativamente intacta o incluso regulada positivamente. Como el tratamiento farmacológico con L-Dopa estimula todos los sistemas dopaminérgicos cerebrales, "sobredosifica" de forma crítica el estriado ventral intacto y la corteza, y altera las funciones cognitivas asociadas. Este mecanismo también podría ser responsable de otros efectos secundarios del tratamiento sistémico con L-Dopa, tal como síntomas psicóticos o ludopatía. Por tanto, un reto principal en PD es restaurar los niveles de dopamina en el estriado tanto tónico como local al estriado dorsal.

Jarraya *et al.* Describen la eficacia funcional de administración al estriado de Lenti-TH-AADC-CH1 en diferentes modelos de primates no humanos de degeneración nigroestriada (*ACTA NEUROCHIRURGICA*; *The European Journal of Neurosurgery*; vol: 150(9):933-1012).

Los presentes inventores han usado una estrategia de terapia génica de remplazo de dopamina y demostraron su eficacia bioquímica y funcional en un modelo de primate no humano de PD.

Sorprendentemente, los datos *in vivo* en primates mostraron muchas ventajas inesperadas de remplazo de dopamina por terapia génica, que no podrían haberse predicho a partir de los datos del modelo *in vitro* o de roedor, como se expone a continuación:

50 (i) la terapia génica de remplazo de dopamina restaura los niveles tanto tónico como local de dopamina en el estriado al estriado dorsal. A diferencia del tratamiento con L-Dopa, la terapia génica de remplazo de dopamina aumenta la dopamina en el estriado dorsal ("motor"), con sobredosificación del estriado ventral ("cognitivo") o la corteza prefrontal. Esto evita la alteración de las funciones cognitivas asociada con el estriado ventral.

55 (ii) la terapia génica de remplazo de dopamina previene las disquinesias restaurando el tono dopaminérgico en el estriado, evitando al mismo tiempo los problemas asociados con el injerto de células madre. Los presentes inventores han descubierto que uno de los factores clave en el éxito de cualquier estrategia e remplazo de dopamina es la ausencia del transportador activo de dopamina (DAT) que se expresa en los terminales dopaminérgicos nigrales que inervan el estriado. Las estrategias de células madre/tejido fetal habitualmente implican injertar células dopaminérgicas en la sustancia negra del paciente. Los niveles de DAT son relativamente altos en el tejido injertado. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, los presentes inventores predicen que la presencia de DAT secuestra la dopamina extracelular producida por las células injertadas, reduciendo de ese modo la capacidad de la terapia de restaurar el tono dopaminérgico. En el método de terapia génica de remplazo de dopamina usado en la presente invención, el vector suministra los genes implicados en la síntesis de dopamina al estriado. Como la cantidad de terminales dopaminérgicos y por tanto los niveles de DAT en el estriado están reducidos en pacientes con enfermedad de Parkinson, la producción de dopamina por tanto

es más eficaz;

(iii) la estrategia de terapia génica de remplazo de dopamina usada en la presente invención corrige la disfunción motora asociada con la enfermedad de Parkinson. Se descubrió que la terapia normaliza la sobreactividad anormal de los núcleos de salida tales como el globo pálido interno (GPi). El análisis del patrón de disparo neuronal en el GPi reveló que la estrategia de terapia génica de remplazo de dopamina usada en la presente invención disminuía la cantidad de repuntes por ráfaga y la cantidad de eventos de ráfaga hasta niveles similares a los observados en controles no PD. La estrategia de terapia génica de remplazo de dopamina usada en la presente invención también normalizaba la actividad metabólica del núcleo subtalámico (STN). La hiperactividad neuronal en el STN es una característica patofisiológica de PD que causa un aumento en la actividad metabólica detectable en sujetos con PD;

(iv) la estrategia de terapia génica de remplazo de dopamina usada en la presente invención causa niveles subfisiológicos de dopamina producidos en el estriado, sin embargo, esto era suficiente para restaurar el tono dopaminérgico, corregir las deficiencias motoras, prevenir las disquinesias inducidas por fármaco y restaurar la fisiología normal de los núcleos de salida de los ganglios basales clave; y

(v) la estrategia de remplazo génico de dopamina usada en la presente invención puede mejorar las disquinesias asociadas con la administración oral de L-Dopa. Esto significa que el enfoque basado en genes puede proporcionar eficacia terapéutica en una paciente con PD que ya ha desarrollado disquinesias a partir de un tratamiento a largo plazo con L-Dopa y también puede revertir el mecanismo fisiológico de las disquinesias y por tanto prevenir la aparición posterior después de terapia con L-Dopa.

Sumario de aspectos de la presente invención

La presente invención proporciona un sistema de vector lentivírico que comprende un único vector que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican la tirosina hidroxilasa (TH), la aminoácido DOPA descarboxilasa (AADC) y la GTP-ciclohidrolasa I (CH1) para su uso en el tratamiento y/o prevención de disquinesias asociadas con administración oral de L-Dopa en un sujeto con enfermedad de Parkinson.

El sistema de vector puede tener una o más de las siguientes características:

- (i) cuando el sistema de vector comprende un casete tricistrónico, el orden de los genes en el casete tricistrónico es TH-AADC-CH1
- (ii) al menos uno de los codones potenciales de inicio ATG en gag se cambia a ATTG;
- (iii) se inserta un casete de expresión Neo cadena abajo de gag; y
- (iv) cuando el sistema de vector comprende un casete tricistrónico, se inserta un WPRE en el extremo 3' del casete tricistrónico para potenciar la expresión

Aspectos adicionales de la presente descripción

La presente descripción proporciona un método para tratar y/o prevenir la enfermedad de Parkinson en un sujeto sin causar alteración cognitiva usando terapia génica de remplazo de dopamina para mantener o restaurar el tono dopaminérgico fisiológico constante tanto en el estriado dorsal como en el estriado ventral del sujeto.

La presente descripción proporciona un método para normalizar la actividad eléctrica neuronal en los ganglios basales y/o el núcleo subtalámico en un sujeto con enfermedad de Parkinson por la administración de un sistema de vector para terapia génica de remplazo de dopamina al sujeto.

La administración del sistema vector puede reducir, normalizar o prevenir el aumento asociado a PD en la cantidad de repuntes por ráfaga y/o la cantidad de eventos de ráfaga en el patrón de disparo neuronal en el GPi.

La presente descripción proporciona un método para tratar y/o prevenir las disquinesias asociadas con administración oral de L-Dopa en un sujeto con enfermedad de Parkinson por la administración de un sistema de vector para terapia génica de remplazo de dopamina al sujeto.

La presente descripción proporciona un método para reducir la dosis diaria de L-Dopa requerida para mantener la actividad locomotora.

La presente descripción también proporciona un sistema de vector para:

- (i) aumentar la eficacia de la terapia génica de remplazo de dopamina para tratar y/o prevenir la enfermedad de Parkinson en un sujeto evitando el secuestro de dopamina por el transportador de dopamina (DAT);
- (ii) tratar y/o prevenir la enfermedad de Parkinson en un sujeto sin causar alteración cognitiva usando terapia génica de remplazo de dopamina para mantener o restaurar el tono dopaminérgico fisiológico constante tanto en el estriado dorsal como en el estriado ventral del sujeto.

(iii) normalizar la actividad eléctrica neuronal en los ganglios basales y/o el núcleo subtalámico en un sujeto con enfermedad de Parkinson.

(iv) tratar y/o prevenir las disquinesias asociadas con administración oral de L-Dopa en un sujeto con enfermedad de Parkinson por la administración de un sistema de vector para terapia génica de remplazo de dopamina al sujeto.

La presente descripción también proporciona el uso de un sistema de vector como se define en ese documento en la fabricación de una composición farmacéutica para:

(i) aumentar la eficacia de la terapia génica de remplazo de dopamina para tratar y/o prevenir la enfermedad de Parkinson en un sujeto evitando el secuestro de dopamina extracelular por el transportador de dopamina (DAT);

(ii) tratar y/o prevenir la enfermedad de Parkinson en un sujeto sin causar alteración cognitiva usando terapia génica de remplazo de dopamina para mantener o restaurar el tono dopaminérgico fisiológico constante tanto en el estriado dorsal como en el estriado ventral del sujeto.

(iii) normalizar la actividad eléctrica neuronal en los ganglios basales y/o el núcleo subtalámico en un sujeto con enfermedad de Parkinson.

(iv) tratar y/o prevenir las disquinesias asociadas con administración de L-Dopa en un sujeto con enfermedad de Parkinson por la administración de un sistema de vector para terapia génica de remplazo de dopamina al sujeto.

La presente descripción también proporciona un método para aumentar la eficacia de la terapia génica de remplazo de dopamina para tratar y/o prevenir la enfermedad de Parkinson en un sujeto que comprende la etapa de evitar el secuestro de dopamina extracelular por el transportador de dopamina (DAT).

En el método de terapia génica de remplazo de dopamina, por ejemplo, el secuestro de dopamina extracelular se evita por la administración del sistema de vector a un tejido que carece de expresión significativa de DAT, tal como el estriado parkinsoniano.

Como alternativa o adicionalmente, el secuestro de dopamina puede evitarse por la inhibición de la expresión y/o actividad de DAT en el sujeto.

En relación con los aspectos mencionados anteriormente, el sistema de vector usado para la terapia génica de remplazo de dopamina puede comprender secuencias de ácido nucleico que codifican TH, AADC y CH1, y tienen una o más de las siguientes características:

(i) al menos una de las secuencias de ácido nucleico carece de una marca N-terminal;

(ii) al menos una de las secuencias de ácido nucleico tiene los codones optimizados;

(iii) cuando el sistema de vector comprende un casete tricistrónico, el orden de los genes en el casete tricistrónico es TH-AADC-CH1

(iv) al menos uno de los codones potenciales de inicio ATG en gag se cambia a ATTG;

(v) se inserta un casete de expresión Neo cadena abajo de gag; y

(vi) cuando el sistema de vector comprende un casete tricistrónico, se inserta un WPRE en el extremo 3' del casete tricistrónico para potenciar la expresión.

El sistema de vector usado para la terapia génica de remplazo de dopamina puede comprender un único vector que tiene secuencias de ácido nucleico que codifican TH, AADC y CH1.

El sistema de vector puede ser, por ejemplo, un sistema de vector lentivírico o de virus adenoasociado.

Descripción de las figuras

Figura 1: Lenti TH-AADC-CH1 corrige el parkinsonismo.

Los macacos tratados con MPTP (línea negra, n=18) estaban significativamente alterados en comparación con su estado pre-MPTP de control, presentando un parkinsonismo severo (a, b). Tan pronto como dos semanas después de la inyección lentivírica, los animales que recibieron Lenti-TH-AADC-CH1 que codifica TH, AADC y CH1 (líneas azules, n = 6 hasta s8 después n = 3 hasta M9) obtuvieron una mejora significativa en la aquinesia (b) en comparación con los animales MPTP que recibieron Lenti-lacZ (líneas rojas, n = 6 hasta s8 después n = 3 hasta M9) o sin inyección de virus (líneas grises, n = 6 hasta s8 después n = 3 hasta M9). El beneficio en el comportamiento estuvo sostenido hasta 9 meses después de la inyección de Lenti-TH-AADC-CH1 en comparación con animales MPTP y de control de MPTP-Lenti-lacZ (a, b). Un animal MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1 se siguió durante 30 meses después de la inyección de lentivirus, y demostró corrección motora estable. (s, semana después de la transferencia génica; M, mes después de la transferencia génica) **p< 0,01 respecto al estado de lesión pre-MPTP normal, *p< 0,05 respecto a animales MPTP-Lenti-lacZ y a animales MPTP-largo plazo. Todos los datos se expresaron como la media ± e.t.m.

Figura 2: expresión de transgenes después de suministro al estriado de vector vírico Lenti-TH-AADC-CH1.

A bajo aumento (A-C, E-G, I-K), las inmunorreactividades a TH, AADC y CH1 estaban muy reducidas,

especialmente en el aspecto dorsal del estriado de animales MPTP-Lenti-lacZ (B, F, J) en comparación con animales no lesionados normales (A, E, I). En contraste, se observaron aumentos marcados en la inmunorreactividad a TH (C), AADC (G) y CH1 (K) en las cercanías de la trayectoria de la aguja en el putamen comisural y post-comisural de ratones infundidos con MPTP-Lenti-TH-AADC-CH12. Las fotomicrografías de mayor aumento de áreas infundidas con Lenti-TH-AADC-CH1 muestran fibras inmunorreactivas en todo el neurópilo del putamen y neuronas positivas para TH, AADC y CH1 (D, H, L). Las flechas muestran las trayectorias de aguja. El estriado se ha delineado en la figura F, J, K, (P, putamen; Cd, núcleo caudado; la escala de barra en A se aplica a todas las figuras excepto D, H, L; la escala de barra en D se aplica a las figuras D, H y L).

Figura 3. Lenti-TH-AADC-CH1 restaura el tono dopaminérgico en el estriado.

a Dopamina de tejido completo *post-mortem* [DA]_{wt} Representación diagramática de las concentraciones de dopamina medidas en perforaciones recogidas del putamen. Las muestras se recogieron de macacos a los que se había inyectado Lenti-TH-AADC-CH1 (barras rojas) y a los que se había inyectado Lenti-TH-AADC-CH1 (barras azules) MPTP *post-mortem*. * Representa un aumento significativo en los niveles de dopamina en comparación con controles de MPTP-Lenti-lacZ ($p < 0,05$, $n = 3$).

b Dopamina extracelular *in vivo* [DA]_{ec} Niveles de dopamina extracelular en primates normales (no lesionados, sin transferencia génica, barra blanca) y en primates MPTP que recibieron Lenti-TH-AADC-CH1 (MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1, barra azul), Lenti-lacZ (MPTP-Lenti-lacZ, barra roja) o sin tratamiento (MPTP-largo plazo, barra gris). Las sondas de microdiálisis se colocaron en el putamen post-comisural para cada animal como se demuestra por las imágenes de MRI T2* *in vivo* después del procedimiento de microdiálisis. Los niveles basales de dopamina estaban reducidos hasta el 26 % de los niveles normales de dopamina en los animales MPTP, lo que indica una reducción severa de dopamina en este animal. Lenti-TH-AADC-CH1, pero no Lenti-lacZ, aumentaba significativamente los niveles de dopamina extracelulares en el estriado [DA]_{ec} en los animales tratados (respectivamente el 60 % y el 23 % de los primates normales, post-hoc MW $p < 0,05$).

c Después de exposición a L-Dopa, los niveles de dopamina extracelular se aumentaron 2,25 veces en el animal MPTP- Lenti-THAADC-CH1 en comparación con 1,17 veces con el animal MPTP-largo plazo, lo que sugiere que la transferencia del gen AADC puede permitir una sinergia entre L-Dopa y Lenti-TH-AADC-CH1.

d Después de exposición a L-Dopa, los niveles de L-Dopa extracelular en el estriado se aumentaron solamente en el grupo de MPTP-largo plazo y MPTP-Lenti-LacZ después de inyección de L-Dopa, lo que sugiere que la mayor parte de la L-Dopa inyectada se convertía en DA en animales normales y MPTP- Lenti-TH-AADC-CH1.

Figura 4: Lenti-TH-AADC-CH1 restaura el funcionamiento normal de los ganglios basales

a, b, c, Registro unitario (>20 neuronas GPi) en animales normales, MPTO y MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1.

a Ilustración de la actividad neuronal individual en reposo basal de 2 segundos dentro de la salida de los ganglios basales (GPi). Obsérvese un aumento significativo en la tasa media de disparo de neuronas GPi, y la mayor actividad de ráfaga, en macacos MPTP no tratados vírgenes al fármaco en comparación con los controles. La terapia génica lentivírica de dopamina reducía significativamente las altas tasas anormales de disparo en neuronas GPi MPTP, restaurando los valores normales de tasa de disparo en esta estructura b y la tasa normal de ráfaga c.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecto a animales no lesionados normales
$p < 0,05$, ## $p < 0,01$ respecto a animales MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1

d, e, f, g Normalización de la actividad metabólica dentro del núcleo subtalámico (STN) después de inyección de Lenti-TH-AADC-CH1 en el estriado motor de un primate tratado MPTP, como se evidencia por imágenes 3D con [¹⁴C]2-desoxiglucosa (2-DG).

d El STN de la derecha y la izquierda se segmentaron manualmente sobre las secciones cerebrales teñidas con Nissl después de reconstrucción 3D (10 a 13 secciones por STN). Estos dos volúmenes de interés (VOI) se mapearon directamente en el volumen corregistrado autorradiográfico correspondiente e.

f Imágenes autorradiográficas de hemisferios izquierdos individuales tomadas al mismo nivel del STN de un primate de control, un primate tratado MPTP y un primate tratado MPTP al que se inyectó Lenti-TH-AADC-CH1 52 semanas antes del estudio de imágenes. Las intensidades de la señal están codificadas por colores de acuerdo con la misma escala cuantitativa de uso de glucosa (derecha). g Obsérvese que la actividad hipermetabólica de STN, observada dentro del primate tratado MPTP (+28,6 % del control normal), se normalizó por una única dosis de Lenti-TH-AADC-CH1 (+ 10,9 % del control normal).

Figura 5: Lenti-TH-AADC-CH1 previene la disquinesia

a Lenti-TH-AADC-CH1 no induce disquinesia sin fármacos. Aunque la dopamina mediada por Lenti-TH-AADC-CH1 corrigió el comportamiento motor al mismo nivel que el obtenido por L-Dopa sistémica (Figura S12), no indujo disquinesia a largo plazo (9 meses).

b Lenti-TH-AADC-CH1 previene la disquinesia inducida por L-Dopa. Usando manipulación farmacológica del sistema dopaminérgico, estudiamos la interacción entre los niveles endógenos de dopamina y dopamina exógena (L-Dopa). La administración sistémica aguda de L-Dopa inducía movimientos disquinésicos tales como corea y distonía, en animales MPTP y MPTP-Lenti-lacZ vírgenes al fármaco. En contraste, los animales no lesionados normales, como animales MPTP Lenti-TH-AADC-CH1, no mostraban ninguna evidencia de movimientos disquinésicos.

Figura 6: Producción de dopamina lentivírica *in vitro* pONY8.1TSIN fue el vector usado en el estudio previo en ratas (Azzouz *et al.* (2002) J. Neurosci. 22: 10302-10312). El nuevo vector pONY8.9.4TY (Lenti-TH-AADC-CH1) usado en el presente estudio difiere del anterior en que tiene los genes con codones optimizados, no tiene marcas peptídicas N-terminales y el orden de los genes se ha cambiado salvo que las secuencias IRES (recuadros bloqueados) usadas siguen igual. Además, la estructura del vector contiene un gen neo 5' y un WPRE 3'. Además, todos los ATG en la región gag se mutaron en ATTG (recuadro con líneas diagonales gruesas). Estos cambios condujeron a un aumento en la producción de dopamina de 2 log en comparación *in vitro* en células HEK293T.

Figura 7: Actividad de erguirse

Los macacos tratados con MPTP (línea negra, n=18) estaban significativamente alterados en comparación con su estado pre-MPTP de control, presentando un parkinsonismo severo (a, b). Tan pronto como en dos semanas posteriores a la inyección de lentivirus, los animales que recibieron Lenti-TH-AADC-CH1 que codifica TH, AADC y CH1 (líneas azules, n = 6 hasta s8 después n = 3 hasta M9) obtuvieron una mejora significativa en la actividad de erguirse en comparación con los animales MPTP que recibieron Lenti-lacZ (líneas rojas, n = 6 hasta s8 después n = 3 hasta M9) o sin inyección de virus (líneas grises, n = 6 hasta s8 después n = 3 hasta M9). El beneficio del comportamiento estuvo sostenido hasta 9 meses después de la inyección de Lenti-TH-AADC-CH1 en comparación con animales de control MPTP y MPTP-Lenti-lacZ. Un animal MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1 se siguió 30 meses después de la inyección de lentivirus, y demostró corrección de erguirse estable.

s, semana después de transferencia génica

M, mes después de transferencia génica

**p< 0,01 respecto al estado de lesión normal pre-MPTP, *p< 0,05 respecto a animales MPTP-Lenti-lacZ y a animales MPTP-largo plazo. Todos los datos se expresan como la media \pm e.t.m.

Figura 8: Neurodegeneración en la *pars compacta* de la sustancia negra (SNpc) después de administración sistémica de neurotoxina MPTP

En comparación con macacos normales, los macacos MPTP tenían una pérdida celular profunda en su SNpc (violeta de cresilo), que indica una pérdida masiva de neuronas TH-ir dopaminérgicas (TH-ir), y provocando hipoactividad metabólica evaluada por imágenes funcionales de [¹⁴C]-2-desoxiglucosa ([¹⁴C]-2DG).

Figura 9: Inmunorreactividad del transportador de dopamina (DAT)

Fotomicrografías de inmunorreactividad del transportador de dopamina (DAT) que muestra una desnervación drástica y equivalente del estriado dorsolateral en animales MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1 y MPTP-Lenti-lacZ, en comparación con Cd: núcleo caudado; Put: Putamen.

Figura 10: Neurotropismo del vector lentivírico EIAV

Imágenes microscópicas confocales a través del putamen teñido para (a) NeuN, (b) β -Gal y (c) la imagen compuesta. Obsérvese las células de aspecto amarillo en c, lo que indica que esas células coexpresan β -Gal y NeuN, lo que indica que el lentivirus se ha transducido en estas neuronas.

Figura 11: Dopamina de tejido completo *post-mortem* [DA]_{wt} Representación diagramática de concentraciones de dopamina medidas en perforaciones tomadas de regiones cerebrales asociadas al putamen. Las muestras se recogieron de macacos a los que se había inyectado Lenti-lacZ (barras grises) y a los que se había inyectado Lenti-TH-AADC-CH1 (barras azules) MPTP *post-mortem*. [* Representa un aumento significativo en los niveles de dopamina en comparación con los controles (p<0,05, n=3)].

Figura 12: Localización *in vivo* de sondas de microdiálisis usando MRI T2*

Figura 13: Recuento estereológico de neuronas SNpc después de intoxicación con MPTP

La representación diagramática del recuento estereológico de neuronas SNpc no mostró diferencia estadística entre el grupo Lenti-TH-AADC-CH1 (barra azul) y el grupo Lenti-lacZ (barra gris) (n=3; KW p<0,001; *Post-hoc* MW p<0,001). [SNpc: *pars compacta* de la sustancia negra; VTA, área tegmentaria ventral, Rn: núcleo rojo; ns: no estadísticamente significativo].

Figura 14: Trayectorias de aguja después de inyecciones en el estriado guiadas por MRI

a Estudio MRI T2* *in vivo*

b Análisis *post-mortem* de las trayectorias de aguja dentro del estriado post-comisural, dorsal, "motor" usando análisis histológico Nissl (flecha)

Figura 15: Seguridad de transferencia génica: Marcadores de inflamación después de transferencia génica

Figura 16: Seguridad de transferencia génica: Estudio de MRI en *in vivo*

Figura 17: Distancia recorrida después de exposición farmacológica

Usando manipulación farmacológica del sistema dopaminérgico, se estudió la interacción entre los niveles endógenos de dopamina y agentes dopaminérgicos exógenos (L-Dopa o Apomorfina).

a Tanto la administración sistémica de L-Dopa como la inyección de Lenti-TH-AADC-CH1 (sin añadir L-Dopa) mejoraron significativamente la actividad motora en primates MPTP vírgenes al fármaco, hasta el nivel de actividad normal del primate. Añadir L-Dopa oral a animales a los que se ha inyectado Lenti-TH-AADC-CH1 no alteró significativamente su comportamiento motor, de un modo similar a los animales no lesionados normales.

a La administración sistémica aguda de un agonista dopaminérgico D1/D2 de acción corta prodisquinésico (apomorfina), indujo comportamiento hiperkinético con numerosos movimientos disquinéticos tales como corea y distonía, en animales MPTP vírgenes al fármaco. En contraste, los animales no lesionados normales, como animales MPTP Lenti-TH-AADC-CH1, no mostraron ninguna evidencia de movimientos disquinéticos.

Espont., actividad motora espontánea medida sin administración de ningún fármaco. Apo, administración de apomorfina. Las flechas indican actividad motora excesiva en animales MPTP expuestos con apomorfina, que se correlacionaban con inducción de disquinesia en estos animales. ** $p < 0,01$ respecto a la actividad motora en animales MPTP después de administración de apomorfina; * $p < 0,05$ respecto a la actividad motora espontánea en animales MPTP; N.S., no estadísticamente significativo.

Figura 18: Reversión de la disquinesia inducida por L-Dopa en primates MPTP tratados con Lenti-TH-AADC-CH1

Figura 19: Secuencia parcial de Lenti-TH-AADC-CH1 (pONY8.9.4TY)

La secuencia de nucleótidos de pONY8.9.4TY desde el inicio de la región R de EIAV hasta el final del LTR de SIN. Las secuencias subrayadas indican modificaciones en gag. Estas se han cambiado de ATG a ATTG. Neo indica la ORG de Neomicina fosfotransferasa; CMV_p indica el potenciador/promotor inmediato/temprano de citomegalovirus de seres humanos; tTH indica una ORF de tirosina hidroxilasa de codones optimizados truncada; AADC indica la ORF de la L-aminoácido aromático descarboxilasa de codones optimizados; CH1 indica la ORF de la GTP ciclohidrolasa 1 de codones optimizados; WPRE indica el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota; SINLTR indica la LTR de EIAV de autoinactivación.

Descripción detallada

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (PD) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la pérdida de la ruta nigroestriada. Aunque la causa de la enfermedad de Parkinson es desconocida, está asociada con muerte progresiva de neuronas mesencefálicas dopaminérgicas (tirosina hidroxilasa (TH) positivas), incluyendo alteración motora. Los síntomas característicos de la enfermedad de Parkinson aparecen cuando hasta el 70% de las neuronas nigroestriadas TH positivas se han degenerado.

Actualmente no existe cura satisfactoria para la enfermedad de Parkinson. El tratamiento sintomático de las alteraciones motoras asociadas con la enfermedad implica administración oral de dihidroxifenilalanina (L-DOPA). La L-DOPA se transporta a través de la barrera hematoencefálica y se convierte en dopamina, parcialmente por neuronas dopaminérgicas residuales, conduciendo a una mejora sustancial de la función motora. Sin embargo, después de unos pocos años, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas progresa, se reducen los efectos de L-DOPA y aparecen efectos secundarios.

Una estrategia alternativa para terapia es injerto neural, que se basa en la idea de que la dopamina suministrada desde las células implantadas en el estriado puede sustituir a las células nigroestriadas perdidas. Los ensayos clínicos han demostrado que las neuronas TH positivas mesencefálicas de cadáveres de embriones humanos (fetos abortados) pueden sobrevivir y funcionar en los cerebros de pacientes con enfermedad de Parkinson. Sin embargo, la recuperación funcional ha sido solamente parcial, y la eficacia y reproducibilidad del procedimiento es limitada (Lindvall O. y Bjorklund A. (2004) *NeuroRx* 1: 382-393; Kordower J.H. et al (2008) *Nature Med* 14: 504-506; Li J-Y et al (2008) *Nature Med* 14: 501-503; Braak H. y Del Tredici K. (2008) *Nature Med* 14: 483-485).

Una estrategia alternativa adicional para terapia es terapia génica. Se sugerido que la terapia génica podría usarse en enfermedad de Parkinson de dos modos: para remplazar la dopamina en el estriado afectado introduciendo las enzimas responsables de la síntesis de L-DOPA o dopamina (por ejemplo, tirosina hidroxilasa); y para introducir moléculas neuroprotectoras potenciales que pueden evitar que las neuronas TH positivas mueran o que estimulan la regeneración y recuperación funcional en el sistema nigroestriado dañado (Dunnet S.B. y Björklund A. (1999) Nature 399 A32-A39).

Terapia génica

La terapia génica es la prevención y/o tratamiento de la enfermedad introduciendo, remplazando, alterando o suplementando un gen profiláctico o terapéutico en un sujeto.

La terapia génica es un medio poderoso para suministrar proteínas de forma continua al sistema nervioso central de un modo específico de sitio.

La presente descripción se refiere a terapia génica de dopamina, en que uno o más de los genes responsables o relacionados con la síntesis de dopamina se introducen en el sujeto.

In vivo, la dopamina se sintetiza a partir de tirosina por dos enzimas, la tirosina hidroxilasa (TH) y la aminoácido aromático DOPA-descarboxilasa (AADC). En el método de terapia génica de dopamina de la presente invención, el sistema de vector es preferiblemente capaz de suministrar una o más secuencias de ácido nucleico que codifican TH y AADC. Las secuencias de ambos genes están disponibles: n.º de acceso X05290 y M76180, respectivamente.

El sistema de vector usado en la invención puede comprender una forma truncada del gen de TH, que carece del dominio regulador. La TH truncada evita la inhibición por retroalimentación de producto final por dopamina (Wu J. et al (1992) 267: 25754-25758).

La actividad funcional de tirosina hidroxilasa depende de la disponibilidad de su cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄). El nivel de cofactor puede ser bajo en el estriado desnervado, y de ese modo puede ser preferible que el sistema de vector también sea capaz de suministrar GTP ciclohidrolasa I (CH1), la enzima que cataliza la etapa limitante de la velocidad en la ruta de síntesis de BH₄, para asegurar que se producen niveles suficientes de L-DOPA *in vivo*. La secuencia del gen de CH1 también está disponible: n.º de acceso U19523.

El sistema de vector también puede ser capaz de suministrar una secuencia de ácido nucleico que codifica el transportador vesicular de monoamina 2 (VMAT2 - número de acceso L23205.1).

La terapia génica de remplazo de dopamina puede implicar, por lo tanto, el uso de un sistema de vector para suministrar genes que codifican uno o más de los siguientes genes a un sujeto: TH, AADC, CH1 y/o VMAT2 al sujeto. El sistema de vector puede, por ejemplo, suministrar genes que codifican TH, AADC, y CH1 al sujeto. Dicho sistema de vector se describe en el documento WO 02/29065.

El vector puede comprender de forma alternativa o adicionalmente un gen que codifica un factor de crecimiento capaz de bloquear o inhibir la degeneración en el sistema nigroestriado. Un ejemplo de dicho factor de crecimiento es un factor neurotrófico. Por ejemplo, el gen puede codificar el factor neurotrófico derivado de la línea celular de la glía (GDNF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento persefina, el factor de crecimiento artemina o el factor de crecimiento neurturina, el factor neurotrófico ciliar (CNTF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4) y/o neurotrofina pantrópica.

El vector puede comprender de forma alternativa o adicional un gen que codifica un factor neuroprotector. En particular, el NOI puede codificar moléculas que evitan que las neuronas TH positivas mueran o que estimulan la regeneración y recuperación funcional en el sistema nigroestriado dañado.

Sistema de vector

En el método de terapia génica de remplazo de dopamina de la presente descripción, los genes implicados en la síntesis de dopamina se suministran al sujeto por un sistema de vector, tal como un sistema de vector vírico.

En el contexto de la presente invención, las expresiones "sistema de vector", "vector" y "partícula de vector" se usan de forma sinónima para indicar una entidad capaz de transducir una célula diana con uno o más nucleótidos de interés (NOI).

El concepto de usar vectores víricos para terapia génica es bien conocido (Verma y Somia (1997) Nature 389:239-242).

Los sistemas de vector pueden basarse en un retrovirus, tal como: virus de la leucemia murina (MLV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), virus del tumor mamario de ratón

(MMTV), virus del sarcoma de Rous (RSV), virus del sarcoma de Fujinami (FuSV), virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MLV), virus del osteosarcoma murino FBR (FBR MSV), virus del sarcoma murino de Moloney (Mo-MSV), virus de la leucemia murina de Abelson (A-MLV), virus de mielocitomatosis aviar-29 (MC29), virus de la eritroblastosis aviar (AEV) y todos los demás retroviridae incluyendo lentivirus.

5 El sistema de vector usado en la invención se basa en un lentivirus. Los lentivirus tienen la ventaja de que pueden infectar células tanto en división como no en división.

10 Ejemplos de lentivirus de primates incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causante del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA), y el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV). El grupo de lentivirus no de primate incluye el "virus lento" prototipo virus visna/maedi (VMV), así como el virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV) relacionado, el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) y el virus de la inmunodeficiencia felina más recientemente descrito (FIV) y el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV).

15 Una partícula de vector retroviral puede prepararse por una célula productora, por ejemplo, una en que los genes necesarios se han introducido por un método de "triple transfección". En este enfoque, las tres secuencias diferentes de ADN que son necesarias para producir una partícula de vector retroviral, es decir, las secuencias codificantes de *env*, la secuencia codificante de *gag-pol* y el genoma retroviral deficiente que contiene uno o más NOI (por ejemplo, capaz de codificar una o más enzimas implicadas en la síntesis de dopamina) se introducen en la célula al mismo tiempo por transfección transitoria. El documento WO 94/29438 describe la producción de células productoras *in vitro* usando este método de transfección transitoria múltiple de ADN.

La secuencia *gag-pol* puede optimizarse en sus codones para su uso en la célula productora (véase a continuación).

25 La proteína *env* codificada por la secuencia de nucleótidos transfectada en la célula productora puede ser una proteína *env* homóloga retroviral o lentiviral. Como alternativa, puede ser una *env* heteróloga o una *env* de un no retrovirus o lentivirus (véase a continuación en "pseudotipado").

30 El sistema de vector usado en la presente invención puede ser un sistema de vector autoactivador (SIN).

A modo de ejemplo, se han construido sistemas de vector retrovirales autoinactivadores delecionando los potenciadores transcripcionales o los potenciadores y el promotor en la región U3 de la LTR 3'. Después de una ronda de transcripción inversa e integración del vector, estos cambios se copian en las LTR tanto 5' como 3' produciendo un provirus transcripcionalmente inactivo. Sin embargo, cualquier promotor o promotores internos a las LTR en dichos vectores aún será transcripcionalmente activo. Esta estrategia se ha empleado para eliminar efectos de los potenciadores y promotores en las LTR víricas sobre la transcripción a partir de genes colocados de forma interna. Dichos efectos incluyen transcripción o supresión aumentada de la transcripción. Esta estrategia también puede usarse para eliminar la transcripción corriente abajo desde la LTR 3' en ADN genómico. Esto es de preocupación particular en terapia génica humana donde puede ser importante evitar la activación accidental de un oncogén endógeno.

Puede usarse un mecanismo asistido por recombinasa que facilite la producción de vectores regulados de alto título desde las células productoras.

45 Como se usa en este documento, la expresión "sistema asistido por recombinasa" incluye, aunque sin limitación, un sistema usando la recombinasa Cre / sitios de reconocimiento loxP del bacteriófago PI o la recombinasa FLP específica de sitio de *S. cerevisiae* que cataliza los eventos de recombinación entre dianas de reconocimiento de FLP de 34 pb (FRT).

50 La recombinasa FLP específica de sitio de *S. cerevisiae* que cataliza los eventos de recombinación entre dianas de reconocimiento de FLP de 34 pb (FRT) se ha configurado en construcciones de ADN para generar líneas celulares productoras de alto nivel usando eventos de recombinación asistidos por recombinasa. Se ha desarrollado un sistema similar usando la recombinasa Cre / sitios de reconocimiento loxP del bacteriófago PI. Esto se configuró en un genoma lentiviral de modo que se generaran líneas celulares productoras de alto título de lentivirus.

55 Usando líneas celulares productoras/empaquetadoras, es posible propagar y aislar cantidades de partículas de vector retroviral (por ejemplo, para preparar títulos adecuados de las partículas de vector retroviral) para posterior transducción de, por ejemplo, un sitio de interés (tal como tejido cerebral adulto). Las líneas celulares productoras son habitualmente mejores para producción a gran escala o para partículas de vector.

60 Es deseable usar preparaciones de virus de alto título para la transducción en tejidos tales como el cerebro. Las técnicas para aumentar el título del virus incluyen el uso de una señal de empaquetamiento *psi* positiva como se ha analizado anteriormente y la concentración de reservas víricas.

65 Una preparación de virus de alto título para una célula productora/empaquetadora es habitualmente del orden de 10^5 a 10^7 partículas retrovirales por ml. Para la transducción del cerebro, es necesario usar volúmenes muy pequeños,

de modo que la preparación vírica se concentra por ultracentrifugación. Pueden usarse otros métodos de concentración tales como ultrafiltración o unión a y elución de una matriz.

5 La presencia de una secuencia llamada tracto central de polipurina (cPPT) puede mejorar la eficacia del suministro génico a células no en división. Este elemento de acción en *cis* está localizado, por ejemplo, en el elemento de región codificante de la polimerasa de EIAV. El genoma del sistema de vector usado en la presente invención puede comprender una secuencia de cPPT.

Además, o como alternativa, el genoma vírico puede comprender un potenciador traduccional.

10 Los NOI pueden unirse de forma funcional a uno o más elementos promotores/potenciadores. La transcripción de uno o más NOI puede ser bajo el control de LTR víricas o como alternativa, por elementos promotores-potenciadores. Preferiblemente, el promotor es un promotor vírico fuerte tal como CMV, o es un promotor constitutivo celular tal como PGK, beta-actina o EF1alfa. El promotor puede estar regulado o ser específico de sitio. 15 Dichos promotores pueden seleccionarse a partir de genes tales como neurofilamentos, nestina, parquina, receptores de dopamina, tirosina hidroxilasa. Dichos promotores también pueden contener secuencias supresoras neurorrestrictivas tales como las encontradas en el gen del receptor mu-opioide. En una realización preferida, el promotor puede ser específico de la glía o específico de neuronas. El control de la expresión también puede conseguirse usando sistemas tales como el sistema de tetraciclina que activa o desactiva la expresión génica en 20 respuesta a agentes externos (en este caso tetraciclina o sus análogos).

El sistema de vector para su uso en la presente invención puede pseudotiparse con una proteína env heteróloga, por ejemplo, con al menos parte de la proteína G de la rabia o la proteína VSV-G. Otras envueltas que pueden usarse para pseudotipar vectores retrovíricos incluyen la envuelta del virus de Ross River, la proteína GP64 de baculovirus 25 y las envueltas del virus Mokola, Ébola, 4070A y de la coriomeningitis linfocítica (LCMV).

Se ha demostrado que un sistema mínimo de lentivirus puede construirse a partir de virus VIH, SIV, FIV, y EIAV. Dicho sistema no requiere ninguno de los genes adicionales *vif*, *vpr*, *vpx*, *vpu*, *tat*, *rev* y *net* para la producción del vector o para la transducción de células en división y no en división. También se ha demostrado que puede 30 construirse un sistema de vector mínimo de EIAV que no requiere S2 para la producción del vector o para la transducción de células en división y no en división. La delección de genes adicionales es muy ventajosa. En primer lugar, permite que los vectores se produzcan sin los genes asociados con la patología en infecciones lentivíricas (por ejemplo, VIH), tales como *tat*. En segundo lugar, la delección de los genes adicionales permite que el vector empacete más ADN heterólogo. En tercer lugar, los genes cuya función es desconocida, tales como S2, pueden 35 omitirse, reduciendo de ese modo el riesgo de causar efectos indeseados. Ejemplos de vectores lentivíricos mínimos se describen en el documento WO-A-99/32646 y en el documento WO-A-98/17815.

El sistema de suministro usado en la invención puede estar desprovisto, por lo tanto, de al menos *tat* y S2 (si es un sistema de vector de EIAV), y posiblemente también de *vif*, *vpr*, *vpx*, *wpu* y *nef*.

40 Los sistemas para su uso en la presente invención también pueden estar desprovistos de *rev*. *Rev* se creía previamente que era esencial en algunos genomas retrovíricos para la producción eficaz del virus. Por ejemplo, en el caso de EIAV, se creía que *rev* y la secuencia RRE debían incluirse. Sin embargo, se ha descubierto que la necesidad de *rev* y RRE puede reducirse o eliminarse por optimización de codones o por remplazo con otros 45 sistemas equivalentes funcionales tales como el sistema MPMV. Una expresión de *gag-pol* de codones optimizados es REV independiente, puede retirarse RRE del casete de expresión de *gag-pol*, retirando de ese modo cualquier potencial de recombinación con cualquier RRE contenido en el genoma del vector.

El genoma vírico del sistema de vector usado en la presente invención puede carecer, por lo tanto, del elemento de 50 respuesta a Rev (RRE).

En una realización preferida, el sistema usado en la presente invención se basa en el llamado sistema "mínimo" en que algunos o todos los genes adicionales se han retirado.

55 Un sistema de vector usado en la presente invención, capaz de suministrar genes que codifican TH, AADC y CH1, puede tener una o más de las siguientes características:

- (i) al menos una de las secuencias de ácido nucleico carece de una marca N-terminal;
- (ii) al menos una de las secuencias de ácido nucleico tiene los codones optimizados;
- 60 (iii) cuando el sistema de vector comprende un casete tricistrónico, el orden de los genes en el casete tricistrónico es TH-AADC-CH1
- (iv) al menos de los codones de inicio potenciales ATG en *gag* está cambiado a ATG;
- (v) hay un casete de expresión de Neo insertado cadena abajo de *gag*; y
- (vi) cuando el sistema de vector comprende un casete tricistrónico, hay un WPRE insertado en el extremo 3' del 65 casete tricistrónico para potenciar la expresión.

Estas características se explican en más detalle a continuación.

Marcas N-terminales

5 Las marcas, tales como mar polihistidina o una marca FLAG™ se usan habitualmente en el extremo N-terminal de proteínas para ayudar a la purificación de la proteína o la detección de la proteína usando anticuerpos específicos de marca. Las marcas pueden añadirse insertando el ADN codificante de la proteína en un vector que comprende una secuencia que codifica la marca, de modo que se incluye automáticamente dentro de la secuencia codificante. Como alternativo, puede realizarse PCR con cebadores que tienen una secuencia codificante de marca adyacente al codón de inicio.

15 Para terapia génica de remplazo de dopamina, no existe la necesidad de que las enzimas de síntesis de dopamina codificadas tengan marcas N-terminales. La presencia de marcas N-terminales, por lo tanto, aumenta innecesariamente la longitud del genoma.

Optimización de codones

20 La optimización de codones se ha descrito previamente en el documento WO99/41397. Diferentes células difieren en su uso de codones particulares. Este sesgo de codones corresponde a un sesgo en la abundancia relativa de ARNt particulares en el tipo celular. Alterando los codones en la secuencia de modo que se personalicen para coincidir con la abundancia relativa de los correspondientes ARNt, es posible aumentar la expresión. Por la misma razón, es posible disminuir la expresión eligiendo deliberadamente codones para los cuales se sabe que los correspondientes ARNt son raros en el tipo celular particular. Por tanto, está disponible un grado adicional de control de la traducción.

25 Los genes suministrados por el sistema de terapia génica, así como los componentes del sistema de vector pueden optimizarse en los codones.

30 Muchos virus, incluyendo VIH y otros lentivirus, usan una gran cantidad de codones raros y cambiando estos para que correspondan con los codones de mamífero habitualmente usados, puede conseguirse una expresión aumentada de los componentes de empaquetado en células productoras de mamífero. Se conocen las tablas de uso de codones en la técnica para células de mamífero, así como para una diversidad de otros organismos.

Optimización de codones de gag pol

35 La optimización de codones tiene otras varias ventajas. En virtud de las alteraciones en sus secuencias, las secuencias de nucleótidos que codifican los componentes de empaquetado de las partículas víricas requeridas para el ensamblaje de partículas víricas en las células productoras/células de empaquetado tienen secuencias de inestabilidad de ARN (INS) eliminadas de las mismas. Al mismo tiempo, la secuencia codificante de la secuencia de aminoácidos para los componentes de empaquetado se retiene de modo que los componentes víricos codificados por las secuencias permanecen igual, o al menos suficientemente similares de modo que la función de los componentes de empaquetado no se compromete. La optimización de codones también supera la necesidad de Rev/RRE para la exportación, haciendo que las secuencias optimizadas sean independientes de Rev. La optimización de codones también reduce la recombinación homóloga entre diferentes construcciones dentro del sistema de vector (por ejemplo, entre las regiones de solapamiento en las fases de lectura abierta de gag-pol y env). El efecto global de la optimización de codones es, por lo tanto, un aumento notable en el título del virus y seguridad mejorada.

50 En una realización, se optimizan solamente los codones relacionados con INS. Como alternativa, las secuencias pueden optimizarse en sus codones en su totalidad, con la excepción de la secuencia que abarca el sitio de desplazamiento de fase.

55 El gen *gag-pol* comprende dos fases de lectura solapantes que codifican las proteínas gag y pol respectivamente. La expresión de ambas proteínas depende del desplazamiento de fase durante la traducción. Este desplazamiento de fase sucede como resultado del "deslizamiento" del ribosoma durante la traducción. Se cree que este deslizamiento está causado al menos en parte por estructuras secundarias de ARN estancamiento del ribosoma. Dichas estructuras secundarias existen corriente abajo del sitio de desplazamiento de fase en el gen *gag-pol*. Para VIH, la región de solapamiento se extiende desde el nucleótido 1222 corriente abajo del inicio de *gag* (donde el nucleótido 1 es la A del ATG de *gag*) hasta el final de *gag* (nt 1503). Por consiguiente, un fragmento de 281 pb que abarca el sitio de desplazamiento de fase y la región solapante de las dos fases de lectura preferiblemente no se optimiza en los codones. Reteniendo este fragmento se posibilitará una expresión más eficaz de las proteínas gag-pol.

60 Para EIAV, el inicio del solapamiento se ha aceptado que es el nt 1262 (donde el nucleótido 1 es la A del ATG de *gag*). El final del solapamiento está en 1461 pb. Para asegurar que el sitio de desplazamiento de fase y el solapamiento de *gag-pol* se conservan, la secuencia de tipo silvestre se ha retenido desde nt 1156 hasta 1465.

Pueden hacerse derivaciones del uso óptimo de codones, por ejemplo, para acomodar sitios de restricción convenientes, y pueden introducirse cambios conservativos de aminoácidos en las proteínas gag-pol.

5 Debido a la naturaleza degenerada del código genético, se apreciará que pueden conseguirse numerosas secuencias *gag-pol* por un especialista. También existen muchas variantes retrovéricas descritas que pueden usarse como punto de partida para generar una secuencia *gag-pol* de codones optimizados. Los genomas lentivíricos pueden ser bastante variables. Por ejemplo, existen muchas cuasi especies de VIH-1 que aún son funcionales. Este también es el caso para EIAV. Estas variables pueden usarse para potenciar partes particulares del proceso traducción. Ejemplos de variantes de VIH-1 pueden encontrarse en <http://hivweb.lanl.gov>. Detalles de clones de EIAV pueden encontrarse en la base de datos NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

10 La estrategia de secuencias *gag-pol* de codones optimizados puede usarse en relación a cualquier retrovirus. Esto se aplicaría a todos los lentivirus, incluyendo EIAV, FIV, BIV, CAEV, VMR, SIV, VIH-1 y VIH-2. Además, este método podría usarse para aumentar la expresión de genes de HTLV-1, HTLV-2, HFV, HSRV y retrovirus endógenos humanos (HERV), MLV y otros retrovirus.

15 La optimización de codones puede hacer que la expresión de *gag-pol* sea independiente de Rev. Para posibilitar el uso de anti-rev o factores RRE en el vector retrovérico, sin embargo, sería necesario hacer que el sistema de generación de vector retrovérico fuera totalmente independiente de Rev/RRE. Por tanto, el genoma también necesita modificarse. Esto se consiguió optimizando los componentes del genoma del vector. De forma ventajosa, estas modificaciones también conducen a la producción de un sistema más seguro ausente de toda proteína adicional tanto en la célula productora como en la célula transducida.

20 Como se ha descrito anteriormente, los componentes de empaquetado para un vector retrovérico incluyen productos de expresión de los genes *gag*, *pol* y *env*. Además, el empaqueta eficaz depende de una corta secuencia de 4 tallos-bucles formados por una secuencia parcial de *gag* y *env* (la "señal de empaquetado"). Por tanto, la inclusión de una secuencia *gag* delecionada en el genoma del vector retrovérico (además de la secuencia completa de *gag* en la construcción de empaquetado) optimizará el título del vector. Hasta la fecha, se ha informado de que el empaquetado eficaz requiere de 255 a 360 nucleótidos de *gag* en vectores que aún retienen secuencias *env*, o aproximadamente 40 nucleótidos de *gag* en una combinación particular de mutación de donante de corte y empalme, deleciones *gag* y *env*. Se ha descubierto sorprendentemente que una deleción de todo salvo los 360 o así de nucleótidos N-terminales en *gag* conduce a un aumento en el título del vector. Por tanto, preferiblemente, el genoma del vector retrovérico incluye una secuencia *gag* que comprende una o más deleciones, más preferiblemente la secuencia *gag* comprende aproximadamente 360 nucleótidos obtenibles del extremo N-terminal.

35 Modificación de codones potenciales de inicio en gag

Para asegurar que la traducción empieza desde el codón correcto de inicio (ATG), pueden manipularse codones de inicio cadena arriba en gag. Convenientemente, se mutan los codones de inicio cadena arriba por sustitución, por ejemplo, ATG en ACG o inserción de ATG para ATTG por técnicas conocidas en la técnica.

40 Esto asegura que la primera ORF disponible del ARNm maduro en las células diana sea para el gen terapéutico. En el contexto de la presente invención, se muta al menos un codón de inicio potencial, preferiblemente todos los codones de inicio potenciales en gag.

45 Inserción de un casete de expresión Neo

La inserción de una fase de lectura abierta o parte de la misma, cadena abajo de una LTR vírica y cadena abajo de un promotor interno ha demostrado potenciar el título del virus en ausencia de rev (como se describe en el documento WO 03/064665). Por tanto, en una realización preferida, se inserta un casete de expresión Neo cadena abajo de gag.

WPRE

55 El genoma vírico puede comprender un elemento regulador postraduccional. Por ejemplo, el genoma puede comprender un elemento tal como el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE), tal como el descrito en el documento US 2005/0002907.

60 Un sistema de vector puede comprender una pluralidad de vectores, cada uno capaz de suministrar un gen que codifica una enzima implicada en la síntesis de dopamina.

Una estrategia alternativa es suministrar los tres genes a células diana usando un único vector.

Sistemas de vector lentivírico

65 El documento WO 02/29065 describe un vector lentivírico tricistrónico capaz de suministrar genes que codifican la

tirosina hidroxilasa, (TH), L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) y GTP ciclohidrolasa 1 (CH1) a una célula hospedadora. Se sabe que la expresión de estas enzimas causa la producción de dopamina, L-Dopa y DOPAC en células en cultivo y es terapéuticamente eficaz contra un modelo de roedor de enfermedad de Parkinson.

5 Vectores adenoasociados

Los vectores de virus adenoasociado (AAV) también se han usado para suministrar al cerebro, genes asociados con la síntesis de dopamina. El uso de vectores AAV diferentes para transferir dos o tres genes críticos ha demostrado algún beneficio conductual en ratas y modelos de primates no humanos (NHP) de PD. (Kirik *et al.* (2002) PNAS 99:4708-4713; Muramatsu *et al.* (2002) Human Gene Therapy 13:345-354).

Previamente se creía que el suministro de tres genes (por ejemplo, genes que codifican AADC, TH y GCH-1) a células del estriado usando un único vector AAV no se podría conseguir debido a las restricciones de empaquetado de estos vectores (Kirik *et al.* (2002) como anteriormente; Muramatsu *et al.* (2002) como anteriormente; Shen *et al.* (2000) Human Gene Therapy 11:1509-1519; Sun *et al.* (2004) Human Gene Therapy 15:1177-1196; Carlsson *et al.* (2005) Brain 128:559-569).

Sin embargo, los recientes informes han demostrado que ciertos vectores AAV pueden incorporar de forma eficaz grandes cargas (hasta 8,9 kb). Se descubrió que el más eficaz de estos vectores tenía una cápsida AAV5 y una ITR AAV2 (Allocca M. *et al.* J.Clin Invest. (2008) 118: 1955-1964).

Sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)

El genoma vírico del sistema de vector usado en la invención comprende tres o más NOI. Para que se expresen los NOI, debe haber tres o más unidades de transcripción dentro del genoma del vector, una para cada NOI. Los vectores retrovíricos consiguen los mayores títulos y propiedades de expresión génica más potentes si se mantienen genéticamente simples, y de ese modo es preferible usar un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para iniciar la traducción de la segunda (y posteriores) secuencia codificante en un mensaje policistrónico.

La inserción de elementos IRES en vectores retrovíricos es compatible con el ciclo de replicación retroviral y permite la expresión de múltiples regiones codificantes a partir de un único promotor. Los elementos IRES se descubrieron por primera vez en los extremos 5' no traducidos de picornavirus donde promueven la traducción independiente de cap de proteínas víricas. Cuando se localizan entre fases de lectura abierta en un ARN, los elementos IRES permiten una traducción eficaz de la fase de lectura abierta corriente abajo promoviendo la entrada del ribosoma en el elemento IRES seguido por inicio corriente abajo de la traducción.

Se conocen varias secuencias IRES diferentes incluyendo aquellas del virus de la encefalomiocarditis (EMCV); proteína BiP; gen *Antennapedia* de *Drosophila* (exones d y e) así como aquellos en poliovirus (PV).

De acuerdo con el documento WO-A-97/14809, las secuencias IRES se encuentran típicamente en la región no codificante 5' de los genes. Además de los de la bibliografía, pueden encontrarse empíricamente buscando secuencias genéticas que afecten a la expresión y después determinando si esa secuencia afecta al ADN (es decir, actúa como promotor o potenciador) o solamente el ARN (actúa como secuencia IRES).

El término "IRES" incluye cualquier secuencia o combinación de secuencias que trabaje como o mejore la función de un IRES.

Los IRES pueden ser de origen vírico (tal como IRES de EMCV, IRES de PV o secuencias tipo 2A de FMDV) o de origen celular (tales como IRES de FGF2, IRES de NRF, IRES de Notch 2 o IRES de EIF4).

Para que el IRES sea capaz de iniciar la traducción de cada NOI, debe estar localizado entre o antes de los NOI en el genoma del vector. Por ejemplo, para una secuencia multicistrónica que contenga n NOI, el genoma puede ser del siguiente modo:

55 [(NOI₁ -IRES₁)...NOI_n n=1→n

Para secuencias bi y tricistrónicas, el orden puede ser el siguiente:

NOI₁-IRES₁-NOI₂

60 NOI₁-IRES₁-NOI₂-IRES₂-NOI₃

También pueden utilizarse configuraciones alternativas de IRES y NOI. Por ejemplo, transcritos que contienen los IRES y los NOI no tienen que estar dirigidos por el mismo promotor.

65

Un ejemplo de esta disposición puede ser:

IRES₁-NOI₁-promotor-NOI₂-IRES₂-NOI₃.

5 En cualquier construcción que utilice un casete interno que tenga más de un IRES y NOI, los IRES pueden ser de diferentes orígenes, es decir, heterólogos entre sí. Por ejemplo, un IRES puede ser de EMCV y el otro IRES puede ser de poliovirus.

Los IRES también pueden ser adecuados para su uso con vectores AAV y adenovíricos.

10

Composiciones farmacéuticas

El vector para la terapia génica de remplazo de dopamina usado en la presente invención puede estar presente en una composición farmacéutica, donde la composición comprende una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz del vector.

15

Los métodos de la descripción pueden usarse para tratar y/o prevenir la enfermedad de Parkinson en un sujeto.

"Tratar" como se usa en este documento se refiere al tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad para mejorar, curar o reducirlos los síntomas de la enfermedad, o reducir o detener la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, el método de la descripción puede mejorar o restaurar la función motora y/o reducir las disquinesias. Los pacientes tratados con terapia génica de remplazo de dopamina como se describe en este documento pueden seguir tratándose con L-Dopa, que puede ser a una dosis reducida que la tomada previamente a la terapia de remplazo de dopamina.

20

El término "prevenir" pretender hacer referencia a evitar, retardar, impedir o dificultar el desarrollo de una enfermedad. Por ejemplo, el método de la descripción puede retardar o detener la muerte progresiva de neuronas mesencefálicas, previniendo de ese modo la alteración motora. El método de la descripción puede reducir la probabilidad de disquinesias.

25

La composición farmacéutica puede comprender opcionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

30

La composición puede administrarse por inyección. Por ejemplo, la composición puede administrarse por inyección en el putamen caudado. En los ejemplos dados en este documento, la composición se administra por inyecciones bilaterales en cada putamen motor.

35

El sistema de vector puede proporcionarse en forma de un kit junto con agujas y/o catéteres usados para administrar los vectores al cerebro.

40

Los métodos de terapia génica de remplazo de dopamina de la presente descripción pueden usarse junto con terapia de dopamina. Como se muestra en los ejemplos presentados en este documento, la terapia génica usando un vector lentivírico que expresa TH, AADC y CH1 muestra un efecto sinérgico con el tratamiento con L-Dopa.

45

L-Dopa puede administrarse por cualquier medio conveniente, tal como por vía oral, o por inyección intramuscular, y puede ser antes de o de forma contemporánea con la terapia génica de remplazo de dopamina.

Disquinesias

50

La disquinesia es la alteración de la fuerza del movimiento voluntario, produciendo movimientos fragmentados o incompletos.

Las disquinesias son un efecto secundario común de la ingesta crónica de L-Dopa. En muchos casos, los pacientes oscilan entre períodos activos con fármaco que se complican con movimientos involuntarios anormales (disquinesias), y períodos inactivos sin fármaco donde los pacientes están acinéticos (rigidez muscular).

55

Se cree que las disquinesias están causadas al menos parcialmente por la ingesta oral intermitente de L-Dopa y la consecuente estimulación pulsada de receptores de dopamina del estriado.

60

Como el sistema de vector usado en la invención reemplaza la dopamina por terapia génica, debe conseguirse suministro continuo de dopamina que mantiene o restaura el tono dopaminérgico constante en el estrato.

Las disquinesias asociadas con aberraciones en el tono estriado en el sujeto, por lo tanto, deben evitarse.

65

El tono dopaminérgico puede conseguirse a niveles fisiológicos o niveles subfisiológicos (véase a continuación).

Se ha demostrado sorprendentemente que la terapia génica de remplazo de dopamina no solamente es capaz de evitar las disquinesias asociadas con tratamiento con L-Dopa, sino que proporciona terapia para pacientes que ya han desarrollado disquinesias por un tratamiento a largo plazo con L-Dopa. Por tanto, la terapia génica de remplazo de dopamina puede prevenir la aparición posterior de disquinesia después de terapia oral con L-Dopa.

5 La presente descripción por tanto también proporciona un método para tratar y/o prevenir las disquinesias asociadas con administración oral de L-Dopa en un sujeto con enfermedad de Parkinson mediante la administración de un sistema de vector para terapia génica de remplazo de dopamina al sujeto.

10 Niveles de dopamina después de terapia génica

La estrategia de terapia génica usada en la presente invención puede inducir síntesis de dopamina en el estriado de modo que los niveles de dopamina que se consiguen sean mayores que los asociados con el estriado PD no tratado, pero inferiores a los asociados con el estriado no PD. El sistema de vector puede causar la producción de niveles subfisiológicos de dopamina en el estriado.

15 La producción de niveles subfisiológicos de dopamina se ha demostrado, por los presentes inventores, que son terapéuticamente eficaces en un modelo de primate de PD. La producción de niveles subfisiológicos es preferible a la producción de niveles superfisiológicos ya que la "sobredosis" con dopamina puede ser dañina, por ejemplo, porque puede inducir disquinesias. Además, la sobreproducción de las enzimas productoras de dopamina puede ser dañina para la célula hospedadora.

La producción de niveles inferiores de enzimas también necesita la administración de menos del sistema de vector para terapia génica, reduciendo los costes y minimizando cualquier efecto adverso asociado con el tratamiento.

25 Transportador de dopamina

El Transportador de Dopamina o Transportador Activo de Dopamina (DAT) es una proteína de membrana integrada localizada en la membrana plasmática de los terminales sinápticos de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra que están localizadas en el estriado. El DAT retira la dopamina reciclada de la hendidura sináptica, terminando la señal de dopamina.

Los niveles aumentados de DAT están asociados con depresión y otros trastornos tales como ADHD.

35 Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, los presentes inventores predicen que una de las razones para el fallo del injerto de células madre/tejido fetal en la sustancia negra para inducir síntesis de dopamina es la presente de DAT en el tejido injertado. DAT puede actuar secuestrando la dopamina extracelular liberada del tejido injertado de modo que no pueda realizar su efecto fisiológico.

40 El método de la presente descripción implica aumentar la eficacia de la terapia génica de dopamina evitando el secuestro de dopamina por DAT.

El secuestro de dopamina por DAT puede evitarse convenientemente mediante la administración del sistema de vector para terapia génica a un tejido que carece de expresión significativa de DAT.

45 Un tejido se considera que "carece de expresión significativa de DAT" si los niveles de DAT son suficientemente bajos para que no interfieran de forma significativa con la dopamina producida por la estrategia de terapia génica de remplazo de dopamina.

50 Los niveles de DAT interfieren significativamente con la estrategia de terapia génica de remplazo de dopamina si secuestran dopamina a un grado tal que afecte al efecto profiláctico y/o terapéutico del tratamiento.

Los niveles de DAT están disminuidos en el estriado de pacientes de Parkinson. El secuestro de dopamina por DAT puede evitarse, por lo tanto, expresando las enzimas implicadas en la síntesis de dopamina en el estriado de un paciente de Parkinson.

Inhibidores de DAT

60 Un enfoque alternativo o adicional a la administración de un tejido bajo en DAT o sin DAT es inhibir el secuestro de dopamina por DAT usando uno o más inhibidores de DAT.

Un inhibidor de DAT puede inhibir la expresión o actividad de DAT.

65 El gen para DAT está localizado en el cromosoma 5p15. La región que codifica la proteína del gen es de más de 64 kb de longitud y está compuesta por 15 exones.

Nurr1, un receptor nuclear que regula muchos genes relacionados con dopamina, puede unirse a la región promotora de este gen e inducir la expresión. Este promotor también puede ser la diana del factor de transcripción Sp-1.

5 La expresión de DAT puede inhibirse por diversos métodos conocidos en la técnica, tales como por tecnología antisentido o iARN contra el gen DAT o Nurr1.

Por ejemplo, el inhibidor de DAT puede comprender una molécula de ácido nucleico antisentido o un ARN inhibidor específico para la secuencia DAT. El inhibidor también puede ser un microARN que se une a una secuencia diana en el gen DAT y de ese modo evita la expresión de DAT.

Aunque los factores de transcripción controlan que las células expresen DAT, la regulación funcional de esta proteína se consigue en gran medida por quinasas. Tanto MAPK como PKC pueden modular la tasa a la cual el transportador mueve dopamina o causar la internalización de DAT.

15 La función de DAT puede inhibirse, por lo tanto, mediante la modulación de la expresión y/o actividad de una o más enzimas quinasa.

Se conocen varios inhibidores de DAT, incluyendo metilfenidato, cocaína, bupropión y Ritalina.

20 En el contexto de la presente invención, el inhibidor de DAT puede administrarse al sujeto antes de la terapia génica de remplazo de dopamina o simultáneamente.

El sistema de vector y el inhibidor de DAT (o su sistema de producción *in vivo*) puede proporcionarse en forma de un kit para administración separada, secuencial, combinada o simultánea a un sujeto. El sistema de vector para su uso de acuerdo con la presente invención también podría suministrar un ARN inhibidor además de las enzimas implicadas en la terapia de remplazo de dopamina.

ARNip/microARN

30 El sistema de vector puede comprender o codificar un ARNip o microARN o ARNhc o microARN o ARNhc regulado (Dickins et al. (2005) Nature Genetics 37: 1289-1295, Silva et al. (2005) Nature Genetics 37:1281-1288).

El silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) mediado por ARN bicatenario (ARNbc) es un mecanismo de defensa celular conservado para controlar la expresión de genes foráneos. Se cree que la integración aleatoria de elementos tales como transposones o virus causa la expresión ARNbc que activa la degradación específica de secuencia de ARNm monocatenario homólogo o ARN genómico vírico. El efecto de silenciamiento es conocido como interferencia de ARN (iARN) (Ralph et al. (2005) Nature Medicine 11:429-433). El mecanismo de iARN implica el procesamiento de ARNbc largos en dúplex de ARN de aproximadamente 21-25 nucleótidos (nt). Estos productos se denominan ARN interferentes pequeños o de silenciamiento (ARNip) que son los mediadores específicos de secuencia de la degradación de ARNm. En células de mamífero diferenciadas, se ha descubierto que ARNbc >30 pb activan la respuesta de interferón que conduce a la parada de la síntesis de la proteína y la degradación de ARNm no específica (Stark et al. (1998)). Sin embargo, esta respuesta puede esquivarse usando dúplex de ARNip de 21 nt (Elbashir et al. (2001), Hutvagner et al. (2001)) permitiendo que la función génica se analice en células de mamífero cultivadas.

Los microARN son un grupo muy grande de ARN pequeños producidos de forma natural en organismos, al menos algunos de los cuales regulan la expresión de genes diana. Los miembros constituyentes de la familia de microARN son *let-7* y *lin-4*. El gen *let-7* codifica una especie de ARN pequeño, altamente conservado que regula la expresión de genes codificantes de proteína endógena durante el desarrollo del gusano. La especie de ARN activo se transcribe inicialmente como un precursor de ~70 nt, que se procesa de forma post-transcripcional en una forma madura de ~21 nt. Tanto *let-7* como *lin-4* se transcriben como precursores de ARN de horquilla que se procesan hasta sus formas maduras por la enzima Dicer.

55 Alteración cognitiva

El tratamiento oral con L-Dopa puede asociarse con alteración cognitiva.

La enfermedad de Parkinson se caracteriza principalmente por reducción de dopamina en el estriado dorsal. La función de la dopamina en el estriado ventral o "cognitivo" y la corteza prefrontal habitualmente no se ve afectada. La administración oral de L-Dopa estimula todos los sistemas dopaminérgicos cerebrales, lo que significa que "sobre-dosifica" el estriado cognitivo y altera las funciones cognitivas asociadas.

Se ha descubierto sorprendentemente que, usando terapia génica para reemplazar la dopamina, se restauran los niveles tanto locales como tónicos de dopamina. En otras palabras, la terapia génica de remplazo de dopamina eleva los niveles de dopamina en el estriado dorsal sin sobre-elevar los niveles de dopamina en el estriado cognitivo.

Los métodos de la presente descripción, por lo tanto, tratan y/o previenen la enfermedad de Parkinson sin causar alteración cognitiva.

Disfunción motora

5 La disfunción motora asociada con la enfermedad de Parkinson se cree que surge a partir de la disfunción de los ganglios basales, las estructuras cerebrales profundas que controlan el movimiento.

10 Se cree que la sobreactividad anormal de los núcleos de salida tales como el globo pálido interno (GPi) es responsable.

15 Sorprendentemente, se ha descubierto que la terapia génica de remplazo de dopamina puede normalizar las actividades neuronales en los núcleos de salida de los ganglios basales, reduciendo la alta tasa de disparo anormal de neuronas GPi en PD y reduciendo la proporción de repuntes por ráfaga y la cantidad de eventos de ráfaga en el patrón de disparo neuronal.

La terapia génica de remplazo de dopamina también reduce la hiperactividad neuronal en el núcleo subtalámico (STN). Esto es detectable mirando las disminuciones en la actividad metabólica del STN.

20 La presente descripción proporciona un método para normalizar la actividad eléctrica neuronal en los ganglios basales y/o en el núcleo subtalámico en un sujeto con enfermedad de Parkinson mediante la administración de un sistema de vector para terapia génica de remplazo de dopamina al sujeto.

25 El término "normalizar" en este contexto significa que el aumento en la tasa media de disparo de neuronas GPi y/o hiperactividad neuronal en el STN asociado con PD se reduce. La tasa media de disparo y/o la actividad neuronal puede mantenerse a un nivel normal, no PD, reducirse hasta un nivel no PD, o reducirse de modo que aún esté elevado en comparación con un individuo no PD, pero aún menor que el nivel que se esperaría en un individuo sin tratamiento.

30 Observando el patrón de disparo neuronal, la administración del sistema de vector reduce la cantidad de repuntes por ráfaga y/o la cantidad de eventos de ráfaga en el GPi.

35 Si el paciente se trata antes de la aparición de los síntomas, el sistema de vector puede normalizar la cantidad de repuntes por ráfaga y/o la cantidad de ráfagas, de modo que no estén elevados o no elevados al mismo grado que estarían en ausencia de tratamiento.

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

40 Ejemplos

Ejemplos

Ejemplo 1 - Restauración del comportamiento motor a largo plazo

45 Para investigar el potencial de la transferencia génica de TH, AADC y CH1 para corregir el parkinsonismo, se realizó un estudio a largo plazo en el modelo de primate MPTP de PD. Se diseñó un vector lentivírico tricistrónico que codifica los genes para TH, AADC y CH1 (Lenti-TH-AADC-CH1). De una a ocho semanas después del cese de la intoxicación con MPTP, se asignaron 18 macacos tratados con MPTP a 3 grupos de comportamiento equivalente. El primer grupo (MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1, n = 6) recibió inyecciones bilaterales de Lenti-TH-AADC-CH1 en cada putamen motor. El segundo grupo (MPTP-Lenti-lacZ, n = 6) recibió un vector EIAV de control que codifica el gen indicador LacZ. El tercer grupo (MPTP-largo plazo, n = 6) no recibió ninguna intervención quirúrgica, pero se incluyó como control adicional para evaluar la estabilidad del modelo MPTP. Todos los animales se mantuvieron durante

55 Los animales tratados con Lenti-TH-AADC-CH1 demostraron mejoras significativas en la aquinesia y la postura tan pronto como la segunda semana después de la inyección del vector en comparación con los controles (Friedman $P < 0,001$, *Post-hoc* MW MPTP-largo plazo, $p < 0,05$, MPTP-LacZ $p < 0,05$) (Fig. 1, Fig. 7). Las observaciones clínicas también demostraron una mejora significativa (disminución) en la escala de clasificación clínica global del grupo MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1 en comparación con controles tan pronto como 6 semanas después de la inyección de virus (Friedman $P < 0,001$, *Post-hoc* MW MPTP-largo plazo $p < 0,05$, MPTP-LacZ $p < 0,05$, Fig. 1a). Los animales tratados con MPTP Lenti-TH-AADC-CH1 siguieron recuperándose de forma gradual de la aquinesia y la alteración de la postura sin ninguna ingesta dopaminérgica adicional, alcanzando un 85 % de la distancia total de desplazamiento (Fig. 1b) y un 100 % de actividad de erguirse (Fig. 7) respecto al estado normal, hasta 9 meses después de la inyección de lentivirus. Los animales se sacrificaron en diversos puntos temporales durante el estudio para análisis suplementarios. El animal tratado con Lenti-TH-AADC-CH1 con el punto temporal más largo de

seguimiento se mantuvo en el estudio durante 30 meses después del tratamiento con lentivirus y mostró una alteración motora sostenida de principio a fin. Los animales de control de MPTP-*largo plazo* han permanecido gravemente discapacitados en todos los puntos temporales (Fig. 1). El animal no tratado con Lenti-TH-AADC-CH1 demostró una reversión en la mejora del comportamiento durante el periodo de observación.

5

Ejemplo 2 - Producción local y continua de dopamina en el estriado motor

Para investigar la transferencia génica *in vivo* y la producción de dopamina mediada por lentivirus, se realizó un análisis histológico de la expresión transgénica y se midieron los niveles locales de dopamina en el estriado de los animales del estudio. Los animales tratados con Lenti-LacZ demostraron tener un promedio de 54.947 células transducidas por putamen inyectado, que eran principalmente neuronas (NeuN-ir positiva >90 %, Fig. 10). El análisis histológico también demostró que las neuronas positivas a TH, AADC y CH1 eran evidentes en las cercanías del sitio de inyección en el putamen en animales tratados con MPTP Lenti-TH-AADC-CH1 pero no en controles MPTP-Lenti-lacZ (Fig. 2).

10

15

Para medir cuantitativamente la producción de dopamina mediada por lentivirus en el putamen, se aplicaron dos índices: (1) niveles de dopamina en tejido completo $[DA]_{wt}$, medido por análisis *post-mortem* de perforaciones del estriado: este índice cuantifica los contenidos tanto intracelulares como extracelulares de dopamina (terminales dopaminérgicos de la nigra presinápticos); (2) niveles extracelulares de dopamina $[DA]_{ec}$, medidos por microdiálisis *in vivo*: este índice cuantifica específicamente la dopamina liberada dentro del medio extracelular. Para medir $[DA]_{wt}$, se tomaron perforaciones cerebrales de cada animal en el momento del sacrificio. Lenti-TH-AADC-CH1 aumentó significativamente $[DA]_{wt}$ en el putamen dorsal (Fig. 3a) en comparación con Lenti-LacZ. La comparación de $[DA]_{wt}$ en perforaciones del putamen de macacos no lesionados (sin tratamiento con MPTP n=2, Fig. 3a) reveló que el nivel de remplazo de dopamina en el putamen en que se había inyectado Lenti-TH-AADC-CH1 era del 1-4 % de los niveles normales. Aunque bajo, el grado de remplazo de dopamina, basado en las medidas de $[DA]_{wt}$, refleja la neurodegeneración de la nigra que disminuye las combinaciones de dopamina presináptica dentro del estriado (Fig. 3). Los efectos de Lenti-TH-AADC-CH1 eran específicos para la región del putamen, ya que no se observaba liberación no regulada de dopamina en regiones cerebrales distales, tales como la corteza, el globo pálido y el caudado (Fig. 11). Esto aborda una cuestión de seguridad importante en términos de aplicación clínica para este enfoque de terapia génica.

20

25

30

Para evaluar el tono dopaminérgico dentro del estriado, se midieron los niveles de $[DA]_{ec}$ en primates Normales (no lesionados n=6), MPTP-*largo plazo* (n=7), MPTP-Lenti-LacZ (n=5) y MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1 (n=3). Se colocaron sondas de microdiálisis en el putamen post-comisural para cada animal (véase la sección de métodos, Fig. 12).

35

Se han demostrado diferencias significativas de $[DA]_{ec}$ entre los grupos (KW $p < 0,001$). En los animales MPTP-*largo plazo* y MPTP-Lenti-LacZ, la medida inicial $[DA]_{ec}$ se redujo hasta el 26 % y el 23 % de los niveles normales de dopamina respectivamente, lo que indica una reducción severa de dopamina en estos animales (*Post-hoc* MW $P < 0,001$, Fig. 3b). Lenti-TH-AADC-CH1 aumentó significativamente la medida inicial $[DA]_{ec}$ en comparación con MPTP-*largo plazo* y también MPTP-Lenti-LacZ, alcanzando el 60 % de los niveles normales en el putamen post-comisural (*Post-hoc* MW $P < 0,05$, Fig. 3b). Para evaluar las interacciones dinámicas entre dopamina endógena y exógena, se midió $[DA]_{ec}$ en cada animal después de administración intramuscular de L-Dopa. El resultado indica que el tratamiento con Lenti-TH-AADC-CH1 parece ser sinérgico con el tratamiento de L-Dopa ya que los niveles de dopamina aumentaban de 3.918 pg/ml a 8.843 pg/ml (2,25 veces) en el animal Lenti-TH-AADC-CH1 en comparación con un aumento de 1.697 pg/ml a 1.991 pg/ml (1,17 veces) en el animal MPTP-*largo plazo* (Fig. 3c). Esto podría explicarse por el aumento de AADC en el putamen mediado por transferencia génica de Lenti-TH-AADC-CH1. En línea con la hipótesis, los niveles de L-Dopa en el estriado estaban aumentados solamente en el grupo MPTP-*largo plazo* y MPTP-Lenti-LacZ después de inyección de L-Dopa lo que sugiere que la mayor parte de la L-Dopa inyectada se convertía en DA en animales de control normales y MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1 (Fig. 3d).

40

45

50

La eficacia en el comportamiento observada en animales MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1 no fue una consecuencia de una lesión nigroestriada menos eficaz. Los recuentos de estereología de las neuronas dopaminérgicas en la pars compacta de la sustancia negra (SNpc) mostró una disminución drástica en la cantidad de neuronas TH-ir de los grupos MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1 y también MPTP-LacZ en comparación con animales de control (KW $p < 0,001$; *Post-hoc* MW $p < 0,001$, Fig. 13). Además, no se observó ninguna diferencia entre la cantidad de neuronas TH-ir en los dos grupos lesionados con MPTP (*Post-hoc* MW $p = 0,51$, Fig. S8).

55

Ejemplo 3 - Restauración de la actividad de los ganglios basales

Para determinar el mecanismo por el cual Lenti-TH-AADC-CH1 corregía la disfunción motora, se investigó la actividad neuronal dentro del sistema de ganglios basales.

60

El modelo actual de disfunción de los ganglios basales en PD sugiere que la sobreactividad anormal de los núcleos de salida, tales como el globo pálido interno (GPi) es responsable de los síntomas motores observados en este trastorno. Para determinar si Lenti-TH-AADC-CH1 podría normalizar las actividades eléctricas neuronales en los núcleos de salida de los ganglios basales, macacos normales y tratados con MPTP experimentaron registros

65

unitarios en el GPi. De acuerdo con informes previos, se encontró un aumento significativo (52 %, MW; $p < 0,01$) en la tasa media de disparo de las neuronas del GPi en macacos MPTP no tratados vírgenes al fármaco en comparación con los controles (Fig. 4.a). De forma interesante, la administración de Lenti-TH-AAADC-CH1 al estriado redujo significativamente la alta tasa de disparo anormal y restauró la tasa de disparo de las neuronas del GPi a niveles normales (sin lesión) (Fig. 4.a).

El patrón de disparo neuronal en el GPi también es importante en la fisiopatología de PD, y de ese modo también se analizó la actividad de ráfaga de las neuronas del GPi registradas. El análisis del patrón reveló que la proporción de repuntes por ráfaga y la cantidad de eventos de ráfaga aumentaba significativamente en primates MPTP (15,9 % y 9,7 eventos/célula/min, respectivamente) en comparación con animales de control (3,8 % y 1,7 eventos/célula/min, respectivamente; MW, $p < 0,05$). El tratamiento con Lenti-TH-AAADC-CH1 disminuyó significativamente la proporción de repuntes por ráfaga y la cantidad de eventos de ráfaga en neuronas del GPi hasta niveles que eran muy similares a los observados en animales no lesionados normales (5,3 % y 1,6 eventos/célula/min, respectivamente; $p < 0,05$) (Fig. 4.a).

La hiperactividad neuronal en el núcleo subtalámico (STN) es otra característica fisiopatológica clave de PD, y su neuromodulación eléctrica ha sido terapéuticamente satisfactoria tanto en macacos MPTP como en pacientes de PD. Los estudios metabólicos de los ganglios basales tanto en pacientes con PD como en modelos de primate de degeneración nigroestriada han demostrado alteraciones en los ejes corticobasales. Usando imágenes funcionales con [^{14}C] 2-desoxiglucosa (2-DG) (resolución espacial de 150 μm), se descubrió que el STN en un macaco de control de MPTP mostraba un aumento en la actividad metabólica en comparación con un macaco normal (Fig. 4.b). A las 36 semanas después del tratamiento con Lenti-TH-AAADC-CH1, la actividad metabólica del STN tanto derecho como izquierdo se normalizaba y se parecía mucho a la de un animal no lesionado (Fig. 4.b).

Ejemplo 4 - Estudios de disquinesia

Un reto principal en PD es restaurar la función dopaminérgica sin inducir ningún movimiento disquinésico. Como las anormales histológicas del estriado pueden inducir disquinesia, se investigaron las alteraciones morfológicas después de la transferencia génica. Mientras todas las trayectorias de aguja estaban localizadas en el putamen (Fig. 14), los marcadores neuronales (Neu-N) no mostraba anormalidades en el animal al que se había inyectado Lenti-TH-AAADC-CH1. Se observó una ligera disminución en las inmunorreactividades GFAP y CD68 en animales tanto Lenti-LacZ como Lenti-TH-AAADC-CH1. Sin embargo, esto estaba restringido a la región que rodea la trayectoria de aguja (Fig. 15). Se realizó un estudio de neuroimágenes usando MRI ponderada a T2*, un método sensible para la detección de patología cerebral local. Se descubrió que el putamen y las áreas restantes del cerebro estaban libres de cualquier señal T2* anormal (Fig. 16).

Una cuestión crítica para la aplicación clínica de Lenti-TH-AAADC-CH1 es el potencial del vector de inducir disquinesias en pacientes con PD. La evaluación de las disquinesias se realizó en los estudios de eficacia descritos anteriormente usando un novedoso método para la cuantificación de disquinesia basado en análisis de vídeo de disquinesia (VDA) que evalúa el intervalo completo de movimiento disquinésico de forma continua durante la secuencia observada de vídeo, usando un protocolo normalizado. Lenti-TH-AAADC-CH1 no indujo ningún movimiento disquinésico en primates MPTP hasta 30 meses, en contraste con la ingesta de L-Dopa oral en animales MPTP de control ($n = 5$) (Fig. 5). Además, los primates MPTP que recibieron Lenti-TH-AAADC-CH1 presentaron una reducción en su distonía en estado inactivo en comparación con primates MPTP y primates MPTP-Lenti-lacZ (MW, $p < 0,05$) (Fig. 5).

Para imitar las condiciones clínicas, estos animales vírgenes al fármaco se expusieron adicionalmente con administración sistémica aguda de L-Dopa, después con un agonista dopaminérgico D1/D2 de acción corta pro-disquinésico (apomorfina). La ingesta de L-Dopa oral y la inyección de apomorfina mejoró la actividad locomotora de primates MPTP-*largo plazo* y MPTP-LacZ hasta niveles similar a los de primates normales (MW, $p < 0,05$) (Fig. 17), mientras que la actividad locomotora de primates normales vírgenes al fármaco y MPTP-Lenti-TH-AAADC-CH1 permanecía inalterada. Además, los animales normales y MPTP-Lenti-TH-AAADC-CH1 estaban libres de disquinesia después de una dosis convencional de L-Dopa y también de apomorfina, mientras que los animales MPTP-*largo plazo* y MPTP-Lenti-LacZ presentaban movimientos debilitantes coreiformes y distónicos (MW, $P < 0,05$) (Fig. 5).

Habiendo demostrado la capacidad de la terapia génica con dopamina de prevenir la disquinesia, el enfoque se ensayó posteriormente en un modelo de primate de disquinesia inducida por L-Dopa (LID) para ver si el tratamiento con ProSavin podría revertir las disquinesias que ya estaban establecidas en el modelo animal.

Se trató un grupo de seis primates tratados con MPTP con L-Dopa oral diaria, de forma repetida, de 20 mg/kg/día hasta 100 mg/kg/día, ajustada para cada individuo, hasta que los animales desarrollaron LID sostenida y severa (animales LID-MPTP) ($n = 6$). Los animales después recibieron inyecciones bilaterales en el estriado motor (realizadas en los primates vírgenes al fármaco tratados con MPTP) de Lenti-TH-AAADC-CH1 ($n = 3$) o Lenti-lacZ ($n = 3$). Para imitar estrechamente la situación del ensayo clínico en pacientes LID PD, entonces se ajustó la dosis diaria del tratamiento con L-Dopa para cada animal individual (en el grupo MPTP-LacZ y MPTP-Lenti-TH-AAADC-CH1) para mantener la actividad locomotora diariamente a este valor de lesión pre-MPTP. Por tanto, los cambios en la dosis del

tratamiento diario con L-Dopa se basaban solamente en el estado motor de fármaco "inactivo" (evaluado con VMA). Este enfoque se usa actualmente para encontrar dosis óptimas de L-Dopa en pacientes a los que se ha implantado electrodos de estimulación cerebral profunda (Bejjani et al. (2000) Ann Neurol 47:655-658). Después de inyecciones en el estriado de Lenti-TH-AADC-CH1, los animales LID-MPTP se recuperaron progresivamente de su parkinsonismo en el estado de L-Dopa inactivo. Por consiguiente, el protocolo de gestión del tratamiento condujo a una disminución progresiva de la ingesta promedio de L-Dopa en los animales LID-MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1 desde 70 mg/kg/día hasta 30 mg/kg/día a los 6 meses después de la inyección de vector, mientras que el tratamiento diario con L-Dopa era estable a 67 mg/kg/día en LID-MPTP-Lenti-LacZ ya que no se observaba recuperación del comportamiento.

En el estado de L-Dopa activo (exposición periódica con una dosis establecida de 40 mg/kg de L-DOPA), el nivel de disquinesia en los animales tratados con Lenti-TH-AADC-CH1 estaba disminuido y alcanzaba menos del 25 % de sus niveles iniciales (Fig. 18). Por el contrario, el primate LID-MPTP que recibió Lenti-LacZ permaneció significativamente alterado y siguió mostrando un nivel constante de disquinesia en respuesta a exposiciones a L-DOPA en todo el estudio (Fig. 18).

Estos resultados indican que el tratamiento con Lenti-TH-AADC-CH1 tiene el potencial de no solamente proporcionar eficacia terapéutica a un paciente con PD que ya ha desarrollado disquinesias a partir de tratamiento a largo plazo con L-Dopa, sino que también revierte el mecanismo fisiológico de las disquinesias y por tanto evita la aparición posterior después de terapia con L-Dopa.

Discusión

Una hipótesis principal para la aparición de disquinesia en PD es que es una consecuencia de la estimulación dopaminérgica pulsátil intermitente de receptores post-sinápticos en el estriado, combinada con la degeneración extensiva de las neuronas dopaminérgicas del haz nigroestriado. Aquí se demuestra que el suministro continuo por lentivirus de dopamina en el estriado mediaba la corrección a largo plazo de las deficiencias motoras (hasta 30 meses) y, en contraste con el tratamiento repetido con L-DOPA, no provocaba la aparición de disquinesias. Esto indica que no es el grado de degeneración de la nigra *per se* lo que causa la disquinesia inducida por el fármaco, sino la ausencia de un tono dopaminérgico constante en el estriado.

La explicación más probable para los resultados observados es que la terapia génica ha restaurado suficiente dopamina para mantener el tono dopaminérgico en el estriado y que esto restaura el funcionamiento normal de las redes de los ganglios basales como se demuestra por la normalización de la actividad neuronal de GPi y el metabolismo del STN. No se encontraron otros cambios neurológicos o anatómicos que pudieran apoyar una hipótesis alternativa. Los efectos terapéuticos descritos en este documento se han conseguido con transferencia génica moderada y localizada que genera niveles sub-fisiológicos de dopamina. Asumiendo que la imagen instantánea obtenida con microdiálisis refleja la concentración de dopamina activa en la superficie celular/espacio extracelular, nuestro procedimiento de terapia génica restaura la concentración de dopamina en el putamen a aproximadamente el 50 % de los niveles normales. ¿De qué manera el 50 % del remplazo de dopamina es responsable de la drástica corrección del comportamiento? Este resultado es coherente con la observación en la enfermedad humana de Parkinson de que los síntomas motores se observaban cuando más del 60 % de las neuronas dopaminérgicas habían degenerado. Por lo tanto, se esperaría que un moderado remplazo de dopamina en el estriado proporcionara beneficio terapéutico. Además, la mejora en el comportamiento observada en este estudio también puede reflejar una combinación de la producción lentivírica de dopamina por debajo de lo normal y los niveles reducidos del transportador de dopamina (DAT) en el estriado parkinsoniano debido a la disminución en la cantidad de terminales dopaminérgicos sinápticos presinápticos. Se cree que el DAT controla la actividad espacial y temporal de la liberación de dopamina y niveles inferiores pueden aumentar la actividad y/o distribución de la dopamina liberada desde las neuronas del estriado en que se ha transducido Lenti-TH-AADC-CH1 (Giros et al (1996) Nature 379:606-612).

El tratamiento quirúrgico validado actual para PD implica la estimulación eléctrica del STN o el GPi y esto previene las complicaciones motoras inducidas por L-Dopa restaurando la actividad eléctrica normal dentro de estos núcleos. Es posible que la terapia génica pueda proporcionar estos beneficios terapéuticos, pero sin los efectos secundarios neuropsicológicos observado por la estimulación eléctrica indeseada de regiones no motoras del STN.

Un enfoque alternativo para conseguir la producción continua de dopamina en el estriado es usar injerto celular de tejido fetal o células madre. Sin embargo, las disquinesias inducidas por injerto y la cuestión del desarrollo de la patología PD en células trasplantadas aún no se ha resuelto. Los datos presentados aquí indican que ahora se ha conseguido el reto médico de desarrollar terapias contra PD capaces de estimulación local y continua de receptores de dopamina.

Sumario de métodos

Tecnología de vector lentivírico

5 Se diseñó un vector lentivírico tricistrónico que codifica los genes para TH, AADC y CH1 (Lenti-TH-AADC-CH1). Para mejorar la producción de dopamina mediada por el vector, se hicieron varios cambios en el genoma original del vector de EIAV que expresaba el casete tricistrónico llamado pONY8.1TSIN (Azzouz et al (2002) J. Neurosci. 22:10301-10312). Estos cambios condujeron a un aumento de al menos 2 log en la producción de dopamina por genoma integrado, evaluada *in vitro* después de transducción de células HEK293T humanas (Fig. 6).

10

Reducción de dopamina local en modelos animales

15 Para el modelo de PD avanzada en primates no humanos, se administró la neurotoxina selectiva MPTP de forma sistémica a *Macaca fascicularis* adultos hasta que alcanzaron un síndrome parkinsoniano bilateral severo y estable, incluyendo aquinesia, postura flexionada, alteración del equilibrio y temblores. Antes del tratamiento con MPTP, todos los primates tenían un valor de 0 en la escala de clasificación clínica (CRS). Después de MPTP, pero antes de ninguna inyección de lentivirus, los macacos presentaban un aumento significativo en el CRS que se aproximaba al valor máximo de discapacidad (máx = 14) en comparación con el estado pre-MPTP de control (estado normal; Fig. 1.a). La gravedad de la alteración motora se cuantificó adicionalmente usando análisis cuantitativo del movimiento en vídeo y se encontró que, en comparación con el estado normal, los macacos MPTP presentaban una marcada aquinesia (distancia recorrida = 3,7 % del estado normal; Fig. 1.b) y alteración de la postura (actividad de erguirse = 5 % del estado normal; Fig. S2). La gravedad del parkinsonismo inducido por MPTP fue estable sobre el curso del experimento completo en animales MPTP de control (Fig. 1 y 7). El análisis neuropatológico demostró degeneración nigroestriada selectiva, incluyendo pérdida tanto estructural como funcional en la pars compacta de la sustancia negra (Fig. 8) y una drástica disminución de las fibras inmunorreactivas a TH y AADC en el estriado (Fig. 2). La desnervación del estriado, evaluada por inmunoreactividad a TH (Fig. 2) y el transportador de dopamina (DAT) (Fig. 9) demostró un patrón heterogéneo de degeneración que se parece al observado en PD, estando el putamen más afectado que el núcleo caudado, y estando la parte dorsolateral del putamen (putamen 'motor') más afectado que la su parte ventral (putamen 'cognitivo').

30

La construcción y producción de vectores lentivíricos se realizó por Oxford BioMedica. Los vectores lentivíricos se obtuvieron de EIAV, y codificaban TH-AADC-CH1 en el mismo vector policistrónico (Lenti-TH-AADC-CH1), o lacZ como control (Lenti-lacZ). Se usaron veintiséis *Macaca fascicularis* machos adultos. El agente sintético 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) es una neurotoxina que se transforma *in vivo* en MPP+, que tiene tanto alta afinidad como alta toxicidad para neuronas dopaminérgicas. El macaco MPTP se considera como el más predecible entre los modelos experimentales preclínicos de PD. Se usó un protocolo subcrónico para intoxicación con MPTP (0,2 mg/kg/día). Se usó análisis objetivo del comportamiento para determinar el momento en que debía detenerse el tratamiento con MPTP. Tan pronto como los primates habían alcanzado los criterios de comportamiento que correspondían al modelo de PD avanzada, se detuvo el tratamiento con MPTP. Se prestó especial atención a la alimentación y el cuidado de los animales, especialmente después de la lesión con MPTP. Los vectores lentivíricos se inyectaron en el putamen motor de macacos MPTP. Todos los procedimientos quirúrgicos usaron estereotaxia basada en MRI individual. El análisis del comportamiento usó tanto enfoques cuantitativos automatizados de vídeo como evaluación clínica cualitativa hecha en condiciones ocultadas estrictas. Se realizaron inmunohistoquímica y estereología usando técnicas convencionales. La producción de dopamina se evaluó por análisis de HPLC de muestras de microdiálisis *in vivo* y tejido cerebral post-mortem. Se administró por vía oral L-Dopa, excepto durante los experimentos de microdiálisis donde se inyectó i.m. Se inyectó i.m. apomorfina. Se realizó registro de electrofisiología de células individuales usando técnicas convencionales. Se realizaron imágenes funcionales por evaluación de la utilización de glucosa cerebral local usando [¹⁴C]-2-desoxiglucosa (2-DG)^{43,44}. Los datos se analizaron con ensayo de Kruskal-Wallis (KW) o Friedman (el equivalente no paramétrico de ANOVA de medidas repetidas) y después, con ensayo post-hoc de Mann-Whitney (MW) en los puntos temporales individuales, corregidos para múltiples comparaciones.

50

Animales. Todos los estudios en animales se realizaron de acuerdo con la convención europea para el cuidado de animales (86-406) y la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals del NIH. Se incluyeron veintiséis *Macaca fascicularis* machos adultos, que pesaban 5-7 kg, en este estudio. Los animales se alojaron individualmente con un ciclo de 12/12 h de luz/oscuridad. Después de las inyecciones de vector lentivírico, se realizaron experimentos usando procedimientos Biosafety de nivel III (BSL3).

55

Diseño experimental. Primero se administró neurotoxina MPTP a 23 macacos hasta que desarrollaron parkinsonismo severo, estos después se dividieron en grupos experimentales de acuerdo con los siguientes experimentos:

60

1. En el primer experimento se estudiaron los efectos a largo plazo de la producción dopaminérgica local y continua mediada por Lenti-TH-AADC-CH1. Se aleatorizaron dieciocho primates no humanos y se asignaron a 3 grupos: inyección en el estriado de Lenti-TH-AADC-CH1 (grupo MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1, n = 6 hasta la octava semana, después n = 3 hasta el noveno mes), inyección en el estriado de Lenti-LacZ (MPTP-Lenti-LacZ,

65

n = 6 hasta la octava semana después n = 3 hasta el noveno mes) o sin tratamiento (grupo MPTP-*largo plazo*, n = 6 hasta la octava semana después n = 3 hasta el noveno mes). Los animales después se observaron de 2 hasta 30 meses. Se incluyó un subconjunto de estos primates para estudios de histología, microdialisis, electrofisiología y metabolismo.

2. En el segundo experimento se investigó la incidencia de disquinesia en los primates parkinsonianos que recibieron terapia génica de dopamina (MPTP Lenti-TH-AADC-CH1, n = 6 hasta la octava semana después n = 3 hasta el noveno mes). La incidencia de disquinesia se comparó con la observada en primates parkinsonianos que recibieron tratamiento dopaminérgico farmacológico oral. Para el último grupo, cinco macacos MPTP recibieron diariamente L-Dopa oral durante 12 semanas (grupo MPTP-L-Dopa, n = 5).

3. En el tercer experimento, se estudió el potencial de inducción de disquinesia en macacos MPTP exponiéndolos a un agonista dopaminérgico D1/D2 de acción corta, apomorfina, después con una dosis oral aguda de L-Dopa. Los animales del grupo MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1 (n = 3), el grupo MPTP-Lenti-LacZ (n = 3), el grupo MPTP-*largo plazo* (n = 3) o los macacos no lesionados normales (n = 3) se expusieron a apomorfina y a L-Dopa, 32 semanas después de que cesara la administración de MPTP, y 24 semanas después de la transferencia génica (para animales MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1 *largo plazo*), y se contó la cantidad de disquinesias que expresaban con un software específico (The Observer®, Noldus).

4. En el cuarto experimento, se estudió el potencial de estimulación dopaminérgica continua mediada por Lenti-TH-AADC-CH1 para reducir la expresión de LID en animales MPTP disquinesicos estimulados. Un subconjunto de 3 primates MPTP se volvió disquinesico (valor máximo sobre el índice de disquinesia) por ingesta diaria de L-Dopa oral que recibieron inyección en el putamen motor de Lenti-TH-AADC-CH1 (n = 2) o Lenti-LacZ (n = 1). Los animales después se expusieron a L-Dopa y se evaluó la cantidad de disquinesias con un software específico (The Observer®, Noldus).

Para todos los animales tratados con MPTP, el estudio completo implicó evaluación clínica diaria, más una serie de análisis del comportamiento. Se incluyó un animal normal adicional, no tratado con MPTP para estudios de inmunohistoquímica y bioquímica. Se incluyeron dos animales tratados con MPTP y dos animales no lesionados en los estudios de imágenes y electrofisiológicos. Se realizaron estudios de imágenes de autorradiografía en la fase final de los experimentos, un mes después de los registros electrofisiológicos en el GPi.

Producción vírica. Para mejorar la producción de dopamina mediada por el vector, se hicieron varios cambios al genoma original del vector de EIAV que expresaba el casete tricistrónico llamado pONY8.1TSIN (Fig. 9). Esta construcción contiene las isoformas catalíticas de los tres siguientes genes: L-aminoácido aromático descarboxilasa humana (AADC, n.º de acceso M76180), tirosina hidroxilasa humana (hTH-2, n.º de acceso X05290) y GTP ciclohidrolasa 1 humana (CH1, n.º de acceso U19523). Estos tres genes se marcaron usando diferentes marcas peptídicas N-terminales. La nueva construcción, pONY8.9.4TY, se generó optimizando los codones de las secuencias para TH, AADC y CH1 y retirando todas las marcas N-terminales. Esto se realizó por Operon (ahora Qiagen, Valencia, CA 91355). El orden de los genes en el casete tricistrónico también se cambió de modo que la fase de lectura abierta de TH esté primera seguida de AADC y CH1 (Lenti-TH-AADC-CH1). Tanto el promotor como las secuencias IRES usadas se mantuvieron igual que en pONY8.1TSIN (Fig. 9). Además, la estructura se cambió del siguiente modo: todos los codones potenciales de inicio ATG en gag se cambiaron a ATTG, se insertó un casete de expresión de Neo cadena abajo de gag y se insertó el WPRE en el extremo 3' del casete tricistrónico para potenciar la expresión. La Figura 19 muestra la secuencia de pONY8.9.4TY. Estos cambios condujeron a un aumento de al menos 2 log en la producción de dopamina por genoma integrado, evaluado *in vitro* después de la transducción de células HEK293T humanas (Fig. 9). Se usó una versión codificante de LacZ de este vector (pONY8.9NCZ) como control. pONY8.9NCZ (Lenti-lacZ) contiene la ORF de LacZ en lugar del casete tricistrónico.

Generación de vector vírico. Se sembraron células HEK293T en DMEM-HEPES con FCS al 10 % (v/v) a una densidad de $4,4 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ en una fábrica celular de 10 capas. El siguiente día, las células se transfectaron con pESYNGP (una construcción de expresión de gag/pol de EIAV de codones optimizados), pRV67 (un plásmido de expresión de envuelta de VSV-G) y EIAV-lacZ (un genoma del vector de EIAV que expresa LacZ bajo el control del potenciador/promotor inmediato tardío del citomegalovirus humano, o Lenti-TH-AADC-CH1) usando Fugene-6 (Roche). Dieciséis horas después de la transfección, las células se trataron con butirato sódico 10 mM durante 6 horas y después el medio de cultivo se reemplazó con medio deficiente en butirato. A las 40 horas después de la transfección, se recogió el medio de cultivo, se centrifugó a 1000 x g durante 5 min y se filtró a través de una unidad de filtro de 0,45 µm. El vector se concentró por centrifugación a baja velocidad (6000 x g durante 16 h a 4 °C) seguido de ultracentrifugación (50000 x g, durante 90 minutos a 4 °C). El vector se resuspendió en tampón TSSM que consistía en cloruro sódico (100 mM), Tris, pH 7,3 (20 mM), sacarosa (10 mg/ml) y manitol (10 mg/ml), se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C. El título del vector se obtuvo realizando un ensayo de integración de ADN. En resumen, esto implica transducir células HEK293T con el vector vírico y pasar las células durante aproximadamente 10 días. El título de Lenti-lacZ fue de $3,5 \times 10^9$ TU/ml y de Lenti-TH-AADC-CH1 de $1,0\text{-}2,7 \times 10^8$ TU/ml.

Comportamiento. Todos los animales se evaluaron diariamente para su estado clínica general con especial atención puesta sobre su estado nutricional. Al mismo tiempo, se evaluó el estado neurológico general de cada macaco tanto

antes como después de las inyecciones de lentivirus. Para cuantificar de forma objetiva nuestras observaciones neurológicas, los animales se grabaron en vídeo durante 30 minutos antes de lesionarlos con MPTP y a intervalos regulares después de las inyecciones de virus. Los vídeos después se analizaron fuera de línea por un examinador desconocedor de las condiciones experimentales. Se adaptó una escala de clasificación clínica a partir de la escala parkinsoniana de primates por MPTP de Papa y Chase (postura 0-2, deambulación 0-2, temblores 0-2, movilidad general 0-4, movimientos manuales 0-2, escalada 0-4; un valor de 0 corresponde a un mono normal). El análisis cuantitativo de disquinesia se realizó usando un software de recuento de movimientos (The Observer 7, Noldus, Wageningen, Países Bajos) que permitía contar movimientos predefinidos (corea y distonía de los miembros superiores e inferiores, tronco, cara y cuello para movimientos disquinésicos) durante el periodo de grabación en vídeo. El análisis del movimiento en vídeo se realizó usando un software de rastreo del movimiento (Ethovision 3, Noldus, Wageningen, Países Bajos) que permitía una medición objetiva de la distancia total de desplazamiento (distancia recorrida, cm), la velocidad máxima (velocidad máxima, cm/s) y la frecuencia del comportamiento de erguirse (erguirse, cantidad de eventos) durante el periodo de grabación en vídeo.

Lesión por MPTP. Todos los primates recibieron una dosis intramuscular diaria de 0,2 mg/kg de MPTP (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri) hasta que alcanzaron un síndrome parkinsoniano bilateral estable severo. La administración de MPTP se detuvo cuando los animales alcanzaron un aumento de la escala de clasificación clínica hasta ≥ 10 y una disminución de la distancia recorrida ≤ 500 cm/30 min, velocidad máxima ≤ 5 cm/s/30 min, erguirse $\leq 5/30$ min, evaluados por la sesión de grabación en vídeo realizada 1 semana después de la última inyección de MPTP. Después se comprobó la estabilidad del síndrome parkinsoniano, usando los mismos criterios de comportamiento, durante las 8 semanas después de la última inyección de MPTP.

Procedimiento de inyección de virus. Bajo anestesia generalizada con una mezcla de ketamina y xilazina (15 mg/kg + 1,5 mg/kg, cada hora), nueve macacos MPTP parkinsonianos recibieron cinco inyecciones estereotáxicas de Lenti-lacZ o Lenti-TH-AADC-CH1 de forma bilateral (10 μ l/inyección es decir 50 μ l/putamen y un total de 100 μ l por animal) en el putamen comisural (10 μ l) y post-comisural (10 μ l x 4) en condiciones estériles. Las coordenadas diana se basaron en directrices de MRI (imán 1,5-T MR, sistema médico de General Electric, Waukesha, Wisconsin) usando métodos de neuronavegación. La primera inyección estaba dirigida al nivel comisural del putamen seguido de un grupo de 2 inyecciones (segunda y tercera inyección, separadas por 1 mm) 2 mm caudales de la comisura anterior y por un segundo grupo de 2 inyecciones (cuarta y quinta inyección, separadas por 1 mm) 5 mm caudales de la comisura anterior. Todas las inyecciones se situaron en la parte dorsolateral del putamen. El vector lentivírico se inyectó manualmente en cada una de estas 10 trayectorias estereotáxicas a través de una jeringa Hamilton de 10- μ l a una velocidad de 1 μ l/min. La aguja se dejó *in situ* durante 2 min adicionales. Todas las trayectorias de aguja estaban localizadas de forma bilateral en el putamen, como se observa por tinción de Nissl y estudios inmunohistoquímicos (Fig. 14).

Inmunohistoquímica. Ocho semanas después de las inyecciones de vector lentivírico, seis macacos se anestesiaron de forma profunda con ketamina (15 mg/kg), se sacrificaron por una sobredosis de pentobarbital (100 mg/kg, por vía intravenosa; Sanofi, Francia) y se perfundieron de forma transcardiaca con solución salina fría. Se retiraron los cerebros inmediatamente, se hemiseccionaron mediante un corte sagital en la línea media y se cortaron en un rebanador de cerebros de mono. Los cortes a través del putamen derecho se picaron para estudios de HPLC, usando punzones cilíndricos para cerebros (diámetro interno 1,5 mm). La longitud de los taladros era de aproximadamente 1 mm. Los cortes de tejido después se sumergieron en una solución de fijación de paraformaldehído al 4 % frío durante 6 días, se lavaron en una serie de soluciones frías escalonadas de sacarosa durante 4 días y se seccionaron en un plano coronal en un micrótomos de congelación (secciones de 40 μ m de grosor). Las secciones para marcaje inmunohistoquímico se incubaron primero durante 48 h a temperatura ambiente o 72 h a 4 °C en solución salina con tampón fosfato que contenía triton-X100 al 0,5 %, albúmina sérica bovina al 2 %, suero normal al 3,5 % y la dilución apropiada del primer anticuerpo: anti-TH, dilución 1:1000 (Institut Jacques Boy, Reims, Francia); anti-AADC, dilución 1:250 (Chemicon, CA); anti-dopamina, dilución 1:1000 (AbCam, Cambridge, RU), anti-CHI, 1:3000 (una amable donación de Ernst Werner, University of Innsbruck); anti- β -Gal, dilución 1:2000 (Chemicon, CA), anti-NeuN, dilución 1:5000 (Chemicon, CA), anti-DAT, dilución 1:7500 (Chemicon, CA), anti-GFAP, dilución 1:30000 (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), anti-CD68, dilución 1:100 (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Después de incubación en el antisuero primario, las secciones se procesaron con el método de peroxidasa de avidina-biotina. El transgén de TH usado en el presente vector lentivírico es una forma truncada (trunc-TH2) de la isoforma 2 de TH humana (hTH2). Para estudiar la expresión de TH transgénica en el estriado, se usó un anticuerpo contra TH que reconoce tanto las unidades reguladoras N-terminales como las unidades catalíticas C-terminales de hTH2.

Procedimiento de inmunofluorescencia de doble marcaje. Para identificar los tipos celulares transducidos con vectores de EIAV, se empleó una técnica de inmunofluorescencia indirecta de doble marcador. Se empleó una técnica de inmunofluorescencia indirecta de doble marcador para marcar células β Gal-positivas en el estriado de animales a los que se había inyectado EIAV-lacZ con marcadores neuronales (NeuN) y de la glía (GFAP). Para cada experimento, se inhibió la tinción de fondo con una incubación de 1 h en una solución de bloqueo (suero normal de cabra al 4,5 % y Triton X-100 al 0,2 % en PBS, pH 7,4) a temperatura ambiente. Las secciones después se incubaron en anticuerpo policlonal de conejo primario contra β Gal (AbCam, 1:1000) durante una noche a temperatura ambiente. Después de los lavados, las secciones se incubaron en el anticuerpo de cabra secundario

anti-IgG de conejo acoplado al marcador fluorescente Alexa 488 (1:200) durante 1 h. Después de los lavados, las secciones se incubaron en uno de los siguientes anticuerpos primarios: monoclonal de ratón anti-NeuN (Chemicon; 1:1000), monoclonal de ratón anti-GFAP (Sigma; 1:3000), durante una noche a TA. Después de incubación en el anticuerpo secundario (de cabra biotinilado anti-IgG de ratón 1:200) durante 1 h a temperatura ambiente, las secciones se colocaron en estreptavidina marcada con fluorolink Cy 3 (1:1000) durante 1 h a temperatura ambiente. Todas las imágenes de fluorescencia se analizaron con el microscopio Zeiss Confocal Fluoroview equipado con láseres de argón y He-Ne.

Análisis estereológico. Se usó análisis estereológico para los recuentos celulares. Para evaluar la cantidad total de células EIAV-positivas dentro del estriado, es decir, la cantidad de células transducidas, se tiñeron secciones alternas para inmunorreactividad a β -galactosidasa (β Gal-ir) y células positivas contadas en todo el estriado completo de animales a los que se había inyectado Lenti-lacZ. Para evaluar la cantidad total de células dopaminérgicas restantes dentro de la sustancia negra, se contaron secciones alternas teñidas para inmunorreactividad a tirosina hidroxilasa (células TH-ir) en todo el SNpc completo de controles normales no lesionados, animales a los que se había inyectado MPTP-Lenti-lacZ y MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1. El recuento estereológico de las células se procesó usando el software de estereología de Olympus C.A.S.T.-Grid (Olympus Denmark, Albertslund, Dinamarca) y un sistema de análisis de imágenes asistido por ordenador (Olympus Pentium II) conectado a un microscopio Olympus Provis (Olympus France, Rungis, Francia) equipado con una videocámara (HAD Power 3CCD, Sony) y una plataforma motorizada controlada por ordenador. Los análisis estereológicos usaron el procedimiento de fraccionamiento óptico, un método estereológico basado en el diseño para estimar la cantidad total de estructuras en una fracción conocida de un espacio de referencia definido sin verse afectado por la contracción tisular.

Para el recuento de células EIAV-positivas en el estriado, se aceptó un coeficiente de error de $<0,10$ debido a la estimación. Para las células SNpc TH-ir, se aceptó un coeficiente mayor de error ($<0,35$). Esto estaba relacionado con la drástica disminución en la cantidad de células TH-ir después de la intoxicación con MPTP, dejando muy pocos objetos que contar.

Administración de L-Dopa. Los animales en el grupo de L-Dopa se trataron de forma crónica con una dosis oral diaria promedio de 20 mg/kg de L-Dopa y benserazida (a una relación 4:1, Modopar dispersible®, Roche, Francia) (llamada "L-Dopa" a partir de ahora). Durante la exposición a L-Dopa de los primates no sensibilizados MPTP, Lenti-LacZ y Lenti-TH-AADC-CH1, los animales recibieron una única dosis oral de 20 mg/kg de L-Dopa y benserazida (a una relación 4:1, Modopar dispersible®, Roche, Francia). Durante el experimento de microdiálisis, los primates se expusieron a una única dosis de 40 mg/kg i.m. de L-Dopa y benserazida (a una relación 4:1, metil-éster-L-Dopa, Sigma Aldrich, St Louis, Missouri).

Administración de agonista D1/D2 de acción corta. Se administró apomorfina (Aguettant, Lyon, Francia), un agonista D1/D2 no selectivo de acción corta, de forma sistémica a una dosis (0,1 mg/kg i.m.) conocida por inducir disquinesia en macacos tratados con MPTP.

Microdiálisis. Los primates se anestesiaron con ketamina y xilazina (15 mg/kg + 1,5 mg/kg, cada hora) y se colocaron en una plataforma estereotáxica. La temperatura corporal se estabilizó a 37 °C durante todo el experimento con una manta termostática. Las sondas de microdiálisis (CMA/12, longitud de membrana de 5 mm, punto de corte de 20 kDa; CMA Microdialysis, North Chelmsford, MA) se implantaron de forma bilateral en el estriado. Las sondas de microdiálisis se colocaron en el putamen post-comisural de cuatro animales normales no lesionados, cuatro animales MPTP, tres animales MPTP-Lenti-LacZ y dos animales MPTP-Lenti-TH-AADC-CH1. Las sondas se perfundieron con aCSF (en mM: NaCl 147, KCl 2,7, CaCl₂ 1,2 y MgCl₂ 0,85) a una velocidad de 2 μ l/min. Los microdializados se recogieron cada 15 min en un colector refrigerado de fracciones y se congelaron a -80 °C hasta el análisis. Después del implante de cada sonda en el cerebro del primate, se recogieron muestras de microdiálisis durante un periodo de estabilización de 2 horas que permitió la recuperación de cualquier aumento transitorio en la liberación de neurotransmisor debido a traumatismo procesar. Las muestras iniciales entonces se recogieron durante la siguiente hora. Después, tras la recogida de las muestras iniciales, los animales se sometieron a una exposición aguda a dopamina (dopamina 40 mg/kg i.m.) o L-Dopa (éster metílico de L-Dopa, 40 mg/kg i.m.) y se recogieron muestras adicionales de microdiálisis de forma continua durante un periodo de 2 horas. Al final de la sesión de microdiálisis, se generaron muestras de control adicionales realizando microdiálisis durante 30 minutos en una solución de concentración conocida de dopamina (1 μ M) después de la retirada de la sonda del putamen. Esto permite el cálculo de la eficacia de cada sonda y posibilitará la estimación de la concentración real de dopamina en el putamen. Después de cada experimento, se comprobó la localización de las sondas usando MRI ponderada a T2*.

Medición de dopamina *post-mortem*: niveles de dopamina de tejido completo [DA]_{wt}. Se usó cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con detección electroquímica para medir los niveles en el estriado de catecolaminas en perforaciones cerebrales y muestras de microdiálisis. En resumen, se homogeneizaron perforaciones cerebrales en tampón de homogeneización (HEPES 1,2 mM, Triton X-100 al 1 %, glicerol al 10 % suplementado con inhibidores de proteasa, pH 7,2). Las catecolaminas se extrajeron mezclando los homogenizados tisulares con una décima parte de un volumen de tampón de extracción (ácido perclórico 0,4 M, EDTA 0,1 mM pH 8,0). Los sobrenadantes después se

centrifugaron y se filtraron. Las muestras de microdiálisis se trataron con una sexta parte de un volumen de ácido perclórico 0,2 M. Los sobrenadantes o muestras de microdiálisis se aplicaron a un sistema de HPLC (Agilent 1100) equipado con un detector electroquímico ESA Coulochem II (ESA Analytical). Las catecolaminas de los homogenados cerebrales se separaron usando una columna HR-80 (ESA Analytical) y la fase móvil Cat-A-Phase (ESA Analytical) a un caudal de 1,5 ml/min y después se detectaron de forma electroquímica.

Medición de dopamina *in vivo*: niveles extracelulares de dopamina [DA]_{ec}. La sensibilidad del sistema de HPLC se validó ejecutando patrones de catecolamina a través del sistema de HPLC y detección y la evaluación de las trazas de salida. Se prepararon soluciones patrón que contenían L-Dopa, DOPAC, HVA y dopamina en el intervalo de 10-1000 pg/ml en una solución 1:5 de CSF artificial en diluyente convencional para asegurar la misma señal de fondo que las muestras de microdiálisis. Se ejecutaron cien microlitros de cada solución patrón (0,5-100 pg de cada catecolamina) a través del sistema de HPLC y se analizó la salida para cada metabolito analizado. Se generaron curvas patrón para cada metabolito a partir de estos datos y se calculó la concentración de catecolaminas en las muestras de microdiálisis a partir de estas curvas.

Se descongelaron muestras de microdiálisis y se añadieron 5 µl de ácido perclórico 0,2 M a cada muestra antes del análisis de HPLC. Las muestras se diluyeron 1 en 5 en diluyente convencional (ESA) y se inyectaron 100 µl para cada análisis. Se requirió dilución adicional (1/10) para el análisis de los niveles de L-Dopa y HVA usando la muestra restante. Las muestras se ejecutaron en una máquina de HPLC Agilent 1100 y se separaron usando una columna MD-150 (ESA Analytical) y la fase móvil MD-TM (ESA Analytical) a un caudal de 0,6 ml/min y después se detectaron de forma electroquímica usando un detector electroquímico Coulchem II (ESA). Para mejorar la eficacia de la detección de dopamina se usó una celda de microdiálisis especializada (5014B, ESA) junto con el detector para permitir la detección de niveles bajos (<1 pg) de dopamina.

Electrofisiología. Bajo anestesia con ketamina/xilazina (15 mg/1,5 mg/kg) controlada de forma constante, se registraron las actividades de una única unidad solamente durante un periodo de tiempo en que se observaba ritmo cardiaco, frecuencia respiratoria y flujo espiratorio de CO₂ estables. Se implantó de forma estereotáxica un microelectrodo de tungsteno recubierto con vidrio bajo directrices de MRI en el globo pálido interno. Las localizaciones de registro se verificaron por reconstrucción histológica de las trayectorias de los electrodos. Se amplificó la señal y se filtró con filtro pasabanda (300-5000 Hz) usando Leadpoint (Medtronic, Minneapolis, MN). Primero se extrajo el umbral o el patrón de los potenciales de acción de una única célula, y solamente las unidades bien aisladas se seleccionaron para análisis adicional. Se registraron veintidós trenes de repunte y se almacenaron para análisis fuera de línea. Se extrajo la actividad neuronal usando un algoritmo de acoplamiento de umbral o patrón (Dataview4.5; W.J. Heitler, University of St. Andrews, Escocia), y se calcularon las tasas medias de disparo. La descarga en ráfaga se cuantificó usando el método de "evento inesperado" de Poisson de detección de ráfagas con un valor de evento inesperado de Poisson de >10. Se determinó la proporción de repuntes en descargas de ráfaga en comparación con la cantidad total de repuntes muestreados para cada célula.

Utilización de glucosa cerebral local (LCGU) usando [¹⁴C]-2-desoxiglucosa (2-DG). Se midió LCGU en macacos en el día que se sacrificaron. Los experimentos se realizaron sobre animales anestesiados con propofol. Se controló la temperatura corporal por vía rectal y se mantuvo a 37 °C usando una almohadilla de calentamiento controlada de forma termostática. Se insertaron catéteres de polietileno en una vena y arteria femoral para la posterior administración i.v. de 2-DG y el muestreo de sangre arterial. El procedimiento se inició mediante la infusión de un pulso intravenoso de 100 µCi/kg de 2-desoxi-D-[¹⁴C]glucosa (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA; actividad específica de 50-55 mCi/mmol). Se extrajeron muestras de sangre arterial cronometradas (0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 5, 7,5, 10, 15, 25, 35, y 45 min) después de ello en una programación suficiente para definir el curso del tiempo de las concentraciones arteriales de 2-[¹⁴C]desoxiglucosa y glucosa. Las muestras de sangre arterial se centrifugaron inmediatamente. Se determinaron las concentraciones en plasma de ¹⁴C por recuento de centelleo líquido (Beckman Instruments, Fullerton, CA), y las concentraciones en plasma de glucosa se evaluaron usando un glucómetro (sistema de control de glucosa en sangre OneTouch® Ultra®, Lifescan, Johnson&Johnson, Issy-les-Moulineaux, Francia). Cuarenta y cinco min después de la inyección de indicador, se sacrificó a los animales por sobredosis intravenosa de pentobarbital sódico (150 mg/kg i.v.). El cerebro se retiró rápidamente y se congeló en isopentano (-45 °C), y se almacenó a -80 °C para posterior procesamiento por autorradiografía. Se obtuvieron secciones coronales del cerebro (20 µm de grosor) que cubrían el estriado completo, la corteza premotora y pre-frontal (50 secciones) a -20 °C con un criomicrotomo, se montaron en portaobjetos de congelación rápida, se secaron rápidamente y se expusieron a una película de autorradiografía (Kodak BioMax MR) durante 7-10 días, con patrones de [¹⁴C] calibrados (American Radiochemical Company, St Louis, MO, EE. UU.). Las mismas secciones cerebrales después se tiñeron con violeta de cresilo, y se reconstruyeron imágenes ópticas de estas secciones en un espacio de volumen 3D. Los autorradiogramas se digitalizaron y analizaron usando un sistema de análisis de imágenes de base informática (MCID Analysis, St. Catharines, Ontario, Canadá). Después, las imágenes ópticas de los autorradiogramas se co-alinearon con el espacio anatómico 3D co-registrado para proporcionar volúmenes anatómicos y funcionales. Las densidades ópticas determinadas en el STN en los autorradiogramas (10-13 secciones por STN) se convirtieron en radiactividad y después en valores de consumo de glucosa usando los patrones de [¹⁴C] y la ecuación operativa modificada de Sokoloff.

Análisis estadístico. Los valores son la media \pm e.t.m. Los datos se analizaron con ensayo de Kruskal-Wallis (KW) o Friedman (el equivalente no paramétrico del ANOVA de medidas repetidas) y después, con ensayo post-hoc de Mann-Whitney (MW) en los puntos temporales individuales, corregidos para múltiples comparaciones, usando el software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL).

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un sistema de vector lentivírico que comprende un único vector que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican la tirosina hidroxilasa (TH), la aminoácido DOPA descarboxilasa (AADC) y la GTP-ciclohidrolasa I (CH1) para su uso en el tratamiento y/o prevención de disquinesias asociadas con administración oral de L-dopa en un sujeto con enfermedad de Parkinson.
- 10 2. Un sistema de vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, teniendo dicho sistema de vector una o más de las siguientes características:
- 15 (i) cuando el sistema de vector comprende un casete tricistrónico, el orden de los genes en el casete tricistrónico es TH-AADC-CH1
(ii) al menos uno de los codones potenciales de inicio ATG en gag está cambiado a ATTG;
(iii) hay un casete de expresión de Neo insertado cadena abajo de gag; y
(iv) cuando el sistema de vector comprende un casete tricistrónico, hay un WPRE insertado en el extremo 3' del casete tricistrónico para potenciar la expresión.

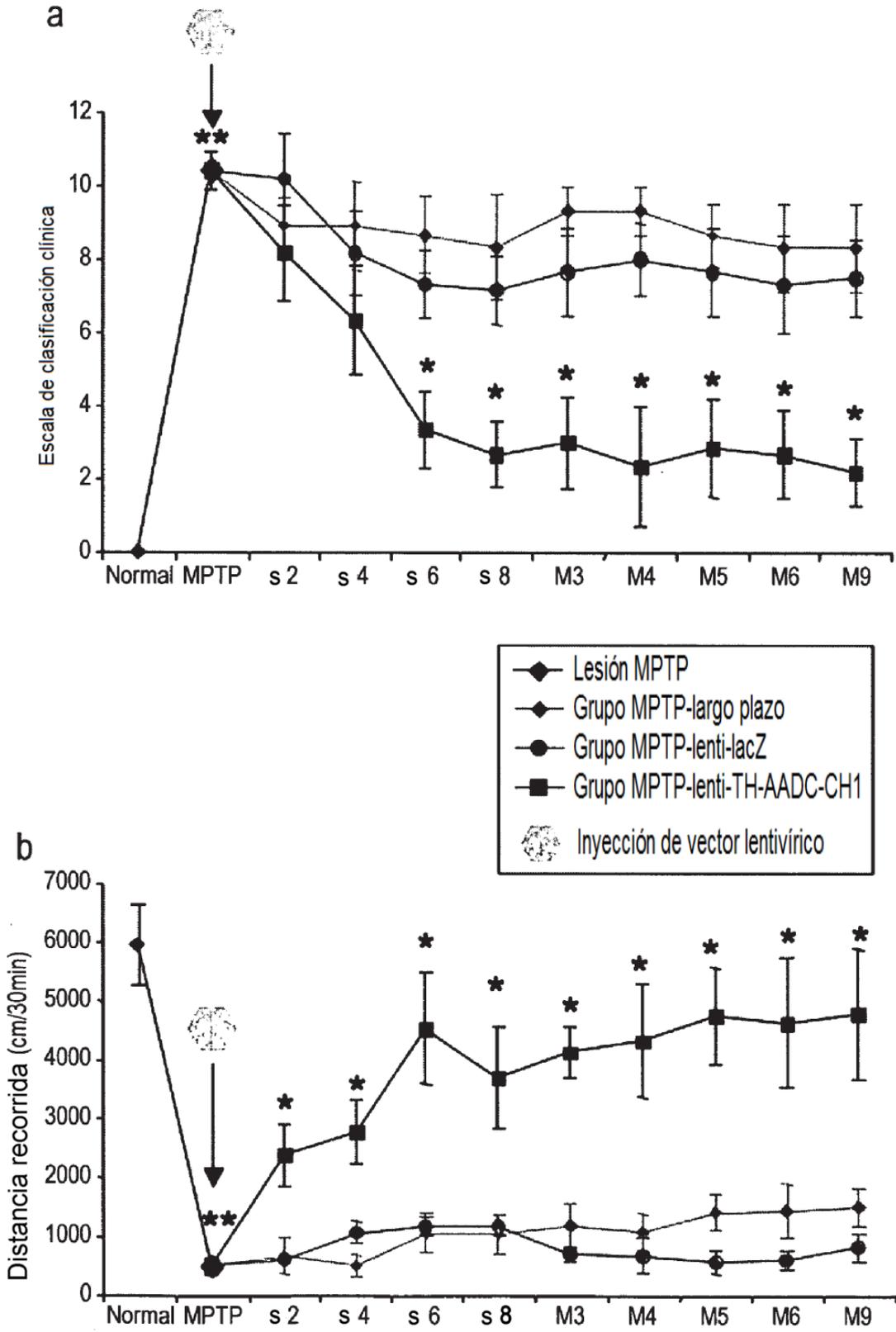


FIG. 1

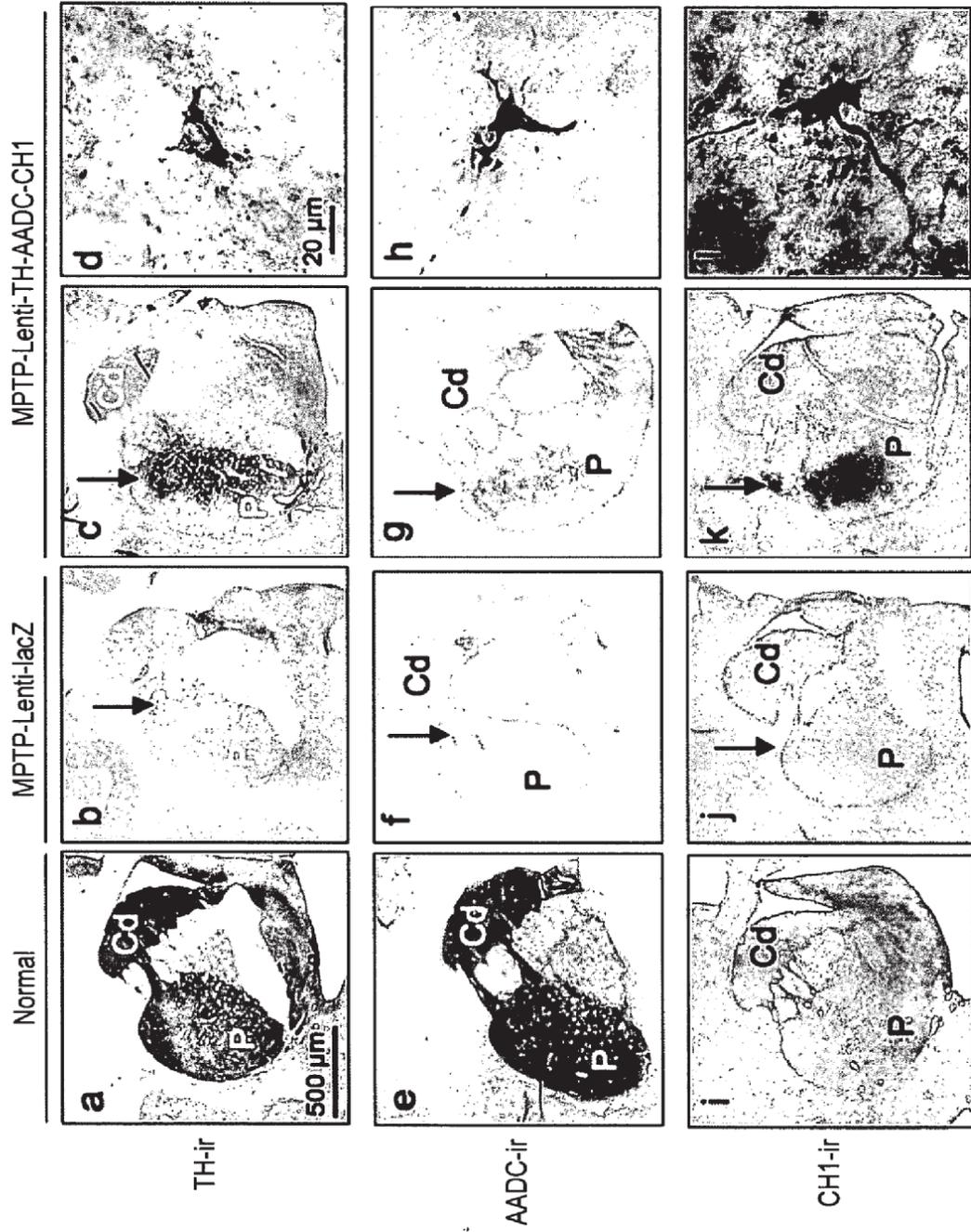


FIG. 2

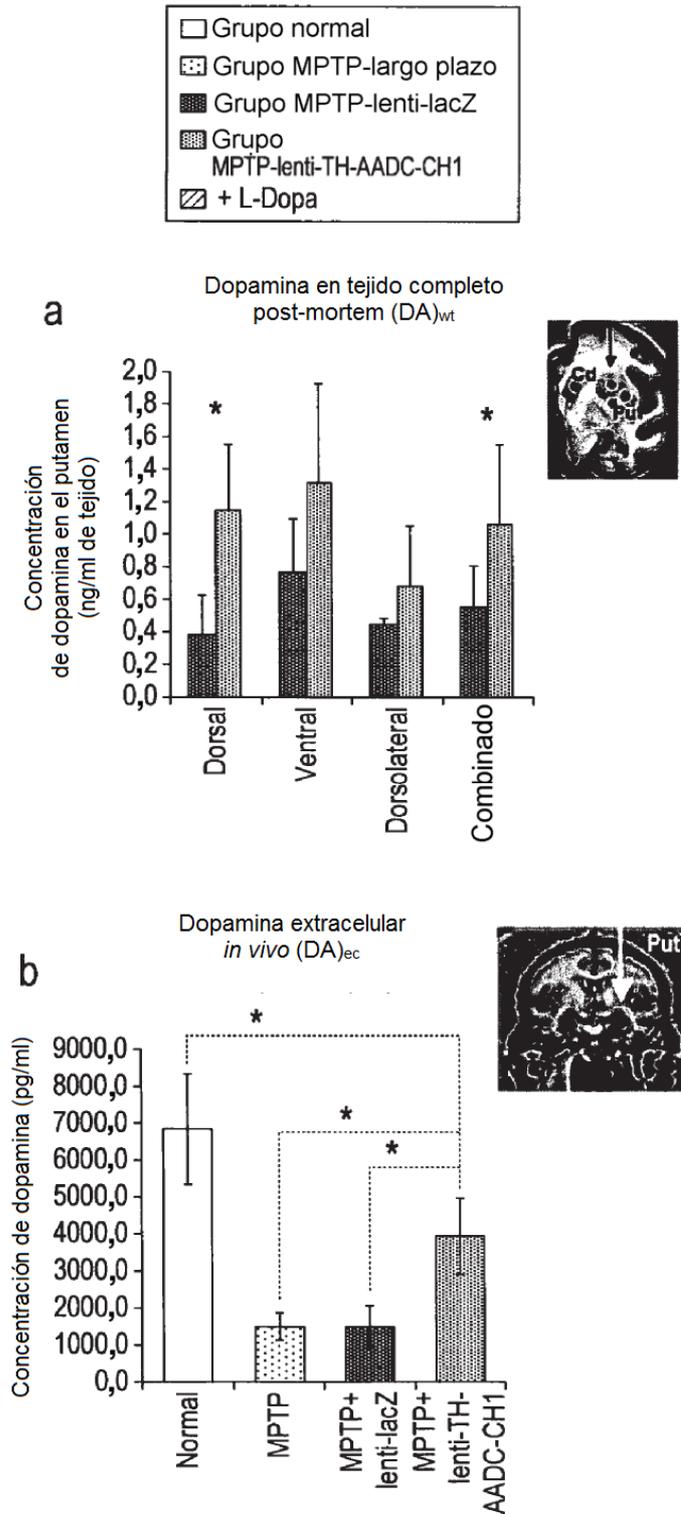


FIG. 3

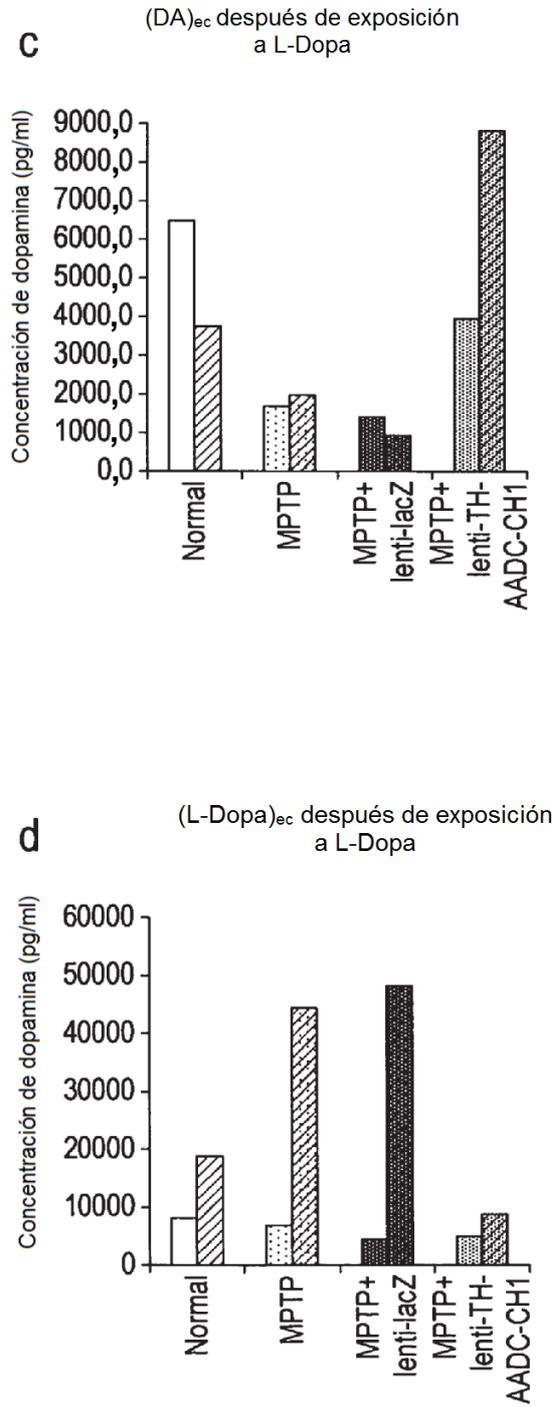


FIG. 3 CONTINUACIÓN

Actividad de salida de los ganglios basales a, b, c

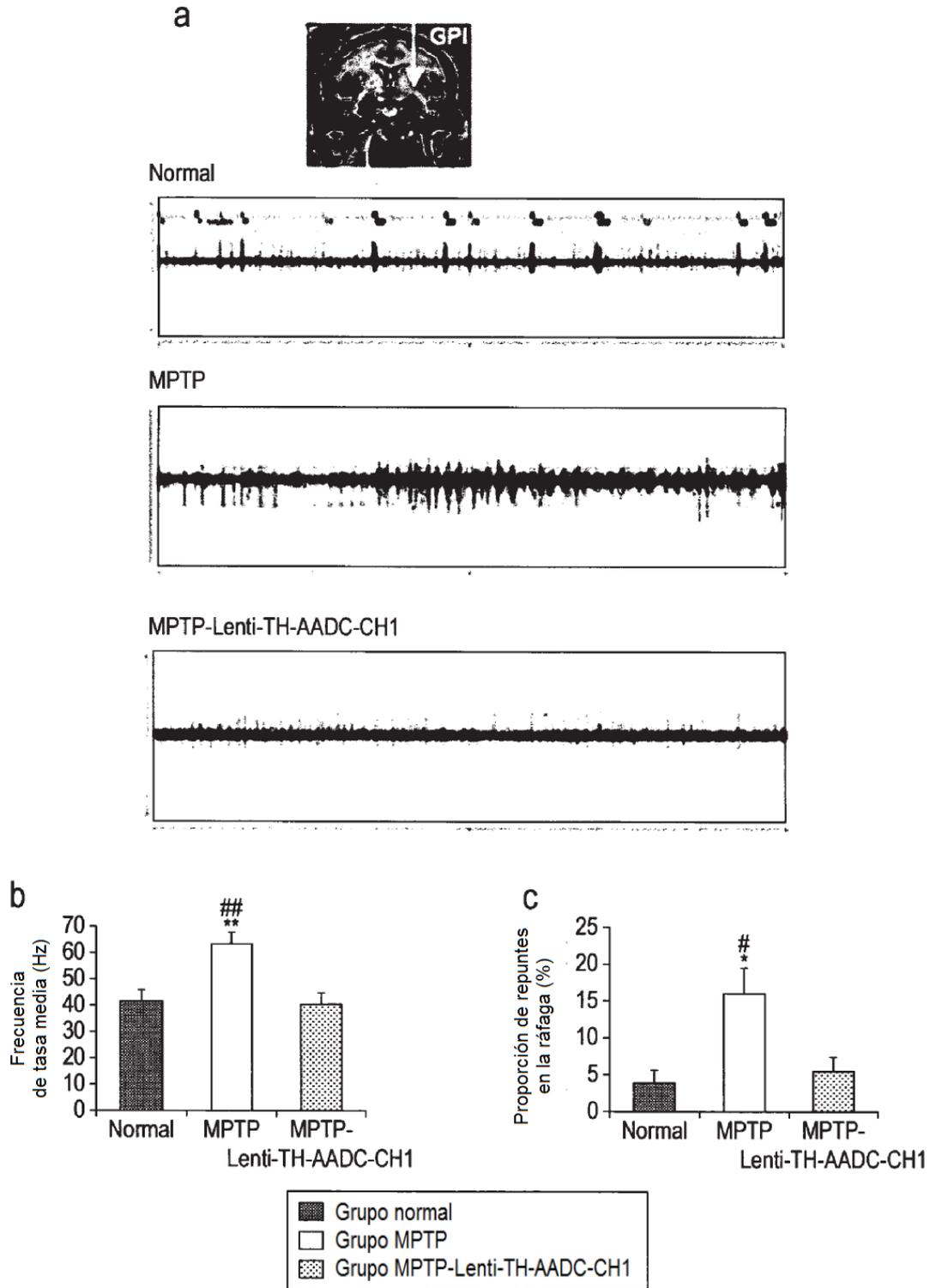


FIG. 4

Metabolismo del núcleo subtalámico d, e, f, g

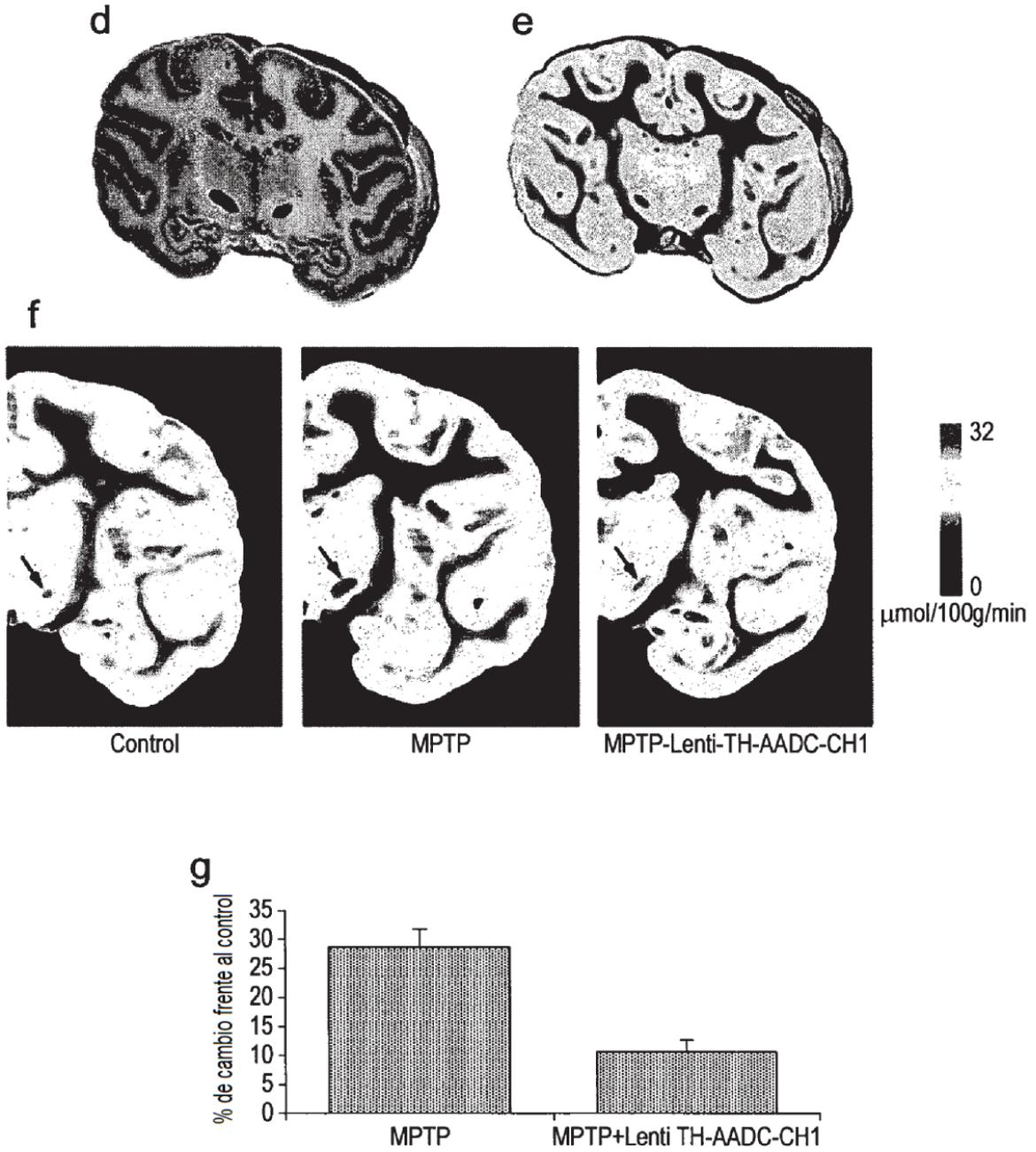


FIG. 4 CONTINUACIÓN

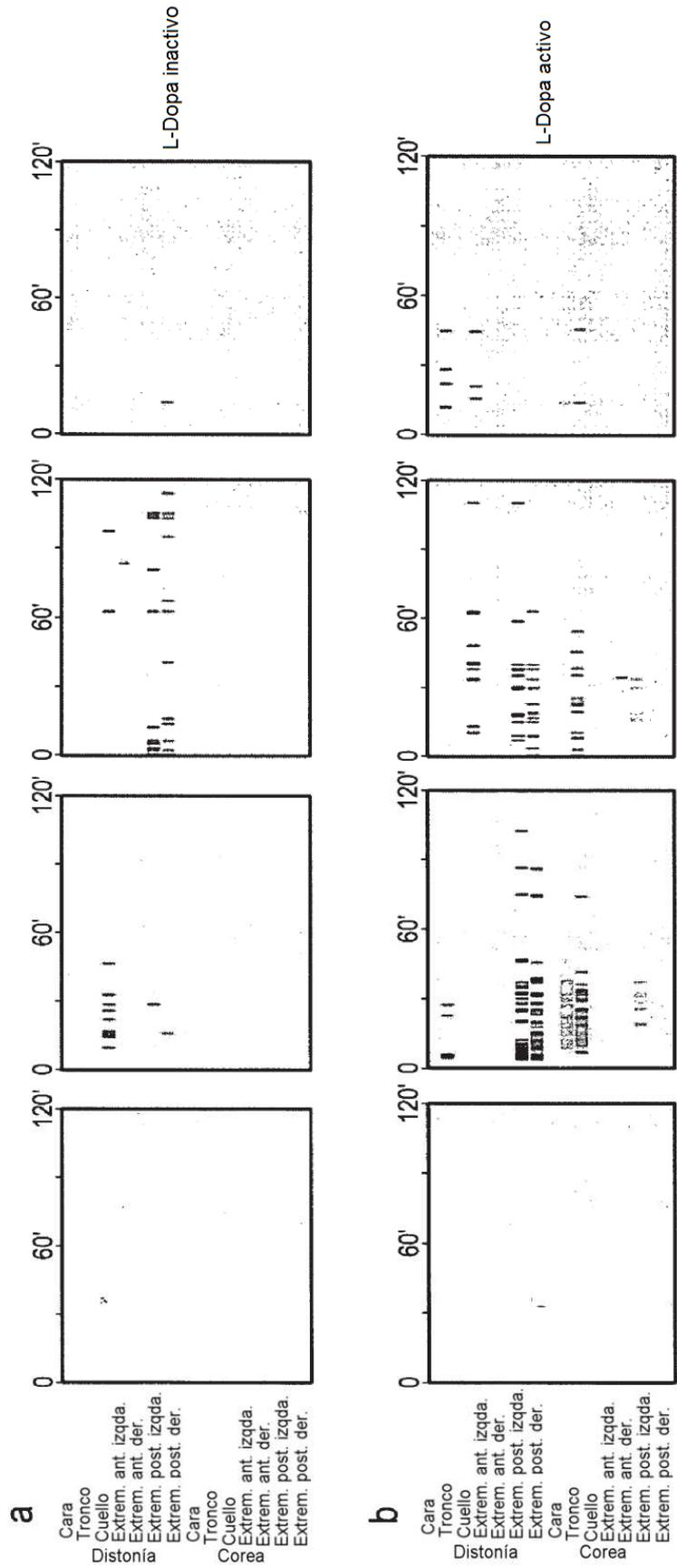


FIG. 5

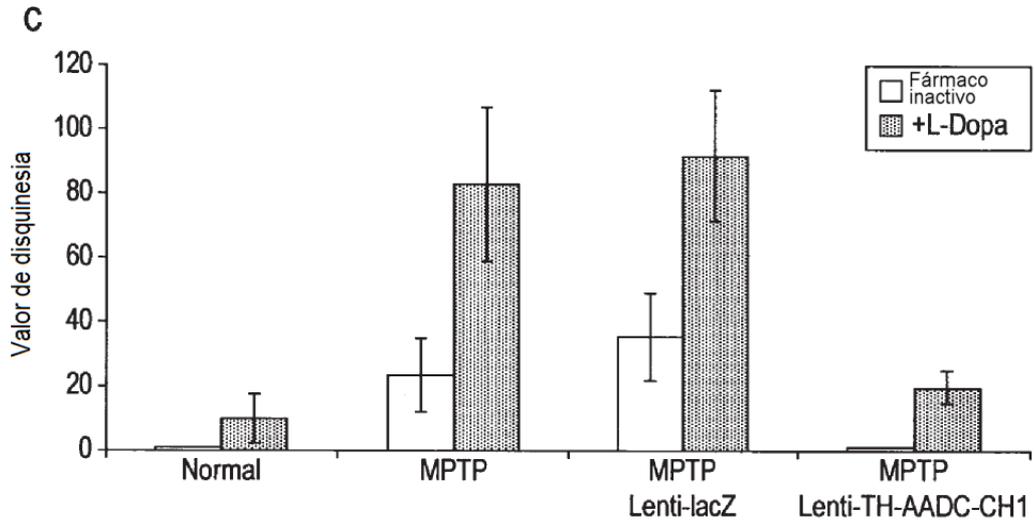


FIG. 5 CONTINUACIÓN

pONY8.1TSIN



pONY8.9.4TY (Lenti-TH-AADC-CH1)



Vector	Producción de dopamina (ng/h/10 ⁶ copias integradas)
pONY8.1TSIN	0,15
pONY8.9.4TY Lenti-TH-AADC-CH1	38,2

FIG. 6

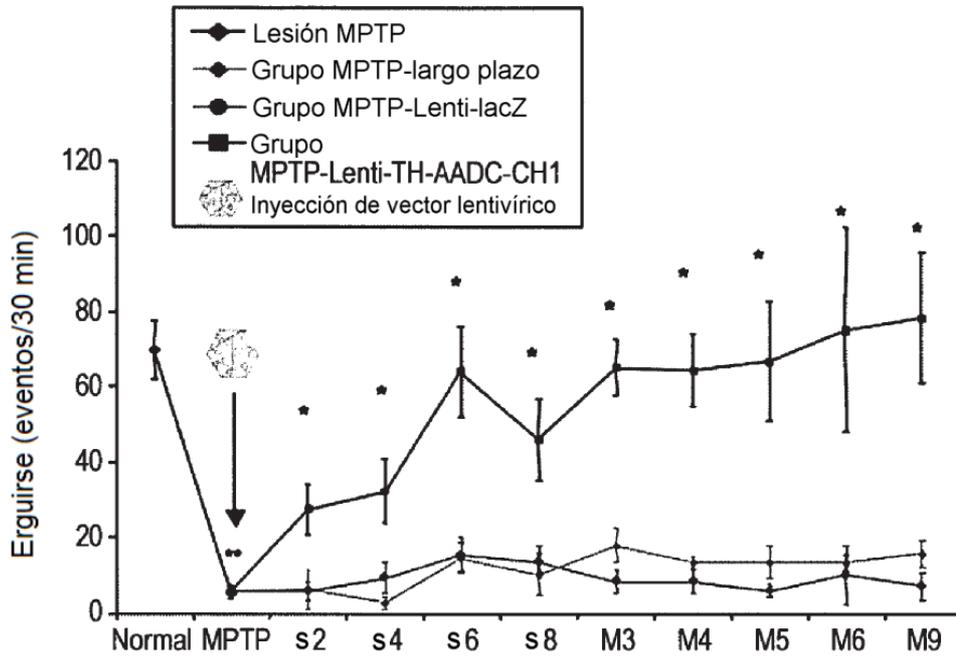


FIG. 7

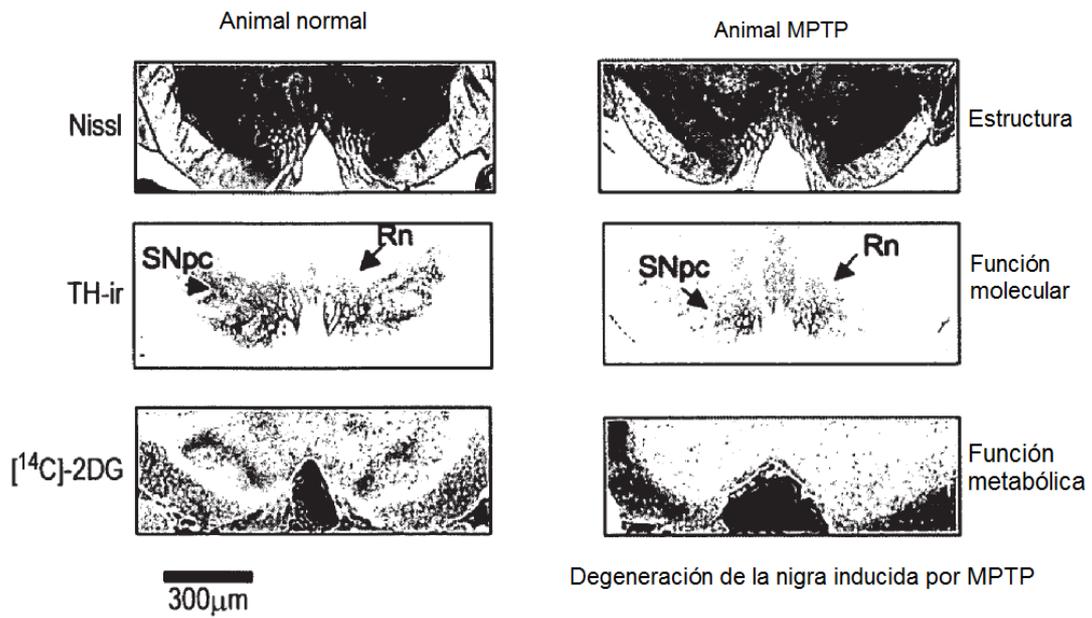


FIG. 8

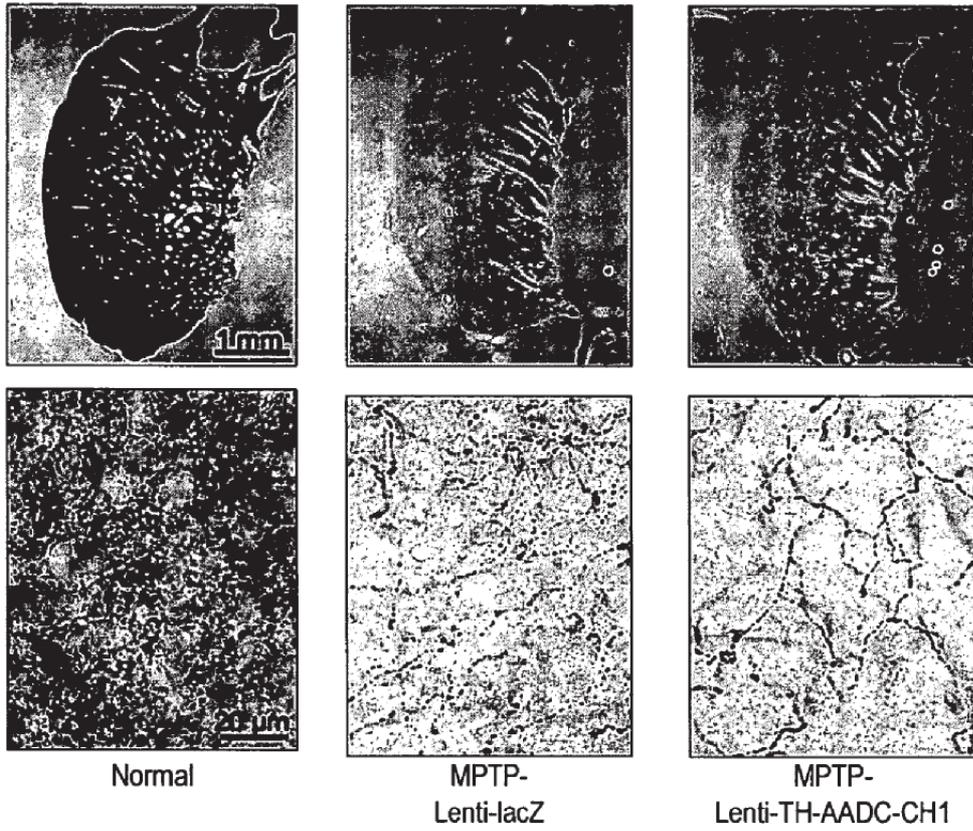


FIG. 9

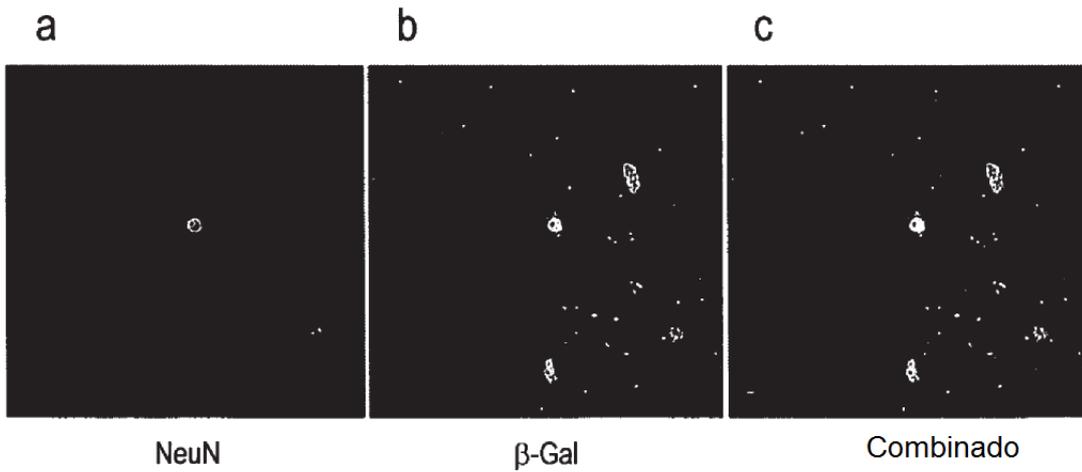


FIG. 10

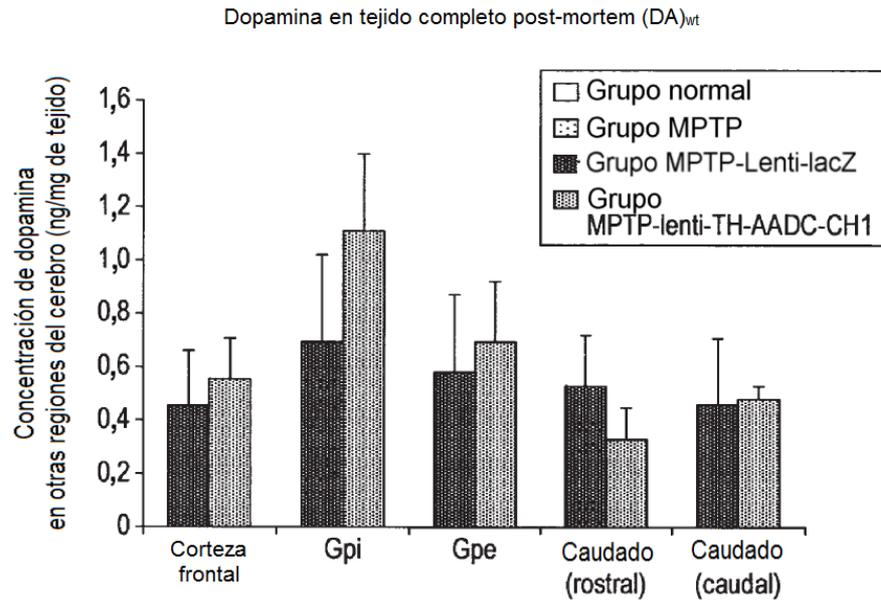


FIG. 11

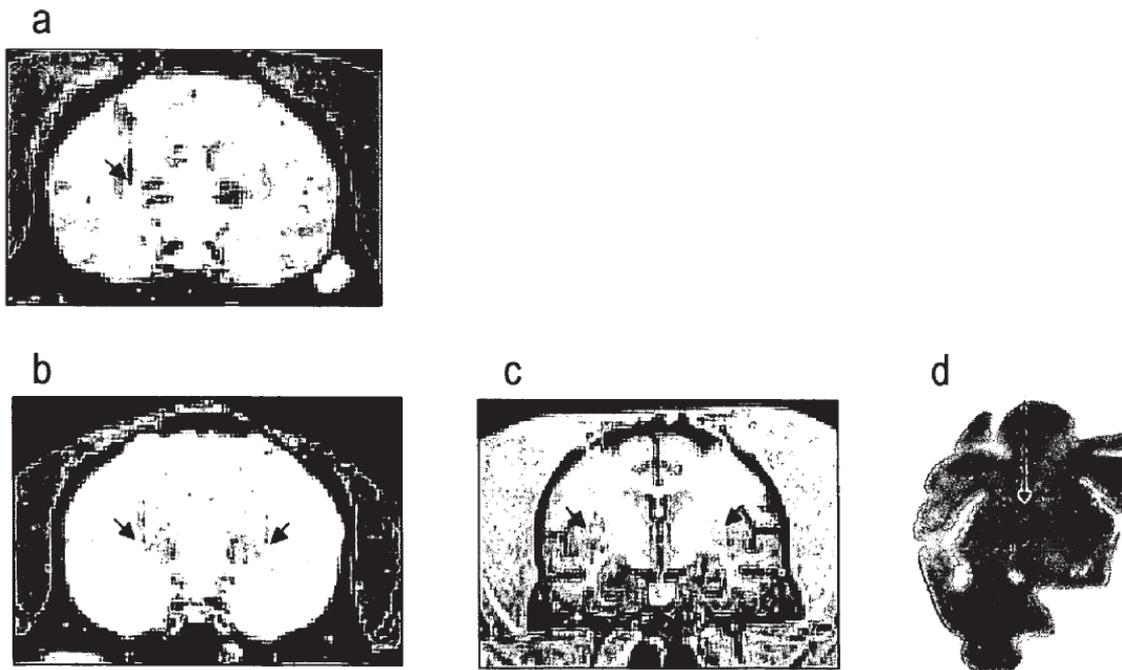


FIG. 12

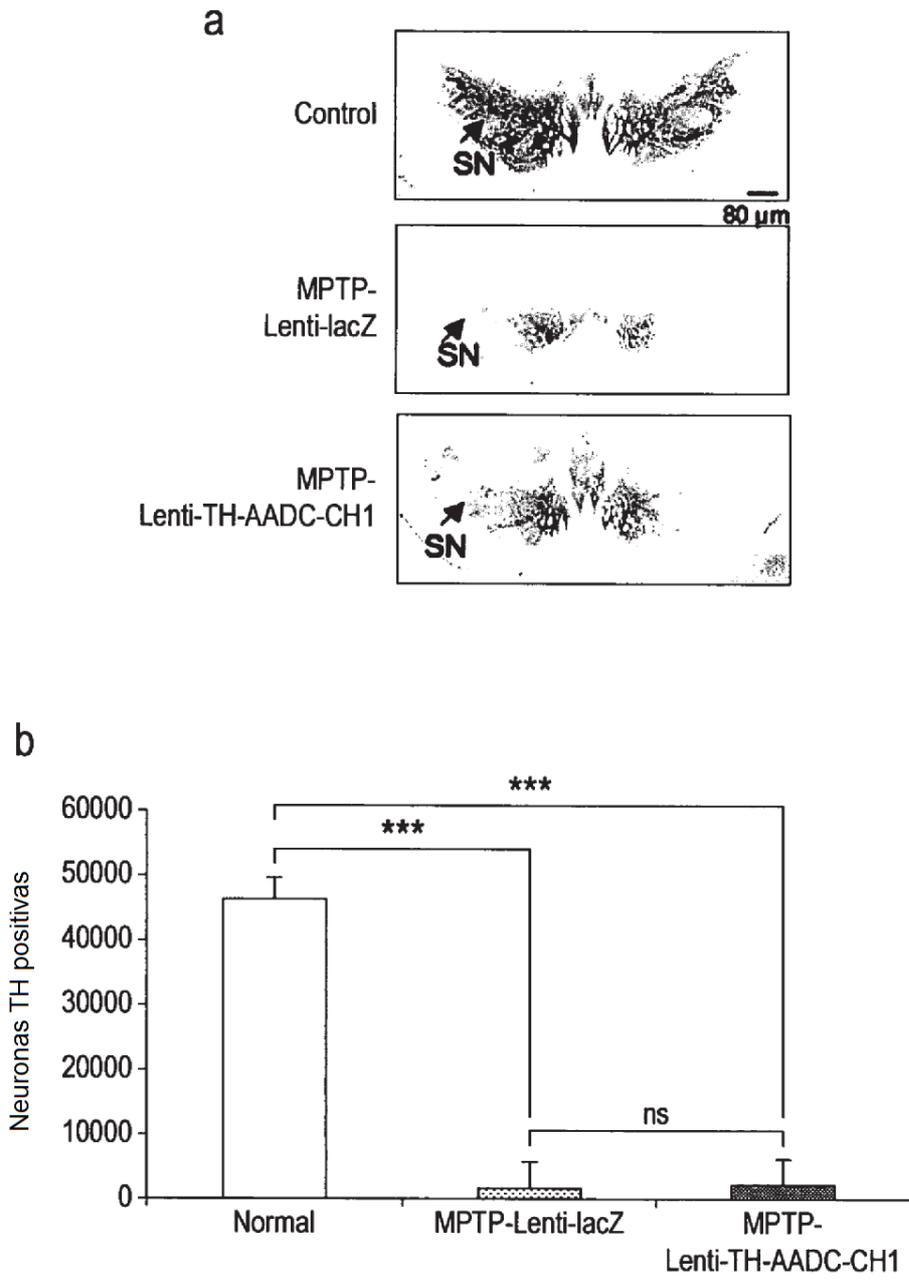


FIG. 13



FIG. 14

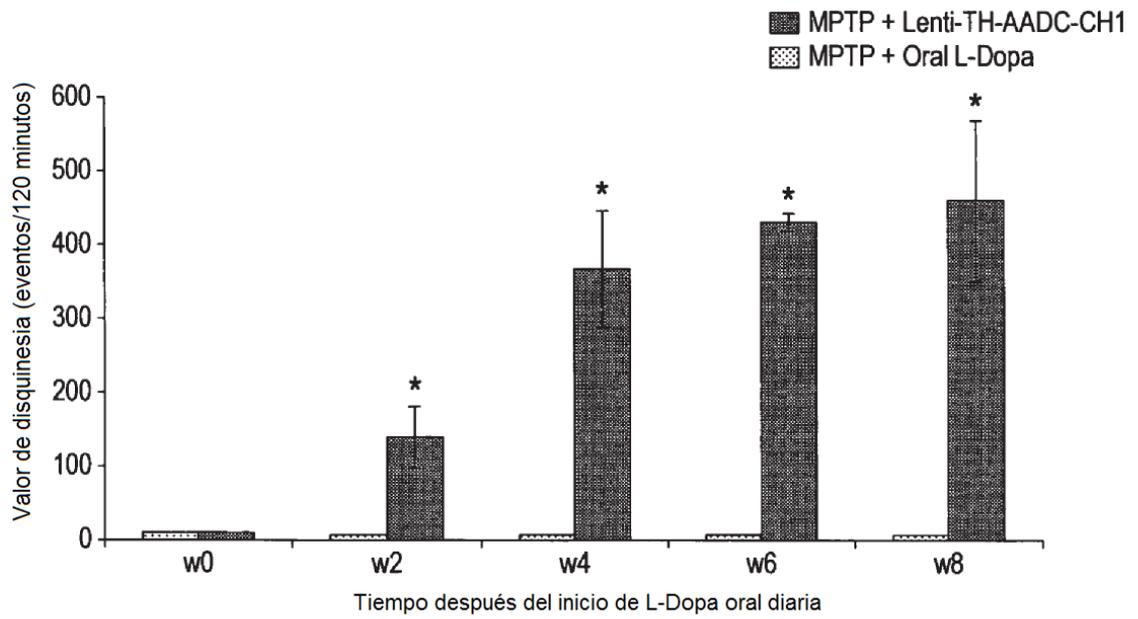


FIG. 15

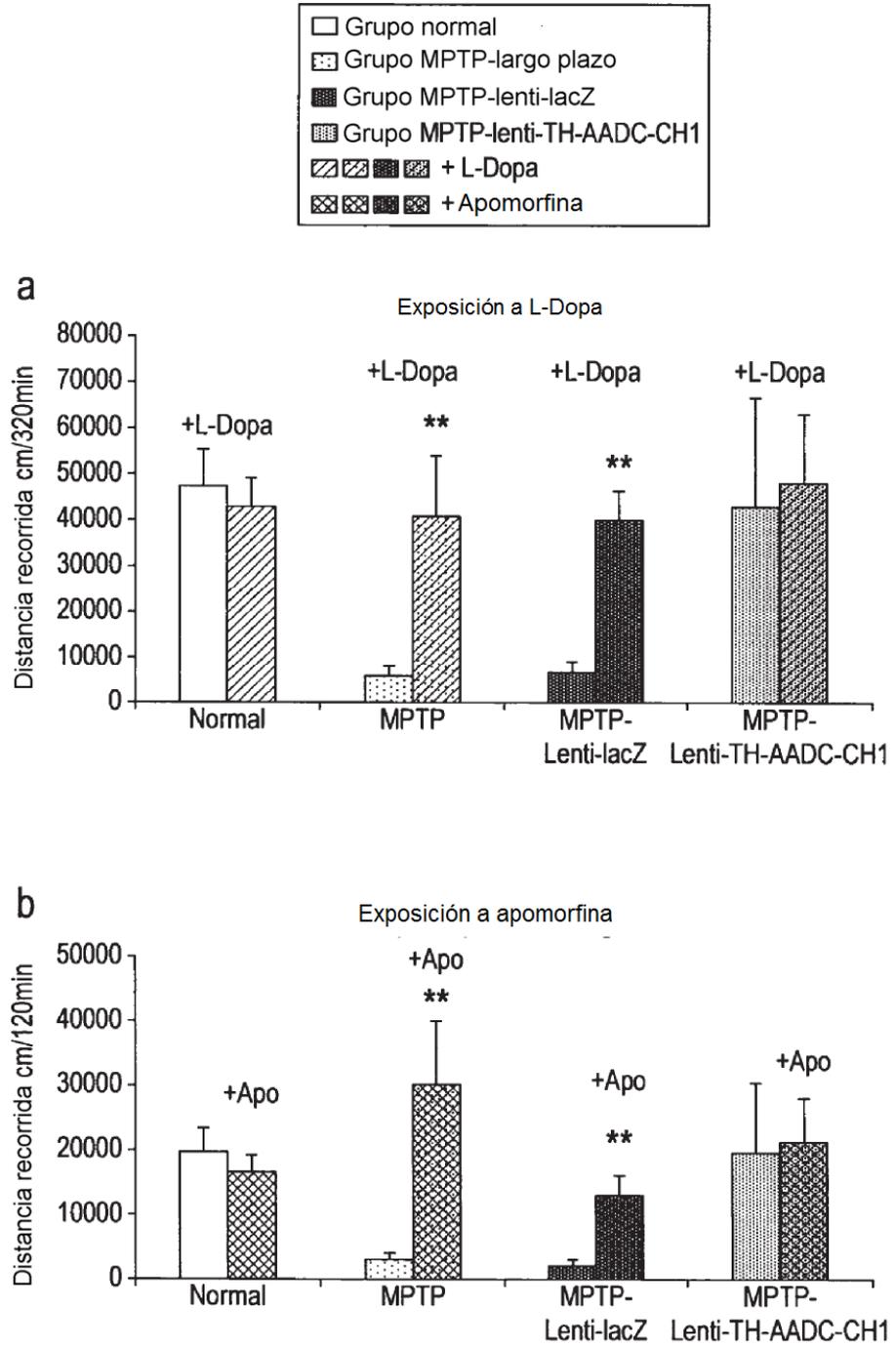


FIG. 16

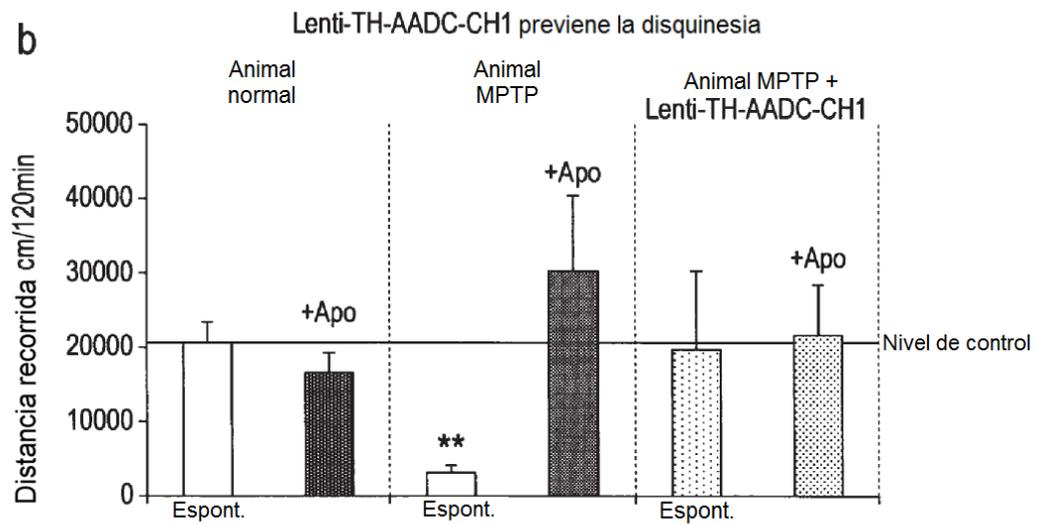
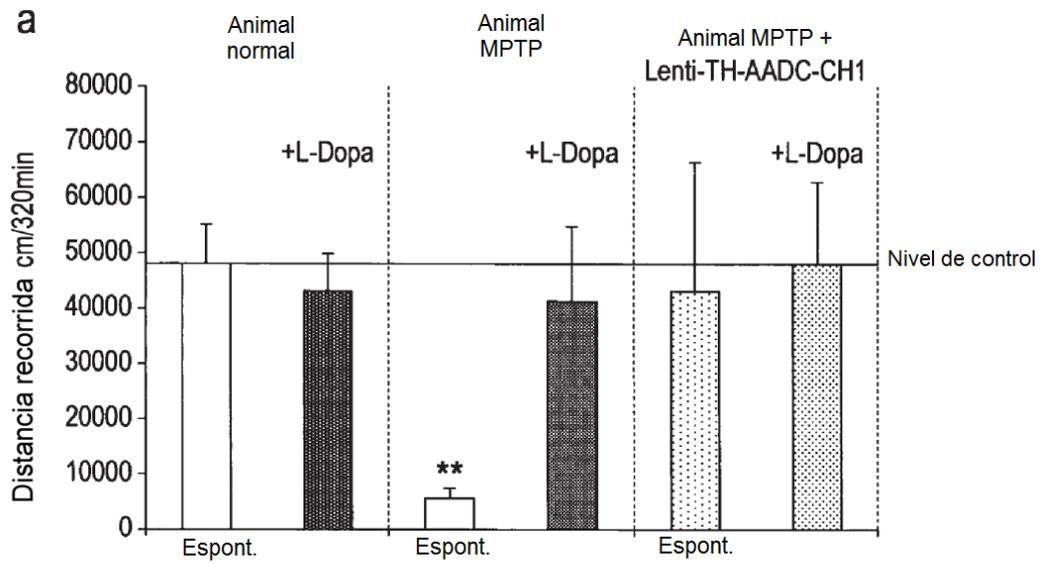


FIG. 17

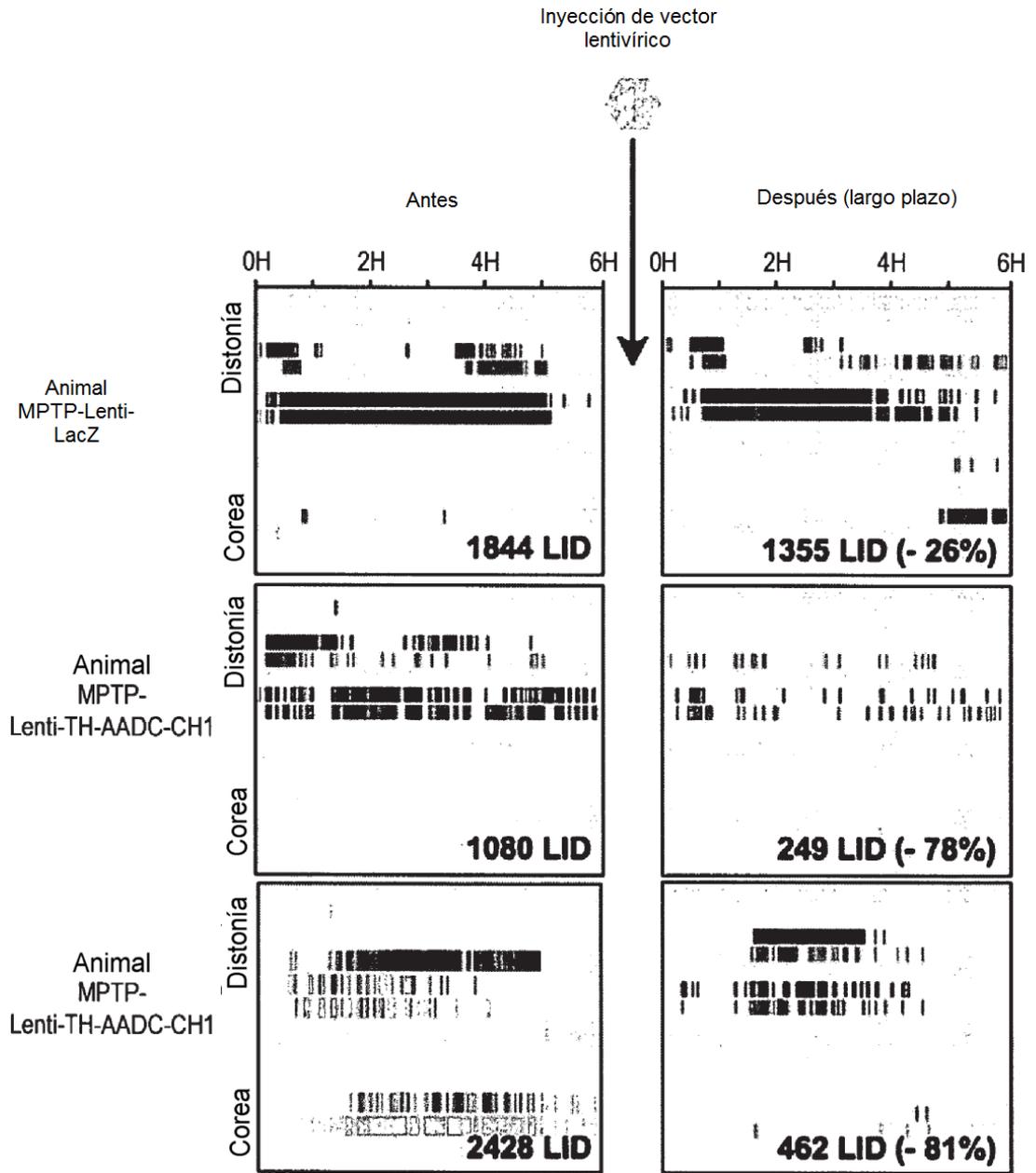


FIG. 18

```

1  GGGCACTCAG ATTCTGCGGT CTGAGTCCCT TCTCTGCTGG GCTGAAAAGG CCTTTGTAAT
   >>.....EIAV R-U5.....>
61  AAATATAATT CTCTACTCAG TCCCTGTCTC TAGTTTGTCT GTTCGAGATC CTACAGTTGG
   >.....EIAV R-U5.....>
121 CGCCCGAACA GGGACCTGAG AGGGGCGCAG ACCCTACCTG TTGAACCTGG CTGATCGTAG
181 GATCCCCGGG ACAGCAGAGG AGAACTTACA GAAGTCTTCT GGAGGTGTTT CTGGCCAGAA
241 CACAGGAGGA CAGGTAAGAT TGGGAGACCC TTTGACATTG GAGCAAGGCG CTCAAGAAGT
301 TAGAGAAGGT GACGGTACAA GGGTCTCAGA AATTAACCTAC TGGAACCTGT AATTGGGCGC
361 TAAGTCTAGT AGACTTATTT CATTGATACC AACTTTGTAA AAGAAAAGGA CTGGCAGCTG
421 AGGGATTGTC ATTCCATTGC TGGAAAGATTG TAACTCAGAC GCTGTCAGGA CAAGAAAGAG
481 AGGCCTTTGA AAGAACATTG GTGGGCAATT TCTGCTGTAA AGATTGGGCC TCCAGATTAA
541 TAATTGTAGT AGATTGGAAA GGCATCATTG CAGCTCCTAA GAGCGAAATA TTGAAAAGAA
601 GACTGCTAAT AAAAAGCAGT CTGAGCCCTC TGAAGAATAT CTCTAGAACT AGTGGATCCC
661 CCGGGCCAAA AACCTAGCGC CACCATGATT GAACAAGATG GATTGCACGC AGGTTCTCCG
   >>.....Neo.....>
721 GCCGCTTGGG TGGAGAGGCT ATTCGGCTAT GACTGGGCAC AACAGACAAT CGGCTGCTCT
   >.....Neo.....>
781 GATGCCGCCG TGTTCCGGCT GTCAGCGCAG GGGCGCCCGG TTCTTTTTGT CAAGACCGAC
   >.....Neo.....>
841 CTGTCCGGTG CCCTGAATGA ACTGCAGGAC GAGGCAGCGC GGCTATCGTG GCTGGCCACG
   >.....Neo.....>
901 ACGGGCGTTC CTTGCGCAGC TGTGCTCGAC GTTGTCCTG AAGCGGGAAG GGACTGGCTG
   >.....Neo.....>
961 CTATTGGGCG AAGTGCCGGG GCAGGATCTC CTGTCATCTC ACCTTGCTCC TGCCGAGAAA
   >.....Neo.....>
1021 GTATCCATCA TGGCTGATGC AATGCGGCGG CTGCATACGC TTGATCCGGC TACCTGCCCA
   >.....Neo.....>
1081 TTCGACCACC AAGCGAAACA TCGCATCGAG CGAGCACGTA CTCGGATGGA AGCCGGTCTT
   >.....Neo.....>
1141 GTCGATCAGG ATGATCTGGA CGAAGAGCAT CAGGGGCTCG CGCCAGCCGA ACTGTTCCGC
   >.....Neo.....>
1201 AAGCTCAAGG CGCGCATGCC CGACGGCGAG GATCTCGTCG TGACCCATGG CGATGCCTGC
   >.....Neo.....>

```

FIG. 19

1261 TTCCCGAATA TCATGGTGGG AAATGGCCGC TTTTCTGGAT TCATCGACTG TGGCCGGCTG
>.....Neo.....>

1321 GGTGTGGCGG ACCGCTATCA GGACATAGCG TTGGCTACCC GTGATATTGC TGAAGAGCTT
>.....Neo.....>

1381 GGCGGCGAAT GGGCTGACCG CTTCTCGTG CTTTACGGTA TCGCCGCTCC CGATTTCGAG
>.....Neo.....>

1441 CGCATCGCCT TCTATCGCCT TCTTGACGAG TTCTTCTGAG CGGCCGCGAA TTCAAAGCT
>.....Neo.....>>

1501 AGAGTCGACT CTAGGGAGTG GGGAGGCACG ATGGCCGCTT TGGTCGAGGC GGATCCGGCC
>>.....CMVp.....>

1561 ATTAGCCATA TTATTCATTG GTTATATAGC ATAAATCAAT ATTGGCTATT GGCCATTGCA
>.....CMVp.....>

1621 TACGTTGTAT CCATATCATA ATATGTACAT TTATATTGGC TCATGTCCAA CATTACCGCC
>.....CMVp.....>

1681 ATGTTGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA ATTACGGGGT CATTAGTTCA
>.....CMVp.....>

1741 TAGCCCATAT ATGGAGTTC GCGTTACATA ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC
>.....CMVp.....>

1801 GCCCAACGAC CCCCGCCCAT TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT
>.....CMVp.....>

1861 AGCCACTTTC CATGACGTC AATGCCTGGA GTATTTACGG TAAACTGCCC ACTTCCCACT
>.....CMVp.....>

1921 ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC CCTATTGAC GTCAATGACG GTAAATGGCC
>.....CMVp.....>

1981 CGCCTGGCAT TATGCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT CCTACTTGGC AGTACATCTA
>.....CMVp.....>

2041 CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGTGAT GCGGTTTTGG CAGTACATCA ATGGGCGTGG
>.....CMVp.....>

2101 ATAGCGGTTT GACTCACGGG GATTTCCAAG TCCTCACCCC ATTGACGTCA ATGGGAGTTT
>.....CMVp.....>

2161 GTTTTGGCAC CAAAATCAAC GGGACTTTC AAAATGTCGT AACAACTCCG CCCATTGAC
>.....CMVp.....>

2221 GCAAATGGGC GGTAGGCGTG TACGGTGGGA GGTCTATATA AGCAGAGCTC GTTTAGTGAA
>.....CMVp.....>

2281 CCGTCAGATC GCCTGGAGAC GCCATCCACG CTGTTTTGAC CTCCATAGAA GACACCGGGA
>>>

2341 CCGATCCAGC CTCCGCGGCC CCAAGCTAGT CGACTTTAAG CTTCTCGAGA ATTCGTGCAC

FIG. 19 CONTINUACIÓN

2401 CATGGTGAAG GTACCCTGGT TCCCAAGAAA AGTGTGAGAG CTGGACAAGT GTCATCACCT
>>.....tTH.....>

2461 GGTCAACAAG TTCGACCCCG ACCTGGACTT GGACCACCCC GGCTTCTCGG ACCAGGTGTA
>.....tTH.....>

2521 CCGCCAGCGC AGGAAGCTGA TCGCTGAGAT CGCCTTCCAG TACAGGCACG GCGACCCGAT
>.....tTH.....>

2581 CCCCCGTGTG GAGTACACCG CCGAGGAGAT CGCCACCTGG AAGGAGGTCT ACACCACCCT
>.....tTH.....>

2641 GAAGGGCCTC TACGCCACCC ACGCCTGCGG GGAGCACCTG GAGGCCTTTG CTTTGCTGGA
>.....tTH.....>

2701 GCGCTTACAG GGCTACCGGG AAGACAACAT CCCCAGCTG GAGGACGTCT CCCGCTTCT
>.....tTH.....>

2761 GAAGGAGCGC ACAGGCTTCC AGCTGCGGCC CGTGCCCGGC CTGCTGTCCG CCCGGGACTT
>.....tTH.....>

2821 CCTGGCCAGC CTGGCCTTCC GCGTGTCCA GTGCACCCAG TATATCCGCC ACGCGTCTC
>.....tTH.....>

2881 GCCCATGCAC TCCCCTGAGC CGGACTGCTG CCACGAGCTG CTGGGGCAGC TGCCCATGCT
>.....tTH.....>

2941 GGCCGACCGC ACCTTCGGCG AGTTCAGCCA GGACATCGGC CTGGCGTCCC TGGGGGCCAG
>.....tTH.....>

3001 CGATGAGGAA ATCGAGAAGC TGTCCACTCT GTACTGGTTC ACGGTGGAGT TCGGGCTGTG
>.....tTH.....>

3061 TAAGCAGAAC GGGGAGGTGA AGGCCTATGG TGCCGGGCTG CTGTCTCTCT ACGGGGAGCT
>.....tTH.....>

3121 CCTGCACTGC CTGTCTGAGG AGCCTGAGAT CCGGGCCTTC GACCCTGAGG CTGCGGCCGT
>.....tTH.....>

3181 GCAGCCCTAC CAAGACCAGA CGTACCAGTC AGTCTACTTC GTGTCTGAGA GCTTCAGCGA
>.....tTH.....>

3241 CGCCAAGGAC AAGCTCAGGA GCTATGCCAG CCGCATCCAG CGCCCCTTCT CCGTGAAGTT
>.....tTH.....>

3301 CGACCCGTAC ACCCTGGCCA TCGACGTGCT GGACAGCCCC CAGGCCGTGC GCGCTCCCT
>.....tTH.....>

3361 GGAGGGTGTC CAGGATGAGC TGGACACCCT TGCCCATGCG CTGAGCGCCA TCGGCTGAAG
>.....tTH.....>>

3421 CAGTGGCGGC CGCACTAGAG GAATTCGGCC CCTCTCCCCC CCCCCCTCT CCTCCCCTC
>>.....EMCV IRES.....>

3481 CCCCTAACGT TACTGGCCGA AGCCGCTTGG AATAAGGCCG GTGTGCGTTT GTCTATATGT
>.....EMCV IRES.....>

FIG. 19 CONTINUACIÓN

3541 TATTTTCCAC CATATTGCCG TCTTTTGGCA ATGTGAGGGC CCGGAAACCT GGCCCTGTCT
>.....EMCV IRES.....>

3601 TCTTGACGAG CATTCCTAGG GGTCTTTCCC CTCTCGCCAA AGGAATGCAA GGTCTGTGTA
>.....EMCV IRES.....>

3661 ATGTGCGTAA GGAAGCAGTT CCTCTGGAAG CTTCTTGAAG ACAAACAACG TCTGTAGCGA
>.....EMCV IRES.....>

3721 CCCTTTGCAG GCAGCGGAAC CCCCCACCTG GCGACAGGTG CCTCTGCGGC CAAAAGCCAC
>.....EMCV IRES.....>

3781 GTGTATAAGA TACACCTGCA AAGGCGGCAC AACCCAGTG CCACGTTGTG AGTTGGATAG
>.....EMCV IRES.....>

3841 TTGTGGAAG AGTCAAATGG CTCTCCTCAA GCGTATTCAA CAAGGGGCTG AAGGATGCCC
>.....EMCV IRES.....>

3901 AGAAGGTACC CCATTGTATG GGATCTGATC TGGGGCCTCG GTGCACATGC TTTACATGTG
>.....EMCV IRES.....>

3961 TTTAGTCGAG GTTAAAAAAA CGTCTAGGCC CCCCGAACCA CGGGGACGTG GTTTTCCTTT
>.....EMCV IRES.....>

4021 GAAAAACACG ATGATACCAT GGACGCCAGT GAGTTCCGAA GGCGCGCAA GGAGATGGTG
>>.....AADC.....>
>...EMCV IRES...>>

4081 GACTACGTGG CCAACTACAT GGAAGGCATC GAGGGCCGCC AAGTCTACCC CGACGTGGAG
>.....AADC.....>

4141 CCGGGCTACC TGCGCCCGCT GATCCCCGCC GCTGCCCTC AGGAGCCCGA CACCTTCGAG
>.....AADC.....>

4201 GACATCATCA ACGACGTGGA GAAGATCATC ATGCCTGGCG TGACGCACTG GCACAGCCCC
>.....AADC.....>

4261 TACTTCTTCG CCTACTTCCC CACCGCCAGC TCGTACCCGG CCATGCTGGC GGACATGCTG
>.....AADC.....>

4321 TGCGGGGCCA TTGGCTGCAT CGGCTTCTCC TGGGCGGCGA GCCCAGCGTG CACCGAGCTG
>.....AADC.....>

4381 GAGACCGTGA TGATGGACTG GCTCGGGAAG ATGCTGGAGC TCCCAAAGGC GTTCTTGAAC
>.....AADC.....>

4441 GAGAAGGCTG GCGAGGGGGG CGGCGTGATC CAGGGCAGCG CCACCGAGCC CACCCTGGTG
>.....AADC.....>

4501 GCCCTGCTGG CCGCTCGGAC CAAAGTGATC CACCGGCTGC AGGCAGCGTC CCCAGAGCTC
>.....AADC.....>

4561 ACCCAGGCCG CTATCATGGA GAAGCTGGTG GCTTACTCCT CCGATCAGCC ACACTCCTCC
>.....AADC.....>

4621 CTGGAACCGG CTGGGCTCAT TGGTGGAGTG AAGCTCAAGG CCATCCCCAG CGATGGCACC
>.....AADC.....>

FIG. 19 CONTINUACIÓN

4681 TTCGCCATGC GTGCGAGCGC CCTGCAGGAA GCCCTGGAGA GAGACAAGGC GGCTGGCCTG
>.....AADC.....>

4741 ATTCCTTTCT TCATGGTGGC CACCCTGGGG ACCACAACAT GCTGCTCCTT CGACAACCTC
>.....AADC.....>

4801 CTCGAAGTCG GTCCTATCTG CAACAAGGAA GACATCTGGC TGCACGTTGA TGCAGCCTAC
>.....AADC.....>

4861 GCAGGCAGCG CATTCACTG CCCTGAGTTC CGGCACCTC TGAACGGAGT GGAGTTCGCA
>.....AADC.....>

4921 GATAGCTTCA ACTTCAATCC CCACAAGTGG CTATTGGTGA ATTTGACTG CAGCGCCATG
>.....AADC.....>

4981 TGGGTGAAGA AGCGCACCGA CCTCACGGGA GCCTCCGCC TGGACCCAC TTACCTGAAG
>.....AADC.....>

5041 CACAGCCACC AGGATTCAGG GCTTATCACT GACTACCGGC ACTGGCAGAT CCCACTGGGC
>.....AADC.....>

5101 CGCAGATTC GCAGCTTGAA GATGTGGTTC GTATTCAGGA TGTATGGAGT CAAGGGACTG
>.....AADC.....>

5161 CAGGCTTATA TCCGCAAGCA TGTCAGCTG TCCCATGAGT TTGAGTCACT GGTGCGCCAG
>.....AADC.....>

5221 GATCCCCGCT TTGAAATCTG TGTGGAAGTC ATTCTGGGGC TTGTCTCCTT TCGGCTAAAG
>.....AADC.....>

5281 GGTTCGAACA AAGTGAATGA AGCTCTCTG CAAAGGATCA ACAGTGCCAA AAAAATCCAC
>.....AADC.....>

5341 TTGGTTCCAT GTCACCTCAG GGACAAGTTT GTCCTGCGCT TTGCCATCTG TTCTCGCACC
>.....AADC.....>

5401 GTGGAATCTG CCCATGTGCA GCGGGCCTGG GAACACATCA AAGAGCTGGC GGCCGACGTG
>.....AADC.....>

5461 CTGCGAGCAG AGAGGGAGTA GCTCAAACCC GCTGATCAGC CTCGACTGTG CCTTCTAGTT
>.....AADC.....>>

5521 GCCAGCCATC TGTTGTTTCC CCCTCCCCCG TGCCTTCCTT GAGAATTCCT CGACGTAGAT

5581 ATCTTAAAC AGCTCTGGGG TTGTACCCAC CCCAGAGGCC CACGTGGCGG CTAGTACTCC
>>.....PV IRES.....>

5641 GGTATTGCGG TACCTTTGTA CGCCTGTTT ATACTCCCTT CCCCCGTAAC TTAGAAGCAC
>.....PV IRES.....>

5701 AATGTCCAAG TTCAATAGGA GGGGGTGCAA ACCAGTACCA CCACGAACAA GCACTTCTGT
>.....PV IRES.....>

5761 TCCCCGGTG AGGCTGTATA GGCTGTTTCC ACGGCTAAAA GCGGCTGATC CGTTATCCGC
>.....PV IRES.....>

FIG. 19 CONTINUACIÓN

5821 TCATGTACTT CGAGAAGCCT AGTATCACCT TGGAACTTTC GATGCGTTGC GCTCAACACT
>.....PV IRES.....>

5881 CAACCCAGGA GTGTAGCTTA GGTGATGAG TCTGGACGTT CCTCACGGC GACGGTGGTC
>.....PV IRES.....>

5941 CAGGCTGCGT TGGCGGCTA CCTGTGGCCC AAAGCCACAG GACGCTAGTT GTGAACAAGG
>.....PV IRES.....>

6001 TGTGAAGAGC CTATTGAGCT ACCTGAGAGT CCTCCGGCCC CTGAATGCGG CTAATCCTAA
>.....PV IRES.....>

6061 CCACGGAGCA GGCAGTGGCA ATCCAGCGAC CAGCCTGTCG TAACGCGCAA GTTCGTGGCG
>.....PV IRES.....>

6121 GAACCGACTA CTTTGGGTGT CCGTGTTCCT TTTTATTTT ACAATGGCTG CTTATGGTGA
>.....PV IRES.....>

6181 CAATCATTGA TTGTTATCAT AAAGCAATT GGATTGGCCA TCCGGTGAGA ATTTGATTAT
>.....PV IRES.....>

6241 TAAATTACTC TCTTGTGGG ATTGCTCCTT TGAATCTTG TGCACTCACA CCTATTGGAA
>.....PV IRES.....>

6301 TTACCTCATT GTTAAGATAC GCGTCTAGCT AGCGCCACCA TGGAGAAGGG CCCTGTGCGC
>>.....CH1.....>
>.....PV IRES.....>>

6361 GCCCCGCGC AGAAGCCGCG CGGCGCCCGC TGCAGCAATG GGTCCCCGA GCGCGACCCG
>.....CH1.....>

6421 CCGCGCCCCG GGCCAGCAG GCCGCGGAG AAGCCCCCGC GCCCGAGGC CAAGAGCGCG
>.....CH1.....>

6481 CAGCCGCGG ACGGCTGGAA GGGCGAGCG CCCCAGCG AGGAGGACAA CGAGCTGAAC
>.....CH1.....>

6541 CTCCCTAACC TGGCCGCGC CTACTCCTCC ATCTGAGCT CGCTGGGCGA GAACCCCGAG
>.....CH1.....>

6601 CGGCAGGGGC TGCTCAAGAC CCCCTGGAGG GCGGCCTCGG CCATGCAGTT CTTACCAAG
>.....CH1.....>

6661 GGCTACCAGG AGACCATCTC AGACCTCTG AACGACGCTA TCTCCACCA AGATCACCAT
>.....CH1.....>

6721 GAGATGGTGA TCGTGAAGGA CATAGACATG TTCTCCATGT GCGAGCACCA CCTGGTGCCA
>.....CH1.....>

6781 TTTGTGGGAA AGGTCCATAT CGGCTACCTG CCTAACAAAGC AGGTCCCTGGG CCTCAGCAAG
>.....CH1.....>

6841 CTGGCGAGGA TTGTGGAAAT CTATAGTAGA AGACTACAGG TTCAGGAGCG CCTTACCAA
>.....CH1.....>

FIG. 19 CONTINUACIÓN

```

6901 CAAATTGCTG TGGCAATCAC GGAAGCCTTG CGGCCTGCTG GAGTCGGGGT CGTGGTGGAA
>.....CH1.....>
6961 GCAACACACA TGTGTATGGT GATGCGAGGT GTACAGAAAA TGAACAGCAA AACCGTGACC
>.....CH1.....>
7021 AGCACAAATG TGGGTGTGTT CCGGGAGGAT CCAAAGACTC GGAAGAGTT CCTGACTCTC
>.....CH1.....>
7081 ATCAGGAGCT GAAGAATTCC TCGACAGCTT ATCGATAATC AACCTCTGGA TTACAAAATT
>>.....WPRE.....>
>...CH1....>>
7141 TGTGAAAGAT TGACTGGTAT TCTTAACTAT GTTGCTCCTT TTACGCTATG TGGATACGCT
>.....WPRE.....>
7201 GCTTTAATGC CTTTGTATCA TGCTATTGCT TCCCGTATGG CTTTCATTTT CTCCTCCTTG
>.....WPRE.....>
7261 TATAAATCCT GGTGCTGTC TCTTATGAG GAGTTGTGGC CCGTTGTCAG GCAACGTGGC
>.....WPRE.....>
7321 GTGGTGTGCA CTGTGTTTGC TGACGCAACC CCCACTGGTT GGGGCATTGC CACCACCTGT
>.....WPRE.....>
7381 CAGCTCCTTT CCGGGACTTT CGCTTCCCC CTCCTATTG CCACGGCGGA ACTCATCGCC
>.....WPRE.....>
7441 GCCTGCCTTG CCCGCTGCTG GACAGGGGCT CGGCTGTTGG GCACTGACAA TTCCTGGTG
>.....WPRE.....>
7501 TTGTCGGGGA AATCATCGTC CTTCCCTTGG CTGCTCGCCT GTGTTGCCAC CTGGATTCTG
>.....WPRE.....>
7561 CGCGGGACGT CCTTCTGCTA CGTCCCTCG GCCCTCAATC CAGCGGACCT TCCTCCCGC
>.....WPRE.....>
7621 GGCCTGCTGC CCGCTCTGCG GCCTCTCCG CGTCTTCGCC TTCGCCCTCA GACGAGTCGG
>.....WPRE.....>
7681 ATCTCCCTTT GGGCCGCTC CCCGCATCGA TACCGTCGAA TTGGAAGAGC TTTAAATCCT
>.....WPRE.....>>
7741 GGCACATCTC ATGTATCAAT GCCTCAGTAT GTTTAGAAAA ACAAGGGGGG AACTGTGGGG
>>.....>
7801 TTTTATGAG GGGTTTATA CAATGGGCA CTCAGATTCT GCGGTCTGAG TCCCTTCTCT
>.....SINLTR.....>
7861 GCTGGGCTGA AAAGGCCTTT GTAATAAATA TAATCTCTA CTCAGTCCCT GTCTCTAGTT
>.....SINLTR.....>
7921 TGTCTGTTTC AGATCCTACA G
>.....SINLTR.....>>

```

FIG. 19 CONTINUACIÓN