

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 048**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/70** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 15/864** (2006.01)

**C12N 9/16** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2007 PCT/US2007/003388**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2007 WO07092563**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2007 E 07763560 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 1986661**

54 Título: **Terapia génica par la enfermedad de Niemann-Pick tipo A**

30 Prioridad:

**08.02.2006 US 771628 P**

**09.02.2006 US 772360 P**

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

**13.02.2019**

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)**

**50 Binney Street**

**Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**PASSINI, MARCO, A.;**

**ZIEGLER, ROBIN, J.;**

**DODGE, JAMES;**

**SHIHABUDDIN, LAMYA y**

**CHENG, SENG, H.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 700 048 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Terapia génica par la enfermedad de Niemann-Pick tipo A.

Solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad a la Solicitud provisional en serie de EE.UU. núm. 60/771.628, presentada el 8 de febrero de 2006, y la Solicitud provisional en serie de EE.UU. núm. 60/772.360 presentada el 9 de febrero de 2006.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para tratar trastornos que afectan al cerebro y las vísceras, p.ej. enfermedad de Niemann-Pick tipo A.

- 10 Sumario de la invención

Un grupo de trastornos metabólicos conocidos como enfermedades de almacenamiento lisosómico (EAL) incluye más de cuarenta trastornos genéticos, muchos de los cuales implican defectos genéticos en varias hidrolasas lisosómicas. Las enfermedades de almacenamiento lisosómico representativas y las enzimas defectuosas asociadas se enumeran en la Tabla 1.

- 15 Tabla 1

Enfermedad de almacenamiento lisosómico	Enzima defectuosa
Aspartilglucosaminuria	Aspartilglucosaminidasa
Fabry	A-Galactosidasa A
Enfermedad de Batten infantil* (CNL1)	Palmitoil proteína tioesterasa
Enfermedad de Batten infantil tardía clásica* (CNL2)	Tripeptidil peptidasa
Enfermedad de Batten juvenil* (CNL3)	Proteína transmembrana lisosómica
Otras formas de Batten* (CNL4-CNL8)	Múltiples productos génicos
Cistinosis	Transporte de cisteína
Farber	Ceramidasa ácida
Fucosidosis	$\alpha$ -L-fucosidasa ácida
Galactosidosialidosis	Proteína protectora/catepsina A
Gaucher tipos 1, 2* y 3*	$\beta$ -glucosidasa ácida, o glucocerebrosidasa
G <sub>M1</sub> gangliosidosis*	$\beta$ -galactosidasa ácida
Hunter*	Iduronato-2-sulfatasa
Hurler-Scheie*	A-L-Iduronidasa
Krabbe*	Galactocerebrosidasa
$\alpha$ -Manosidosis*	$\alpha$ -manosidasa ácida
$\beta$ -Manosidosis*	$\beta$ -manosidasa ácida
Maroteaux-Lamy	Arilsulfatasa B
Leucodistrofia metacromática*	Arilsulfatasa A
Morquio A	Sulfatasa de N-Acetilgalactosamina-6-sulfato
Morquio B	$\beta$ -galactosidasa ácida
Mucopolidosis II/III*	N-Acetilglucosamina-1-fosfotransferasa
Niemann-Pick A*, B	Esfingomielinasa ácida
Niemann-Pick C*	NPC-1
Pompe*	$\alpha$ -glucosidasa ácida
Sandhoff*	$\beta$ -Hexosaminidasa B
Sanfilippo A*	Heparán N-sulfatasa

Enfermedad de almacenamiento lisosómico	Enzima defectuosa
Sanfilippo B*	A-N-Acetilglucosaminidasa
Sanfilippo C*	Acetil-CoA:α-glucosaminida N-acetiltransferasa
Sanfilippo D*	N-Acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa
Enfermedad de Schindler*	A-N-Acetilgalactosaminidasa
Schindler Kanzaki	A-N-Acetilgalactosaminidasa
Sialidosis	A-Neuramidasa
Sly*	B-Glucuronidasa
Tay-Sachs*	B-Hexosaminidasa A
Wolman*	Lipasa ácida

\* Implicación del SNC

La característica distintiva de la EAL es la acumulación anormal de metabolitos en los lisosomas que lleva a la formación de grandes números de lisosomas distendidos en el pericarión. Un desafío principal para tratar EAL (en lugar de tratar una enzimopatía específica del hígado) es la necesidad de invertir la patología de almacenamiento lisosómico en múltiples tejidos separados. Algunas EALs pueden tratarse de forma efectiva por infusión intravenosa de la enzima perdida, conocido como terapia de sustitución enzimática (TSE). Por ejemplo, los pacientes de Gaucher tipo 1 tienen solo enfermedad visceral y responden favorablemente a la TSE con glucocerebrosidasa recombinante (Cerezyme®, Genzyme Corp.). Sin embargo, los pacientes con enfermedad metabólica que afecta al SNC (p.ej. enfermedad de Gaucher tipo 2 o 3) no responden completamente a la TSE intravenosa porque se impide que la enzima de sustitución entre al cerebro por la barrera hematoencefálica (BHE). Además, los primeros intentos por introducir una enzima de sustitución en el cerebro por inyección directa de la proteína han estado limitados en parte debido a la citotoxicidad enzimática a altas concentraciones locales y las tasas de difusión parenquimales limitadas en el cerebro (Pardridge, Peptide Drug Delivery to the Brain, Raven Press, 1991).

Además, pueden desarrollarse anticuerpos contra las enzimas infundidas usadas en la terapia de sustitución enzimática. Dichos anticuerpos pueden no tener importancia clínica o pueden llevar a reacciones de hipersensibilidad o disminuir la biodisponibilidad de las proteínas terapéuticas. Hunley, T.E. et al. (2004) *Pediatrics* 114(4):e532-e535. Por ejemplo, Kakkis E. et al. (2004) *PNAS* 101(3):829-834 presentan que se han observado efectos adversos de los anticuerpos en la terapia de sustitución enzimática de trastornos de almacenamiento lisosómico en el modelo canino de mucopolisacaridosis I (MPS I). Los autores también presentan resultados similares en otros modelos animales de trastornos de MPS, que incluyen MPS I, MSP VI y MPS VII. La reducción de la respuesta inmune generada por estas proteínas puede ser deseable. La inducción de tolerancia específica al antígeno es un método potencial para reducir dicha respuesta inmune, pero se ha presentado que ha sido difícil de alcanzar.

La terapia génica es una modalidad de tratamiento emergente para trastornos que afectan al SNC, incluyendo EALs. Se han alcanzado resultados prometedores en un modelo animal aceptado usando terapia génica para el tratamiento de la enfermedad de Niemann-Pick tipo A (NPA). Dodge et al. (2005) *PNAS* 102(49):18722-18727. NPA es un trastorno de almacenamiento lisosómico provocado por una deficiencia en la actividad de la esfingomielinasa ácida (EMA). La pérdida de actividad de EMA da por resultado la acumulación de esfingomielina (EFM) lisosómica, defectos metabólicos secundarios tales como metabolismo aberrante del colesterol, y posterior pérdida de función celular en sistemas orgánicos que incluyen el sistema nervioso central (SNC). Schuchman y Desnick, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, Nueva York, págs. 3589-3610 y Horinouchi et al. (1995) *Nat. Genet.* 10:288-293.

Esta descripción proporciona un método que comprende las etapas de administrar una cantidad efectiva de un vector vírico que comprende un transgén que codifica un inmunógeno al tejido hepático del mamífero y posteriormente administrar una cantidad efectiva de un segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica un inmunógeno al cerebro del mamífero.

También se proporciona un método para tratar la enfermedad de Niemann-Pick tipo A en un mamífero que comprende las etapas de administrar una cantidad efectiva de un vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido de esfingomielinasa ácida al tejido hepático del mamífero y posteriormente administrar una cantidad efectiva de un segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido de esfingomielinasa ácida al cerebro de dicho mamífero, tratando así la enfermedad de Niemann-Pick tipo A en el mamífero.

La descripción también proporciona métodos y composiciones para inducir la tolerancia del cerebro de un mamífero a un inmunógeno pre-seleccionado distribuyendo primero sistémicamente una cantidad efectiva del inmunógeno por medio de un transgén y después administrando una cantidad efectiva del inmunógeno al sistema nervioso central (SNC) del mamífero.

También proporciona métodos y composiciones para inducir la tolerancia del cerebro de un mamífero al polipéptido de esfingomielinasa ácida distribuyendo primero una cantidad efectiva de un transgén que codifica el polipéptido al hígado de mamífero y después administrando una cantidad efectiva del transgén para el polipéptido al sistema nervioso central (SNC) del mamífero.

- 5 La descripción también proporciona métodos y composiciones para mejorar los síntomas asociados con la enfermedad de Niemann-Pick tipo A (NPA) en un mamífero que padece NPA por transducción del tejido cerebral del mamífero con una cantidad efectiva de un transgén que codifica el polipéptido de esfingomielinasa ácida después de la transducción del hígado del mamífero con el mismo transgén.

- 10 En la base de la descripción que está contenida en la presente memoria, en un primer aspecto la invención proporciona un primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un inmunógeno; y un segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica el inmunógeno para usar en el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico con implicación del SNC, en el que dicho tratamiento comprende las etapas de:

a) administrar dicho primer vector vírico al tejido hepático de un mamífero de manera que se induce la tolerancia al inmunógeno en el cerebro del mamífero; y

- 15 b) posteriormente administrar dicho segundo vector vírico al cerebro de dicho mamífero

en el que dicha administración posterior del segundo vector vírico se da después de haberse expresado dicho primer vector vírico que comprende un transgén que codifica el inmunógeno en el hígado del mamífero durante una cantidad efectiva de tiempo para generar la inducción de tolerancia, y en el que el inmunógeno es la enzima defectuosa asociada con la enfermedad de almacenamiento lisosómico a tratar.

- 20 En un segundo aspecto, la invención proporciona un primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida; y un segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida para usar en el tratamiento de la enfermedad de Niemann-Pick tipo A en un mamífero que comprende las etapas de:

a) administrar dicho primer vector vírico al tejido hepático de dicho mamífero; y

- 25 b) posteriormente administrar dicho segundo vector vírico al cerebro de dicho mamífero,

en el que dicha administración posterior del segundo vector vírico se da después de haberse expresado dicho primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida en el hígado del mamífero durante una cantidad efectiva de tiempo para generar la inducción a la tolerancia.

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

- 30 Las ventajas adicionales de la invención y la descripción se describirán en parte en la siguiente descripción, y en parte se entenderán a partir de la descripción, o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra gráficamente varios sitios de administración del transgén en los sistemas nerviosos centrales de los ratones.

- 35 La Figura 2 muestra gráficamente el peso corporal de los ratones tratados como una medida del estado físico. Las medidas empezaron a la edad de 6 semanas (el tratamiento empezó en la semana cuatro). Durante el periodo de tiempo de 6 a 36 semanas (2 a 32 semanas después de la inyección sistémica del transgén) todos los grupos se compararon con los ratones ASMKO no tratados. Leyenda de la figura: \*p <0,05; \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001; ns (no significativo).

- 40 La Figura 3 muestra gráficamente los resultados de la prueba de Rotarod con aceleración como una medida de recuperación de la función motora. Las medidas comenzaron a la edad de 10 semanas (el tratamiento comenzó a la semana cuatro). Durante el periodo de tiempo entre 10 y 36 semanas (6 a 32 semanas después de la inyección sistémica del transgén) todos los grupos se compararon con los ratones ASMKO no tratados. Leyenda de la figura: \*p <0,05; \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001; ns (no significativo).

- 45 La Figura 4 muestra gráficamente los resultados de la prueba de Rotarod con oscilación como una medida de recuperación de la función motora. Las medidas comenzaron a la edad de 10 semanas (el tratamiento comenzó en la semana cuatro). Durante el periodo de tiempo entre 10 y 36 semanas (6 a 32 semanas después de la inyección sistémica del transgén) todos los grupos se compararon con los ratones ASMKO no tratados. Leyenda de la figura: \*p <0,05; \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001; ns (no significativo).

- 50 La Figura 5 muestra gráficamente los resultados de la prueba del laberinto de Barnes como una medida de recuperación de la función cognitiva. Las medidas comenzaron a la edad de 17 semanas (el tratamiento comenzó en la semana cuatro). Durante el periodo de tiempo entre 17 y 33 semanas (13 a 29 semanas después de la inyección

sistémica del transgén) todos los grupos se compararon con los ratones ASMKO no tratados. Leyenda de la figura: \*p <0,05; \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001; ns (no significativo).

5 La Figura 6 muestra gráficamente que la terapia génica de combinación de EMA amplía la vida útil de los ratones ASMKO. La vida útil media de los ratones ASMKO fue 34 semanas. La vida útil media para ratones que recibieron transgén sistémico fue 45 semanas (p <0,0001). La vida útil media para ratones que recibieron transgén intracraneal fue 43 semanas (p <0,0001). La vida útil para ratones que recibieron terapia transgénica intracraneal y sistémica fue al 100% a 54 semanas.

10 Las Figuras 7A a 7D muestran gráficamente los niveles de anticuerpos anti-hEMA en circulación para ratones tratados y no tratados. Leyenda de la figura: \*p <0,05; \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001. La Figura 7E muestra niveles de proteína EMA humana en suero sanguíneo con el tiempo.

Las Figuras 8A a 8F muestran gráficamente los niveles de esfingomielina en el cerebro de ratones tratados y no tratados.

Las Figuras 9A a 9D muestran gráficamente los niveles de esfingomielina en varias vísceras de ratones tratados y no tratados.

#### 15 Descripción detallada de la invención

A lo largo de esta descripción, varias publicaciones, patentes y memorias de patente publicadas se mencionan mediante una cita identificativa.

#### Definiciones

20 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están dentro de las competencias de la técnica. Véase p.ej., Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición (1989); *Current Protocols In Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al. eds., (1987)); la serie *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc.): *Pcr 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual And Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)).

Como se usa en la presente memoria, ciertos términos tienen los siguientes significados definidos. Como se usa en la memoria y reivindicaciones, la forma singular “un”, “una” y “el/la” incluyen las referencias plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. Por ejemplo, el término “una célula” incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.

30 Los términos “polinucleótido” y “oligonucleótido” se usan de forma intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, o desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen (por ejemplo, una sonda, cebador, EST o cola SAGE), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas y cebadores de ácido nucleico. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótido. Si están presentes, las modificaciones a la estructura de nucleótidos pueden darse antes o después del montaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes que no son nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcaje. El término también se refiere a moléculas tanto de doble hebra como de hebra sencilla. A menos que se especifique o necesite otra cosa, cualquier ejemplo de esta descripción que sea un polinucleótido incluye tanto la forma de doble hebra como cada una de las dos formas de hebra sencilla complementarias conocidas o que se prevé que constituyen la forma de doble hebra.

45 Un polinucleótido está compuesto por una secuencia específica de cuatro bases de nucleótido: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); y uracilo (U) por guanina cuando el polinucleótido es ARN. Por consiguiente, el término “secuencia de polinucleótido” es la representación alfabética de una molécula de polinucleótido. Esta representación alfabética puede introducirse en bases de datos en un ordenador que tenga una unidad de procesado central y usarse para aplicaciones bioinformáticas tales como genómica funcional y búsqueda de homologías.

50 Un “gen” se refiere a un polinucleótido que contiene al menos un marco de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés) que es capaz de codificar un polipéptido o proteína particular después de transcribirse y traducirse. Cualquiera de las secuencias de polinucleótidos descritos en la presente memoria puede usarse para identificar fragmentos mayores o secuencias de codificación de longitud completa del gen con el que están asociadas. Los métodos de aislamiento de secuencias de fragmentos mayores se conocen por los expertos en la técnica.

Un “producto génico” o de forma alternativa un “producto de expresión génica” se refiere al aminoácido (p.ej., péptido o polipéptido) generado cuando un gen se transcribe y se traduce.

El término “polipéptido” se usa de forma intercambiable con el término “proteína” y en su sentido más amplio se refiere a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácido o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar unidas por enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad puede estar unida por otros enlaces, p.ej., éster, éter, etc. Como se usa en la presente memoria el término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen glicina y ambos isómeros ópticos D y L, análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina normalmente un oligopéptido si la cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga, el péptido se denomina normalmente un polipéptido o una proteína.

“Bajo control transcripcional” es un término bien entendido en la técnica e indica que la transcripción de una secuencia de polinucleótidos, normalmente una secuencia de ADN, depende de que esté unida de forma operativa a un elemento que contribuya al inicio de, o promueva, la transcripción. “Unido de forma operativa” se refiere a una yuxtaposición en la que los elementos están en una disposición que los permita funcionar.

Como se usa en la presente memoria, el término “que comprende” pretende indicar que las composiciones y métodos incluyen los elementos enumerados, pero que no excluyen otros. “Que consiste esencialmente en” cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará que excluye otros elementos de cualquier importancia esencial a la combinación. Por consiguiente, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se definen en la presente memoria no excluiría contaminantes traza del método de aislamiento y purificación y vehículos farmacéuticamente aceptables, tal como solución salina tamponada con fosfato, conservantes y similares. “Que consiste en” significará que excluye más que los elementos traza de otros ingredientes y etapas de método esenciales para administrar las composiciones de esta invención. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

El término “aislado” significa separado de los constituyentes, celulares y de otro tipo, en que el polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de los mismos, están normalmente asociados en la naturaleza. En un aspecto de esta descripción, un polinucleótido aislado está separado de los nucleótidos contiguos 3' y 5' con los que está normalmente asociado en su medio nativo o natural, por ejemplo, en el cromosoma. Como es evidente para los expertos en la técnica, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de los mismos, que no se da de forma natural, no necesita “aislamiento” para distinguirlo de su contraparte que se da de forma natural. Además, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de los mismos, “concentrado”, “separado” o “diluido”, es distinguible de su contraparte que se da de forma natural en que la concentración o número de moléculas por volumen es mayor que “concentrado” o menos que “separado” que la de su contraparte que se da de forma natural. Un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de los mismos, que difiere de la contraparte que se da de forma natural en su secuencia primaria o, por ejemplo, por su patrón de glucosilación, no necesita estar presente en su forma aislada ya que es distinguible de su contraparte que se da de forma natural por su secuencia primaria o, de forma alternativa, por otra característica tal como el patrón de glucosilación. Por consiguiente, un polinucleótido que no se da de forma natural se proporciona como un ejemplo separado del polinucleótido aislado que se da de forma natural. Una proteína producida en una célula bacteriana se proporciona como un ejemplo separado de la proteína que se da de forma natural aislada de una célula eucariota que se produce en la naturaleza.

“Distribución génica”, “transferencia génica”, y similares como se usan en la presente memoria, son términos que se refieren a la introducción de un polinucleótido exógeno (a veces denominado como un “transgén”) en una célula huésped, independientemente del método usado para la introducción. Dichos métodos incluyen una variedad de técnicas bien conocidas tal como transferencia génica mediada por un vector (mediante, p.ej., infección vírica/transfección o varios complejos distintos de distribución génica basada en proteínas o basada en lípidos) además de técnicas que facilitan la distribución de polinucleótidos “desnudos” (tal como electroporación, distribución por “pistola génica” y varias técnicas distintas usadas para la introducción de polinucleótidos). El polinucleótido introducido puede mantenerse de forma estable o transitoria en la célula huésped. El mantenimiento estable necesita típicamente que el polinucleótido introducido o contenga un origen de replicación compatible con la célula huésped o se integre en un replicón de la célula huésped tal como un replicón extracromosómico (p.ej., un plásmido) o un cromosoma nuclear o mitocondrial. Se conoce un número de vectores en la técnica que son capaces de mediar la transferencia de genes a células de mamífero.

Un “vehículo de distribución génica” se define como cualquier molécula que puede llevar insertados polinucleótidos a una célula huésped. Ejemplos de vehículos de distribución génica son liposomas, polímeros biocompatibles, que incluyen polímeros naturales y polímeros sintéticos; lipoproteínas; polipéptidos; polisacáridos; lipopolisacáridos; envolturas víricas artificiales; células de levadura recombinantes; partículas metálicas; y bacterias o virus, tal como baculovirus, adenovirus y retrovirus, bacteriófago, cósmido, plásmido, vectores fúngicos y otros vehículos de recombinación usados típicamente en la técnica que se han descrito para la expresión en una variedad de huéspedes eucariotas y procariotas y pueden usarse para terapia génica además de para la simple expresión de proteínas.

Un “vector vírico” se define como un virus o partícula vírica producido de forma recombinante que comprende un polinucleótido a distribuir en una célula huésped, o bien *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Ejemplos de vectores víricos incluyen vectores retrovirales, vectores de adenovirus, vectores de virus adeno-asociados, vectores de alfavirus y similares. Los vectores de alfavirus, tal como vectores basados en el virus del bosque Semliki y vectores basados en el virus Sindbis, también se han desarrollado para usar en terapia génica e inmunoterapia. Véase, Schlesinger y Dubensky (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 5:434-439 y Ying et al. (1999) *Nat. Med.* 5(7):823-827. En aspectos donde la transferencia génica está mediada por un vector retroviral, un constructo de vector se refiere al polinucleótido que comprende el genoma retroviral o parte del mismo y un gen terapéutico. Como se usa en la presente memoria, “transferencia génica mediada retroviral” o “transducción retroviral” tiene el mismo significado y se refiere al proceso por el que unas secuencias genéticas o de ácido nucleico se transfieren de forma estable en la célula huésped por medio del virus que entra en la célula e integra su genoma en el genoma de la célula huésped. El virus puede entrar a la célula huésped por medio de su mecanismo normal de infección o modificarse de manera que se una a un receptor de superficie de la célula huésped o ligando diferente para entrar a la célula. Como se usa en la presente memoria, “vector retroviral” se refiere a una partícula vírica capaz de introducir ácido nucleico exógeno en una célula a través de un mecanismo de entrada vírico o tipo vírico.

En aspectos donde la transferencia génica está mediada por un vector vírico de ADN, tal como un adenovirus (Ad) o virus adeno-asociado (AAV, por sus siglas en inglés), un constructo de vector se refiere al polinucleótido que comprende el genoma vírico o parte del mismo y un transgén. Los adenovirus (Ads) son un grupo homogéneo, relativamente bien caracterizado, de virus, que incluyen más de 50 serotipos. Véase p.ej. el documento WO 95/27071. Los Ads son fáciles de desarrollar y no necesitan la integración en el genoma de la célula huésped. Los vectores derivados de Ad recombinante, particularmente los que reducen el potencial para la recombinación y generación de virus tipo salvaje, también se han construido. Véase p.ej., los documentos WO 95/00655 y WO 95/11984. El AAV de tipo salvaje tiene alta capacidad de infección y especificidad integrándose en el genoma de la célula huésped. Véase, Hermonat y Muzyczka (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470 y Lebkowski et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:3988-3996. Los vectores AAV recombinantes también se conocen en la técnica. Véase, p.ej. el documento WO 01/36620 A2.

Los vectores que contienen tanto un promotor como un sitio de clonación en los que un polinucleótido puede unirse de forma operativa se conocen bien en la técnica. Dichos vectores son capaces de transcribir ARN *in vitro* o *in vivo* y están disponibles comercialmente a partir de fuentes tales como Stratagene (La Jolla, CA) y Promega Biotech (Madison, WI). Para optimizar la expresión y/o transcripción *in vitro*, puede ser necesario eliminar, añadir o alterar las partes no traducidas 5' y/o 3' de los clones para eliminar codones de iniciación de traducción alternativos extra, potencialmente inapropiados, u otras secuencias que puedan interferir con o reducir la expresión, o bien al nivel de transcripción o de traducción. De forma alternativa, sitios de unión al ribosoma de consenso pueden insertarse inmediatamente 5' del codón de partida para mejorar la expresión.

Los vehículos de distribución génica también incluyen varios vectores no víricos, que incluyen complejos ADN/liposoma, células de levadura recombinantes y complejos ADN-proteína vírica dirigida. Los liposomas que comprenden también un anticuerpo dirigido o fragmento del mismo pueden usarse en los métodos de esta descripción. Para mejorar la distribución a una célula, el ácido nucleico o proteínas de esta invención pueden conjugarse con anticuerpos o fragmento(s) de unión de los mismos que se unen a antígenos de la superficie celular, p.ej., TCR, CD3 o CD4.

Los términos “partículas genómicas (pg)” o “equivalentes genómicos”, como se usan en referencia a un título vírico, se refieren al número de viriones que contienen el genoma de ADN de AAV recombinante, independientemente de la capacidad de infección o funcionalidad. El número de partículas genómicas en un preparado de vector particular puede medirse mediante procedimientos tal como se describe en los ejemplos en la presente memoria o, por ejemplo, en Clark et al. (1999) *Hum. Gene Ther.* 10:1031-1039 y Veldwijk et al. (2002) *Mol. Ther.* 6:272-278.

Los términos “unidad de infección (ui)”, “partícula infecciosa” o “unidad de replicación”, como se usan en referencia a un título vírico, se refieren al número de partículas de vector infeccioso como se mide por el ensayo de centro infeccioso, también conocido como ensayo de centro de replicación, como se describe, por ejemplo, en McLaughlin et al. (1988) *J. Virol.* 62:1963-1973.

El término “unidad de transducción (ut)” como se usa en referencia a un título vírico, se refiere al número de partículas de vector infeccioso que dan por resultado la producción de un producto transgénico funcional como se mide en ensayos funcionales tal como se describe en Xiao et al. (1997) *Exp. Neurobiol.* 144:113-124 o en Fisher et al. (1996) *J. Virol.* 70:520-532 (ensayo LFU).

Los términos “terapéutico”, “cantidad terapéuticamente efectiva”, y sus análogos se refieren a esa cantidad de un compuesto que da por resultado la prevención o retraso del comienzo o mejora de los síntomas de un sujeto o una consecución de un resultado biológico deseado, tal como la corrección de neuropatología, p.ej., patología celular asociada con una enfermedad de almacenamiento lisosómico tal como la descrita en la presente memoria o en Walkley (1998) *Brain Pathol.* 8:175-193. El término “corrección terapéutica” se refiere al grado de corrección que da por resultado la prevención o retraso del comienzo o mejora de los síntomas en un sujeto. La cantidad efectiva puede determinarse por métodos bien conocidos en la técnica y como se describe en las posteriores secciones.

Una “composición” pretende indicar una combinación de agente activo y otro compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o marca detectable) o activo, tal como un adyuvante.

Una “composición farmacéutica” pretende incluir la combinación de un agente activo con un vehículo, inerte o activo, haciendo a la composición adecuada para el uso diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

5 Como se usa en la presente memoria, el término “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar, tal como una solución salina tamponada con fosfato, agua y emulsiones, tal como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite y varios tipos de agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizadores y conservantes. Para ejemplos de vehículos, estabilizadores y adyuvantes; véase, Martin, Remington’s Pharm. Sci, 15ª Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975)).

10 Una “cantidad efectiva” es una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados tales como prevención o tratamiento. Una cantidad efectiva puede administrarse en una o más administraciones, aplicaciones o dosis.

15 Un “sujeto”, “individuo” o “paciente” se usa de forma intercambiable en la presente memoria, que se refiere a un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un humano. Los mamíferos incluyen, aunque no están limitados a, murinas, simios, humanos, animales de granja, animales para deportes y mascotas.

20 Un “control” es un sujeto o muestra alternativa usada en un experimento con propósito de comparación. Un control puede ser “positivo” o “negativo”. Por ejemplo, donde el propósito del experimento es determinar una correlación de un nivel de expresión alterado de un gen con una enfermedad, es generalmente preferible usar un control positivo (un sujeto o una muestra de un sujeto, que lleva dicha alteración y muestra síndromes característicos de esa enfermedad) y un control negativo (un sujeto o una muestra de un sujeto que carece de la expresión alterada y síndrome clínico de esa enfermedad).

25 Administración de proteínas por medio de terapia génica de vectores víricos capaces de infectar neuronas post-mitóticas. Para una revisión de vectores víricos para la distribución génica al SNC, véase Davidson et al. (2003) Nature Rev. 4:353-364. Los vectores de virus adeno-asociados (AAV) son útiles para la terapia génica del SNC porque son esencialmente no tóxicos, no inmunogénicos, neurotrópicos y pueden mantener la expresión en el SNC (Kaplitt et al. (1994) Nat. Genet. 8:148-154; Bartlett et al. (1998) Hum. Gene Ther. 9:1181-1186; y Passini et al. (2002) J. Neurosci. 22:6437-6446). Como se demuestra en la presente memoria la expresión de un transgén en el cerebro de un animal dio por resultado una respuesta inmune al producto transgénico. Véase la Figura 7A.

30 Los solicitantes han descubierto que la administración de un transgén al SNC de un mamífero al que se ha inducido la tolerancia al transgén aumenta la eficacia del tratamiento. Por consiguiente, en un aspecto, esta descripción proporciona un método para inducir la tolerancia del cerebro de un mamífero a un inmunógeno pre-seleccionado administrando de forma sistémica una cantidad efectiva del inmunógeno pre-seleccionado al mamífero antes de la administración de una cantidad efectiva del inmunógeno pre-seleccionado al SNC del mamífero. Como se usa en la presente memoria, el término “inducir la tolerancia” pretende indicar reducir la respuesta inmune a un inmunógeno. El término “inmunógeno” incluirá cualquier agente que aumente inicialmente una respuesta inmune (mediada por célula T o célula B). Como se demuestra por Ziegler et al. (2004), la expresión transgénica en el hígado después de la administración de un vector AAV recombinante que codifica el transgén bajo el control de un potenciador/promotor específico del hígado dio por resultado una respuesta de anticuerpo reducida frente al transgén expresado.

40 El método es adecuado para cualquier mamífero, y como tal, un “mamífero” incluye, aunque no está limitado a murinas, simios, humanos, animales de granja, animales para deportes y mascotas. En un aspecto particular, el mamífero es el ratón ASKMO que es el modelo de animal aceptado de la enfermedad de Niemann-Pick tipos A y B. Horinouchi et al. (1995) Nat. Genetics 10:288-293; Jin et al. (2002) J. Clin. Invest. 109:1183-1191; y Otterbach (1995) Cell 81:1053-1061.

45 La enfermedad de Niemann-Pick A (NPA) se clasifica como una enfermedad de almacenamiento lisosómico y es un trastorno neurometabólico heredado caracterizado por una deficiencia genética en esfingomielinasa ácida (EMA; esfingomielina colinafosfohidrolasa, EC 3.1.3.12). La carencia de proteína EMA funcional da por resultado la acumulación de sustrato esfingomielina en los lisosomas de las neuronas y la glía por todo el cerebro. Esto lleva a la formación de grandes números de lisosomas distendidos en el pericarión, que son una característica distintiva y el fenotipo celular primario de NPD tipo A. La presencia de lisosomas distendidos correlaciona con la pérdida de la función celular normal y un curso neurodegenerativo progresivo que lleva a la muerte del individuo afectado en la primera infancia (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases, eds. Scriver et al., McGraw-Hill, Nueva York, 2001, págs. 3589-3610). Los fenotipos celulares secundarios (p.ej., anomalías metabólicas adicionales) también se asocian con esta enfermedad, especialmente la acumulación de alto nivel de colesterol en el compartimiento lisosómico. La esfingomielina tiene fuerte afinidad por el colesterol, que da por resultado el secuestro de grandes cantidades de colesterol en los lisosomas de ratones ASKMO y pacientes humanos. Leventhal et al. (2001) J. Biol. Chem., 276:44976-44983; Slotte (1997) Subcell. Biochem. 28:277-293; y Viana et al. (1990) J. Med. Genet. 27:499-504.

En un aspecto específico, el sitio sistémico de administración es el hígado del mamífero. Puede usarse cualquier método de administración, ejemplos de los cuales se proporcionan a continuación.

5 Después de la administración sistémica del transgén, se administra al SNC del mamífero y en particular, directamente de forma intracraneal en el cerebro del mamífero y más particularmente en un sitio seleccionado del grupo que consiste en el bulbo raquídeo, el hipocampo, el cuerpo estriado, la médula, la protuberancia anular, el mesencéfalo, el cerebelo, el cerebro medio, el tálamo, el hipotálamo, la corteza cerebral, el lóbulo occipital, el lóbulo temporal, el lóbulo parietal, y el lóbulo frontal. En una realización, la administración es específica a los núcleos cerebelosos profundos del cerebelo.

10 Como se ha observado anteriormente, el transgén que codifica el polipéptido o proteína se administra al mamífero para distribuir en última instancia el polipéptido o proteína usando cualquier método de transferencia génica apropiado, ejemplos de los cuales se han descrito anteriormente y en la Patente de EE.UU. núm. 6.066.626. En un aspecto, el transgén codifica EMA. Las secuencias de ADNc genómico y funcional de EMA humana se han publicado en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. núms. 5.773.278 y 6.541.218). Otros inmunógenos de proteína adecuados que tienen implicación en el SNC se identifican en la Tabla 1.

15 Los vectores víricos son vectores de transferencia génica útiles. En una realización particular, el vector vírico se selecciona del grupo que consiste en adenovirus, virus adeno-asociado (AAV), virus vacunal, virus del herpes, baculovirus y retrovirus.

20 Vectores AAV adecuados se describen a lo largo de la Patente de EE.UU. núm. 6.066.626 y la Publicación PCT núm. WO 01/36620 A2. Los vectores modificados, como se describen en la columna 9, líneas 14 a 66, también pueden usarse. Serotipos adecuados incluyen, aunque no están limitados a AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 o AAV8. El vector AAV puede ser un vector AAV recombinante o híbrido, p.ej., uno seleccionado del grupo que consiste en AAV2/1, AAV2/5, AAV2/7, AAV2/8, AAV1/2, AAV1/3, AAV1/5, AAV1/7 y AAV1/8, vectores de serotipo, en los que la nomenclatura se refiere al serotipo del que se generan las ITRs/el serotipo del que se genera la cápside. Por ejemplo, un vector AAV2/5 comprende las ITRs del serotipo de AAV2 y la cápside del serotipo de AAV5.

25 Una cantidad efectiva del polipéptido, mediante administración de un vector vírico que comprende un transgén del que se genera un polipéptido, se distribuye al mamífero. En un aspecto, un vector vírico que comprende un transgén se distribuye al hígado e, inmediatamente después de la distribución hepática, un vector vírico que comprende dicho transgén se distribuye al SNC.

30 En un ejemplo alternativo, la posterior administración del vector vírico al SNC se da después de que el polipéptido se haya expresado en el mamífero durante una cantidad efectiva de tiempo para generar la inducción a la tolerancia del mamífero a dicho polipéptido. Esto puede variar con el paciente a tratar, el polipéptido distribuido, y el efecto terapéutico deseado. El curso de tiempo apropiado y el número de administraciones posteriores al SNC se determina por el médico. Para determinar si un mamífero tiene inducida la tolerancia a un polipéptido, se puede poner a prueba al mamífero con el polipéptido para determinar si dicha exposición genera una respuesta inmune frente al polipéptido. La respuesta inmune puede determinarse midiendo un título de anticuerpo frente al polipéptido después de la exposición. Un título de anticuerpo reducido o insignificante, en comparación con los controles apropiados, después de la exposición puede ser indicativo de un estado de inducción de la tolerancia. Los medios para medir y generar respuestas de anticuerpo en mamíferos, para poner a prueba a un mamífero con un antígeno o inmunógeno, y para determinar los títulos de anticuerpo se conocen bien en la técnica. La cantidad apropiada de tiempo para general la inducción a la tolerancia del mamífero puede seleccionarse también determinando la cantidad efectiva de tiempo para que la expresión genere dicha inducción a la tolerancia en un sujeto de ensayo. La cantidad seleccionada de tiempo puede aplicarse entonces a los presentes métodos sin la necesidad de probar a cada paciente individualmente.

45 En un ejemplo, la posterior administración del vector vírico al SNC se da después de detectarse la expresión del polipéptido codificado por el vector vírico distribuido al hígado. La detección de la expresión del polipéptido puede conseguirse por cualquier método conocido en la técnica, ejemplos de los cuales incluyen, aunque no están limitados a molecularmente (detectando ARNm) o inmunológicamente (detectando la expresión de proteína) o bioquímicamente (detectando la actividad del polipéptido, tal como actividad enzimática, donde dicha actividad exista).

50 De forma alternativa, la posterior administración puede ser horas o días o semanas después de la primera administración. El uso de múltiples administraciones al SNC a múltiples sitios de administración del SNC también está dentro del alcance de esta descripción.

55 Por consiguiente, en un aspecto específico de esta descripción, se proporciona un método para inducir la tolerancia del cerebro de un mamífero al polipéptido de esfingomielinasa ácida. El método administra sistémicamente una cantidad efectiva de un transgén que codifica el polipéptido al hígado del mamífero antes de la administración de una cantidad efectiva del transgén que codifica el polipéptido al tejido del sistema nervioso central (SNC) del mamífero.

En un aspecto más particular de esta descripción, se proporciona un método para mejorar los síntomas asociados con la enfermedad de Niemann-Pick tipo A (NPA) en un mamífero que padece NPA. Este método necesita administrar al sistema nervioso central (SNC) del mamífero una cantidad efectiva de transgén que codifica un polipéptido de esfingomielinasa ácida y en el que dicha administración es posterior a la administración sistémica de una cantidad efectiva del transgén al tejido hepático del mamífero, de manera que la capacidad del mamífero para provocar una respuesta inmune específica al antígeno al polipéptido se deroga o reduce significativamente antes de la administración al SNC.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para mejorar los síntomas asociados con la enfermedad de Niemann-Pick tipo A (NPA) en un mamífero que padece NPA. Dichos síntomas incluyen, aunque no están limitados a pérdida de peso o caquexia, pérdida de función motora, pérdida de función cognitiva y muerte prematura. El método requiere administrar al SNC del mamífero una cantidad efectiva de un vector vírico que comprende un transgén que codifica polipéptido de esfingomielinasa ácida después de la administración de una cantidad efectiva de un vector vírico que comprende dicho transgén al tejido hepático del mamífero. En otro ejemplo, el área del SNC al que el vector vírico se distribuye es el cerebro.

En un aspecto aún adicional, la descripción proporciona un método para tratar la enfermedad de Niemann-Pick tipo A (NPA) en un mamífero que padece NPA administrando una cantidad efectiva de un vector vírico AAV que comprende un transgén que codifica un polipéptido de esfingomielinasa ácida al tejido hepático del mamífero y posteriormente distribuir una cantidad efectiva de un vector AAV que comprende un transgén que codifica un polipéptido de esfingomielinasa ácida al SNC del mamífero, tratando así la NPA en el mamífero. En otro ejemplo de la descripción, y en la administración del segundo vector vírico según la invención reivindicada, el área del SNC al que el vector vírico se distribuye es el cerebro.

Como se usa en la presente memoria, los términos “que trata”, “tratamiento” y similares se usan en la presente memoria para indicar la obtención de un efecto terapéutico, farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención completa o parcialmente de la enfermedad o una señal o síntoma de la misma, y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa del trastorno y/o efecto adverso atribuible al trastorno.

“Que trata” también cubre cualquier tratamiento de un trastorno en un mamífero, e incluye: prevenir que un trastorno ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto a un trastorno, pero no ha sido aún diagnosticado como que lo tiene, p.ej., un paciente que ha dado positivo para el marcador genético para la enfermedad; inhibir un trastorno, es decir, detener su desarrollo; o aliviar o mejorar el trastorno, p.ej., provocar la regresión del trastorno, p.ej., enfermedad de NPA.

Como se usa en la presente memoria, “tratar” incluye además la mejora sistémica de los síntomas asociados con la patología y/o un retraso en el comienzo de los síntomas. La evidencia clínica y sub-clínica del “tratamiento” variará con la patología, el individuo y el tratamiento.

En algunos ejemplos, el método comprende la administración de un vector AAV que porta un inmunógeno o transgén pre-seleccionado de manera que el producto transgénico se expresa a un nivel terapéutico en el sitio seleccionado. En algunos ejemplos y realizaciones, el título vírico de la composición es al menos: (a) 1,5, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,25, 3,5, 4,0, 4,5 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 o 50 ( $\times 10^{11}$  copias genómicas por inyección (cg); (b) 1,5, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,25, 3,5, 4,0, 4,5, 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 o 50 ( $\times 10^9$  ut/ml); o (c) 1,5, 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0, 3,25, 3,5, 4,0, 4,5, 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 o 50 ( $\times 10^{10}$  unidades infecciosas [iuj]/ml).

La administración intracraneal puede ser en cualquier región en el cerebro y puede incluir múltiples regiones cuando se administra más de una distribución intracraneal. Dichos sitios incluyen, por ejemplo, en el bulbo raquídeo (médula y protuberancia anular), mesencéfalo, cerebro medio, cerebelo (que incluye los núcleos cerebelosos profundos), diencefalo (tálamo, hipotálamo), telencefalo (cuerpo estriado, mesencéfalo, corteza cerebral o, en la corteza, los lóbulos occipital, temporal, parietal o frontal). Ejemplos específicos de sitios de inyección intracraneal se muestran en la Figura 1.

Para la identificación de estructuras en el cerebro humano, véase, p.ej., *The Human Brain: Surface, Three-Dimensional Sectional Anatomy With MRI, and Blood Supply*, 2ª ed., eds. Deuteron et al., Springer Vela, 1999; *Atlas of the Human Brain*, eds. Mai et al., Academic Press; 1997, y *Co-Planar Sterotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging*, eds. Tamarack et al., Thyme Medical Pub., 1988. Para la identificación de estructuras en el cerebro de ratón, véase, p.ej., *The Mouse Brain in Sterotaxic Coordinates*, 2ª ed., Academic Press, 2000. Si se desea, la estructura del cerebro humano puede correlacionarse con estructuras similares en el cerebro de otro mamífero. Por ejemplo, la mayoría de mamíferos, incluyendo humanos y roedores, muestran una organización topográfica similar de las proyecciones entorninal-hipocampo, con neuronas en la parte lateral tanto de la corteza entorninal lateral como media que se proyectan a la parte dorsal o polo septal del hipocampo, mientras la proyección al hipocampo ventral se origina principalmente a partir de neuronas en las partes mediales de la corteza entorninal (*Principles of Neural Science*, 4ª ed., eds. Kandel et al., McGraw-Hill, 1991; *The Rat Nervous System*, 2ª ed., ed. Paxinos, Academic Press, 1995). Además, las células de la

capa II de la corteza entorrinal se proyectan a la circunvolución dentada, y terminan en los dos tercios externos de la capa molecular de la circunvolución dentada. Los axones de las células de la capa III se proyectan bilateralmente a las áreas del cuerno de Amón CA1 y CA3 del hipocampo, terminando en la capa molecular del stratum lacunose.

5 Para distribuir el vector específicamente a una región particular del sistema nervioso central, especialmente a una región particular del cerebro, puede administrarse por microinyección estereotáxica. Por ejemplo, en el día de la cirugía, los pacientes tendrán la base del marco estereotáxico fijo en el sitio (atornillado en el cráneo). Se formarán imágenes del cerebro con la base del marco estereotáxico (compatible con IRM con marcadores fiduciales) usando IRM de alta resolución. Las imágenes IRM se transferirán después a un ordenador que opera un software estereotáxico. Se usarán una serie de imágenes coronales, sagitales y axiales para determinar el sitio diana de la inyección del vector y la trayectoria. El software traduce directamente la trayectoria en coordenadas 3-dimensionales apropiadas para el marco estereotáxico. Se taladran agujeros de trépano por encima del sitio de entrada y el aparato estereotáxico se ubica con la aguja implantada a la profundidad dada. El vector en un vehículo farmacéuticamente aceptable se inyectará entonces. El vector AAV se administra entonces por inyección directa al sitio diana principal y se transporta de forma retrógrada a los sitios diana distales por medio de los axones. Pueden usarse rutas de administración adicionales, p.ej., aplicación cortical superficial bajo visualización directa, u otra aplicación no estereotáxica.

15 El volumen total de material a administrar, y el número total de partículas de vector a administrar, se determinará por los expertos en la técnica en base a aspectos conocidos de la terapia génica. La efectividad terapéutica y la seguridad pueden probarse en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, una variedad de modelos animales bien caracterizados existen para las EALs, p.ej., como se describe en la presente memoria o en Watson et al. (2001) *Methods Mol. Med.*, 76:383-403; o Jeyakumar et al. (2002) *Neuropath. Appl. Neurobiol.*, 28:343-357; o en *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8ª edición (2001), publicado por McGraw-Hill.

20 En ratones experimentales, el volumen total de disolución de AAV inyectado es, por ejemplo, entre 1 a 5 µl o aproximadamente 3 µl por sitio de inyección, o de forma alternativa entre 10 a 400 µl o de forma alternativa, entre 100 a 400 µl, de forma alternativa entre 150 a 250 µl o de forma alternativa aproximadamente 200 µl. Para otros mamíferos, incluyendo el cerebro humano, los volúmenes y velocidades de distribución se escalan de forma apropiada. Por ejemplo, se ha demostrado que volúmenes de 150 µl pueden inyectarse de forma segura en el cerebro de primates (Janson et al. (2002) *Hum. Gene Ther.*, 13:1391-1412). El tratamiento puede consistir en una única inyección por sitio diana, o puede repetirse a lo largo del área de inyección, si es necesario. Pueden usarse múltiples sitios de inyección. Por ejemplo, en algunas realizaciones, además del primer sitio de administración, se administra una composición que comprende AAV que porta un transgén a otro sitio que puede ser contralateral o ipsilateral al primer sitio de administración.

25 En los métodos de la descripción, puede usarse AAV de cualquier serotipo. En un ejemplo o realización, pueden usarse vectores AAV capaces de experimentar transporte axónico retrógrado. El serotipo del vector vírico puede seleccionarse del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 y AAV8 (véase, p.ej., Gao et al. (2002) *PNAS*, 99:11854-11859; y *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Humana Press, 2003). Pueden usarse otros serotipos además de los enumerados en la presente memoria. También pueden usarse vectores AAV pseudotipados, que son los que comprenden ITRs de un serotipo AAV en la cápside de un segundo serotipo AAV; por ejemplo, un vector AAV que contiene la cápside AAV2 y el genoma AAV1 o un vector AAV que contiene la cápside AAV5 y el genoma AAV2. (Auricchio et al. (2001) *Hum. Mol. Genet.*, 10(26):3075-81).

30 Los vectores AAV se derivan de parvovirus ADN de hebra simple (ss) que son no patógenos para los mamíferos (revisado en Muzyscka (1992) *Curr. Top. Microb. Immunol.*, 158:97-129). Brevemente, los vectores con base de AAV han eliminado los genes víricos rep y cap que representan el 96% del genoma vírico, dejando las dos repeticiones terminales invertidas (ITRs, por las siglas en inglés) de 145 pares de bases (pb) laterales, que se usan para iniciar la replicación, empaquetado e integración del ADN vírico. En ausencia de virus ayudante, el AAV tipo salvaje se integra en el genoma de la célula huésped humana con especificidad de sitio preferente en el cromosoma 19q 13.3 o puede permanecer expresado de forma episomal. Una única partícula AAV puede acomodar hasta 5 kb de ssADN, dejando por lo tanto aproximadamente 4,5 kb para un transgén y elementos reguladores, que es típicamente suficiente. Sin embargo, los sistemas trans-empalme como se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos núm. 6.544.785, pueden casi doblar este límite.

35 En una realización ilustrativa, el AAV es AAV2 o AAV8. Se han estudiado de manera extensa los virus adeno-asociados de muchos serotipos, tal como AAV2, y caracterizado como vectores de terapia génica. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con la preparación de vectores de terapia génica basados en AAV funcionales. Pueden encontrarse numerosas referencias a varios métodos de producción, purificación y preparación de AAV para la administración a sujetos humanos en el extenso conjunto de bibliografía publicada (véase, p.ej., *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Humana Press, 2003). Adicionalmente, la terapia génica basada en AAV dirigida a células del SNC se ha descrito en las Patentes de Estados Unidos núms. 6.180.613 y 6.503.888.

El nivel de expresión transgénica en células eucariotas puede regularse por el promotor y/o potenciador(es) transcripcional(es) en el cartucho de expresión transgénica. Los promotores específicos del tejido, tal como promotores específicos del hígado, pueden usarse en algunas realizaciones. Los potenciadores específicos del tejido, tal como potenciadores específicos del hígado, pueden usarse en algunas realizaciones. Combinaciones de promotores específicos del tejido y potenciadores específicos del tejido, tal como promotores y potenciadores específicos del hígado, pueden usarse en la práctica de la presente invención.

Ejemplos no limitantes de promotores incluyen, aunque no están limitados a, el promotor de citomegalovirus (CMV) (Kaplitt et al. (1994) Nat. Genet. 8:148-154), promotor de CMV/ $\beta$ 3-globina humana (Mandel et al. (1998) J. Neurosci. 18:4271-4284), promotor de GFAP (Xu et al. (2001) Gene Ther., 8:1323-1332), el promotor de enolasa específica de la neurona (NSE) de 1,8 kb (Klein et al. (1998) Exp. Neurol. 150:183-194), promotor de la beta actina de pollo (CBA) (Miyazaki (1989) Gene 79:269-277) y el promotor de  $\beta$ -glucuronidasa (GUSB) (Shibley et al. (1991) Genetics 10:1009-1018), el promotor de albúmina de suero humana, el promotor de alfa-1-antitripsina. Para mejorar la expresión, pueden unirse de forma operable adicionalmente otros elementos reguladores al transgén, tal como, p.ej., el Elemento Post-Regulador del Virus de la Hepatitis Woodchuck (WPPE) (Donello et al. (1998) J. Virol. 72:5085-5092) o el sitio de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH).

Promotores adicionales que son adecuados para la presente invención pueden ser cualquier promotor constitutivo fuerte que sea capaz de promover la expresión de una secuencia de ADN de codificación asociada en el hígado. Dichos promotores constitutivos fuertes incluyen el promotor de citomegalovirus humano y murino, promotores de CMV truncados, promotor de albúmina de suero humana [HSA] y el promotor de alfa-1-antitripsina.

Los elementos potenciadores específicos del hígado útiles para la presente invención puede ser cualquier potenciador específico del hígado que sea capaz de potenciar la expresión específica del tejido de una secuencia de ADN de codificación asociada en el hígado. Dichos potenciadores específicos del hígado incluyen uno o más potenciadores de albúmina de suero humana (HSA), potenciadores de protrombina humana (HPrT), potenciadores de alfa-1-microglobulina (A1MB), y potenciadores de aldolasa intrónica. Pueden combinarse múltiples elementos potenciadores para alcanzar una mayor expresión. Por ejemplo, dos potenciadores idénticos pueden combinarse con un promotor específico del hígado.

Los vectores víricos que comprenden las siguientes combinaciones promotor/potenciador pueden usarse en la práctica de la presente invención: uno o más potenciadores de HSA en combinación con o bien un promotor de CMV o un promotor de HSA; uno o más potenciadores seleccionados del grupo que consiste en el potenciador de protrombina humana (HPrT) y el potenciador de alfa-1-microglobulina A1MB) en combinación con un promotor de CMV; y uno o más elementos potenciadores seleccionados del grupo que consiste en potenciadores de HPrT de y potenciadores de A1MB, en combinación con un promotor de a-1-antitripsina.

Información adicional sobre constructos específicos del hígado se describen en la Solicitud Publicada PCT núm.: WO 01/36620. De forma alternativa, los promotores son/o potenciadores específicos neuronales son útiles para la distribución dirigida y la expresión de transgenes en el SNC.

En algunos aspectos, será deseable controlar la actividad transcripcional. Para este fin, puede obtenerse la regulación farmacológica de la expresión génica con vectores AAV incluyendo varios elementos reguladores y promotores sensibles al fármaco como se describe, por ejemplo, en Haberman et al. (1998) Gene Ther., 5:1604-16011; y Ye et al. (1995) Science 283:88-91.

Pueden producirse preparados AAV usando técnicas conocidas en la técnica, p.ej., como se describe en la Patente de Estados Unidos núm. 5.658.776 y Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003.

En ciertos aspectos, la detección de y/o el nivel de expresión del transgén puede desearse. Se conocen métodos para detectar la expresión génica en la técnica y pueden aplicarse fácilmente como se trata posteriormente, o modificarse por los expertos en la técnica.

Se conocen varios métodos para cuantificar la expresión de un gen de interés e incluyen, aunque no están limitados a ensayos de hibridación (análisis de transferencia de Northern) y ensayos de hibridación basados en PCR.

En el ensayo para una alteración en el nivel de ARNm, el ácido nucleico contenido en una muestra se extrae primero según un método estándar en la técnica. Por ejemplo, el ARNm puede aislarse usando varias enzimas líticas o disoluciones químicas según los procedimientos descritos en Sambrook et al. (1989), anteriormente o extraerse mediante resinas de unión a ácido nucleico siguiendo las instrucciones adjuntas proporcionadas por los fabricantes.

Las moléculas de ácido nucleico que tienen al menos 10 nucleótidos y que muestran complementariedad u homología de secuencia al producto de expresión pueden usarse como sondas de hibridación o cebadores de PCR. Se sabe en la técnica que una sonda "perfectamente compatible" no se necesita para una hibridación específica. Los cambios menores en la secuencia de la sonda conseguidos por sustitución, eliminación o inserción de un pequeño número de bases no afectan a la especificidad de la hibridación. En general, pueden tolerarse tanto como 20% de malapareamientos de pares de bases (cuando están alineadas de forma óptima). Por ejemplo, una sonda útil para

detectar ARNm es al menos aproximadamente idéntica al 80% a la región homóloga de tamaño comparable contenida en una secuencia identificada anteriormente, p.ej., secuencia de EMA. De forma alternativa, la sonda es al menos 85% o incluso al menos 90% idéntica a la secuencia génica correspondiente después del alineamiento de la región homóloga. El tamaño total del fragmento, además del tamaño de las extensiones complementarias, dependerá del uso previsto o aplicación del segmento de ácido nucleico particular. Fragmentos menores del gen encontrarán generalmente uso en la hibridación, en la que la longitud de la región complementaria puede variarse, tal como entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 nucleótidos, o incluso longitud completa según las secuencias complementarias que se deseen detectar.

Las sondas de nucleótido que tienen secuencias complementarias sobre extensiones mayores que aproximadamente 10 nucleótidos de longitud aumentarán la estabilidad y selectividad del híbrido, y mejoran por tanto la especificidad de las moléculas híbridas particulares obtenidas. Se pueden diseñar moléculas de ácido nucleico que tienen extensiones complementarias al gen de más de aproximadamente 25 e incluso más preferiblemente más de aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, o incluso más largas donde se desee. Dichos fragmentos pueden prepararse fácilmente, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento por medios químicos, mediante la aplicación de tecnología de reproducción de ácidos nucleicos, tal como la tecnología PCR<sup>TM</sup> con dos oligonucleótidos de cebado como se describe en la Patente de EE.UU. núm. 4.603.102 o introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para la producción recombinante.

En ciertas realizaciones, será ventajoso emplear secuencias de ácido nucleico de la presente descripción en combinación con un medio apropiado, tal como una marca, para detectar la hibridación y por lo tanto las secuencias complementarias. Se conoce una amplia variedad de medios indicadores apropiados en la técnica, que incluyen ligandos fluorescentes, radioactivos, enzimáticos u otros ligandos, tal como avidina/biotina, que son capaces de dar una señal detectable. También puede usarse una marca fluorescente o una etiqueta enzimática, tal como ureasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa, en vez de reactivos radiactivos u otros reactivos medioambientalmente indeseables. En el caso de etiquetas enzimáticas, se conocen sustratos indicadores colorimétricos que pueden emplearse para proporcionar un medio visible al ojo humano o espectrofotométricamente, para identificar la hibridación específica con muestras que contienen ácido nucleico complementario.

Las reacciones de hibridación pueden realizarse en condiciones de diferente "rigor". Las condiciones relevantes incluyen temperatura, fuerza iónica, tiempo de incubación, la presencia de solutos adicionales en la mezcla de reacción tal como formamida, y el procedimiento de lavado. Condiciones de mayor rigor son aquellas condiciones, tal como mayor temperatura y menor concentración de ión sodio, que necesitan una mayor complementariedad mínima entre los elementos de hibridación para formar un complejo de hibridación estable. Las condiciones que aumentan el rigor de una reacción de hibridación se conocen y están publicadas ampliamente en la técnica. Véase, Sambrook, et al. (1989) arriba.

También se puede utilizar, detectar y cuantificar el nivel de ARNm o su expresión usando PCR cuantitativo o análisis de alto rendimiento tal como Análisis en Serie de la Expresión Génica (SAGE) como se describe en Velculescu, V. et al. (1995) Science 270:484-487. Brevemente, el método comprende aislar múltiples ARNm de muestras de células o tejido que se sospecha que contienen el transcrito. Opcionalmente, los transcritos génicos pueden convertirse en ADNc. Un muestreo de los transcritos génicos se somete a análisis específico de la secuencia y se cuantifica. Estas abundancias de secuencia de transcrito génico se comparan frente a las abundancias de secuencia de la base de datos de referencia que incluyen conjuntos de datos normales para pacientes enfermos y sanos.

Las sondas también pueden unirse a un soporte sólido para usar en ensayos de cribado de alto rendimiento usando métodos conocidos en la técnica. La Solicitud PCT Internacional núm. WO 97/10365 y las Patentes de EE.UU. números 5.405.783, 5.412.087 y 5.445.934, por ejemplo, describen la construcción de trozos de oligonucleótidos de alta densidad que pueden contener una o más secuencias. Los trozos pueden sintetizarse en una superficie de vidrio derivada usando los métodos descritos en las Patentes de EE.UU. núms. 5.405.783; 5.412.087 y 5.445.934. Las fosforamiditas de nucleósido fotoprotectidas pueden acoplarse a la superficie de vidrio, desprotegerse de forma selectiva mediante fotólisis a través de una máscara fotolitográfica, y hacerse reaccionar con una segunda fosforamidita de nucleósido protegida. El proceso de acoplamiento/desprotección se repite hasta completarse la sonda deseada.

El nivel de expresión del gen puede determinarse a través de la exposición de una muestra que se sospecha que contiene el polinucleótido al trozo modificado con sonda. El ácido nucleico extraído se marca, por ejemplo, con una etiqueta fluorescente, preferiblemente durante una etapa de amplificación. La hibridación de la muestra marcada se realiza a un nivel de rigor apropiado. El grado de hibridación de sonda-ácido nucleico se mide cuantitativamente usando un dispositivo de detección, tal como un microscopio confocal. Véase, las Patentes de EE.UU. núms. 5.578.832 y 5.631.734. La medida obtenida se correlaciona directamente con el nivel de expresión génica.

Los ácidos nucleicos de la muestra y la sonda hibridados pueden detectarse por varios métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos hibridados pueden detectarse detectando una o más marcas unidas a los ácidos nucleicos de la muestra. Las marcas pueden incorporarse mediante cualquiera de un número de medios conocidos por los expertos en la técnica. En un aspecto, la marca se incorpora simultáneamente durante la etapa de amplificación en la preparación del ácido nucleico de la muestra. Por consiguiente, por ejemplo, la reacción de la

cadena polimerasa (PCR) con cebadores marcados o nucleótidos marcados proporcionará un producto de amplificación marcado. En un ejemplo separado, la amplificación de transcripción, como se describe anteriormente, que usa un nucleótido marcado (p.ej., UTP y/o CTP marcado con fluoresceína) incorpora una marca en los ácidos nucleicos transcritos.

5 De forma alternativa, una marca puede añadirse directamente a la muestra de ácido nucleico original (p.ej., ARNm, poliA, ARNm, ADNc, etc.) o al producto de amplificación después de completarse la amplificación. Los medios para unir marcas a ácidos nucleicos se conocen por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, traslado de mellas o marcaje final (p.ej., con un ARN marcado) mediante la fosforilación del ácido nucleico y la unión (ligado) posterior de un conector de ácido nucleico que une el ácido nucleico de muestra a una marca (p.ej., un fluoróforo).

10 Marcas detectables adecuadas para usar en la presente descripción incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Marcas útiles en la presente invención incluyen biotina para teñir con conjugado de estreptavidina marcada, perlas magnéticas (p.ej., Dynabeads™), tintes fluorescentes (p.ej., fluoresceína, rojo Texas, rodamina, proteína fluorescente verde, y similares), radiomarcas (p.ej., <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C o <sup>32</sup>P) enzimas (p.ej., peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y otras usadas normalmente en una ELISA), y marcas colorimétricas tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreado (p.ej., poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Las patentes que enseñan el uso de dichas marcas incluyen las Patentes de EE.UU. núms. 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241.

Los medios de detección de dichas marcas se conocen por los expertos en la técnica. Por consiguiente, por ejemplo, las radiomarcas pueden detectarse usando película fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse usando un fotodetector para detectar la luz emitida. Las marcas enzimáticas se detectan típicamente proporcionando la enzima con un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima en el sustrato, y las marcas colorimétricas se detectan visualizando sencillamente la marca coloreada.

La Publicación de Patente WO 97/10365 describe métodos para añadir la marca al (a los) ácido(s) nucleico(s) diana (muestra) antes de o alternativamente, después de la hibridación. Estas son marcas detectables que se unen directamente a o se incorporan al ácido nucleico diana (muestra) antes de la hibridación. En contraste, las "marcas indirectas" se unen al dúplex híbrido después de la hibridación. A menudo, la marca indirecta se une a un resto de unión que se ha acoplado al ácido nucleico diana antes de la hibridación. Por consiguiente, por ejemplo, el ácido nucleico diana puede biotinilarse antes de la hibridación. Después de la hibridación, un fluoróforo conjugado con avidina se unirá a los dúplex híbridos que portan biotina proporcionando una marca que se detecta fácilmente. Para una revisión detallada de métodos de marcaje de ácidos nucleicos y detección de ácidos nucleicos hibridados marcados, véase *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 24: Hybridization with Nucleic Acid Probes, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

La muestra de ácido nucleico también puede modificarse antes de la hibridación a la selección de sonda de alta densidad para reducir la complejidad de la muestra disminuyendo de este modo la señal de fondo y mejorando la sensibilidad de la medida usando los métodos descritos en la Solicitud PCT Internacional núm. WO 97/10365.

Los resultados del ensayo del chip se analizan típicamente usando un programa de software de ordenador. Véase, por ejemplo, los documentos EP 0717 113 A2 y WO 95/20681. El dato de hibridación se lee en el programa, que calcula el nivel de expresión del (de los) gen(es) diana. Esta figura se compara frente a los conjuntos de datos existentes de niveles de expresión génica para individuos enfermos y sanos. Una correlación entre los datos obtenidos y los de un conjunto de individuos enfermos indica el comienzo de una enfermedad en el paciente.

Se pueden modificar también los inmunoensayos conocidos para detectar y cuantificar la expresión. La determinación del producto génico requiere medir la cantidad de unión inmuno-específica que se da entre un anticuerpo reactivo al producto génico. Para detectar y cuantificar la unión inmuno-específica, o señales generadas durante los procedimientos de hibridación o amplificación, pueden emplearse sistemas de análisis de imagen digitales que incluyen, aunque no están limitados a los que detectan radioactividad de las sondas o quimioluminiscencia.

La expresión de un producto polipeptídico puede detectarse también usando medios bioquímicos como se conoce en la técnica para el polipéptido particular expresado.

50 Los siguientes ejemplos proporcionan realizaciones ilustrativas de la invención. Un experto en la técnica reconocerá las numerosas modificaciones y variaciones que pueden realizarse.

Dichas modificaciones y variaciones están incluidas en el alcance de la invención. Los ejemplos no limitan de ninguna forma la invención.

### Ejemplos

55 Titulación de vectores recombinantes

Los títulos del vector AAV pueden medirse según el número de copias genómicas (partículas genómicas por milímetro). Las concentraciones de partículas genómicas pueden basarse en PCR Taqman<sup>®</sup> del vector de ADN como se presenta anteriormente (Clark et al. (1999) Hum. Gene Ther. 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) Mol. Ther. 6:272-278). Brevemente, el vector AAV se trata con una disolución de ADNasa para eliminar cualquier ADN contaminante que pueda interferir con una medida exacta del ADN vírico. El vector AAV se trata entonces con tampón de digestión de cápside (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 1,0 mM, SDS al 0,5%, 1,0 mg/ml de proteinasa K) a 50°C durante 1 hora para liberar el ADN del vector. Las muestras de ADN se hacen pasar por una reacción de cadena de polimerasa (PCR) con cebadores que hibridan con secuencias específicas en el ADN del vector, tal como la región promotora, transgén o la secuencia poli A. Los resultados de PCR se cuantifican después mediante un software Taqman<sup>®</sup> a tiempo real, tal como el proporcionado por el Sistema detector de secuencia Prism 7700 de Perkin Elmer-Applied Biosystems (Foster City, CA).

Los vectores que portan un gen marcador detectable tal como la  $\beta$ -galactosidasa o gen de proteína fluorescente verde (GFP) pueden titularse usando un ensayo de patogenicidad. Las células susceptibles (p.ej., HeLa, o células COS) se transducen con el AAV y se realiza un ensayo para determinar la expresión génica tal como tinción de las células transducidas con vector con  $\beta$ -galactosidasa con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranosido) o microscopía de fluorescencia para células transducidas con GFP. Por ejemplo, el ensayo se realiza como sigue:  $4 \times 10^4$  células HeLa se ponen en platos en cada pocillo de un plato de cultivo de 24 pocillos usando medios de crecimiento normales. Después de la unión, es decir, aproximadamente 24 horas después, las células se infectan con Ad 5 a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 y se transducen con diluciones en serie del vector empaquetado y se incuban a 37°C. De uno a tres días después, antes de que se observen efectos citopáticos extensos, el ensayo apropiado se realiza en las células (p.ej., tinción con X-gal o microscopía de fluorescencia). Si se usa un gen indicador tal como  $\beta$ -galactosidasa, las células se fijan en paraformaldehído al 2%, glutaraldehído al 0,5% y se tiñen para la actividad de  $\beta$ -galactosidasa usando X-gal. Se cuentan las diluciones del vector que dan células bien separadas. Cada célula positiva representa 1 unidad de transducción (ut) del vector.

El ADNc de EMA humana de longitud completa se clonó en un plásmido que contenía ITRs de AAV serotipo 2 y 8. Jin et al. (2002) J Clin Invest. 109:1183-1191. AAV8-hEMA contenía repeticiones terminales invertidas (ITRS) de serotipo 2 y el ADNc de esfingomielinasa ácida humana (hEMA) bajo el control del promotor restringido al hígado DC-190 [Ziegler et al. (2004). Mol. Ther. 9:231-240]. AAV2-hEMA contenía repeticiones terminales invertidas (ITRS) de serotipo 2 y el ADNc de esfingomielinasa ácida humana (hEMA) bajo el control del potenciador de CMV y el promotor de  $\beta$ -actina de pollo. Ambos vectores recombinantes se produjeron por co-transfección de plásmido triple de células 293 humanas y se purificaron en columna. Los títulos finales de los preparados AAV8-hEMA y AAV2-hEMA fueron  $5,0 \times 10^{12}$  copias genómicas (cg) por ml, como se determinó por PCR TaqMan de la secuencia de señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina que contiene cada vector.

Los vectores híbridos pueden producirse por transfección triple usando una serie de plásmidos ayudantes que contienen dominios que codifican la cápside específica del serotipo además de los genes de replicación del serotipo de AAV. Esta estrategia permite el empaquetado de vectores ITR AAV en cada virión específico del serotipo. Rabinowitz, et al. (2002) J Virol. 76:791-801. Con esta estrategia el genoma recombinante hEMA puede usarse para generar una serie de vectores rAAV-hEMA pseudotipados. Los vectores AAV recombinantes pueden purificarse por cromatografía de intercambio iónico. O'Riordan, et al. (2000) J Gene Med 2:444-54. Los vectores AAV recombinantes pueden purificarse además por centrifugado con CsCl Rabinowitz et al. (2002) J. Urol. 76:791-801. El título final de partículas de virión AAV-EMA (partículas resistentes a la ADNasa) pueden determinarse por PCR TaqMan de la secuencia de CMV. Clark et al. (1999) Hum. Gene Therapy 10:1031-1039.

Combinación de terapia génica de cerebro y sistémica en ratones ASMKO

Los ratones deficientes en esfingomielinasa ácida (ASMKO), K. Horinouchi et al., *Nat. Genet.* 10 (1995), págs. 288-292, se trataron como sigue:

Grupo 1) los ratones se inyectaron con 3 e11 cg de un vector AAV2/8 que comprendía dos potenciadores de HPrT, un promotor de albúmina de suero humano, y un transgén de EMA humana por medio de una inyección en la vena de la cola a las 4 semanas de edad;

Grupo 2) los ratones se inyectaron con 2 e11 cg que comprendía un potenciador, promotor, y un transgén de EMA humana por medio de inyección cerebral dividida entre 8 sitios en el cerebro a las 6 semanas de edad;

Grupo 3) los ratones se inyectaron con 3 e11 cg de vector AAV2/8 que comprendía dos potenciadores de HPrT, un promotor de albúmina de suero humana, y un transgén de EMA humana por medio de una inyección en la vena de la cola a las 4 semanas de edad y dos semanas más tarde los mismos ratones fueron inyectados con 2 e11 cg de un vector AAV2 que comprendía un potenciador, promotor y un transgén de EMA humana por medio de inyección cerebral repartida entre 8 sitios en el cerebro; y

Grupo 4) los ratones no recibieron inyecciones o inyecciones simuladas solo con vehículo.

Grupo 5) los ratones no ASMKO, o de tipo salvaje, no recibieron inyecciones.

- 5 Todos los ratones ASMKO que experimentaron cirugía estereotáxica fueron inyectados en 8 regiones del cerebro con 3 µl de AAV2-hEMA (1,5 e10 cg) por sitio para un total de 24 µl (1,2 e11 cg) por cerebro. Los sitios inyectados en el hemisferio derecho fueron el hipotálamo (-0,50, -1,00 mm, -3,50 mm), hipocampo (-2,00 mm, -1,75 mm, -1,75 mm), médula (-6,00 mm, -1,50 mm, -3,75 mm) y el cerebelo (-6,00 mm, -1,50 mm, -2,25 mm); y los sitios inyectados en el hemisferio izquierdo fueron el cuerpo estriado (0,50 mm, 1,75 mm, -2,75 mm), corteza motora (0,50 mm, 1,75 mm, -1,25 mm), mesencéfalo (-4,50 mm, 1,00 mm, -3,50 mm) y el cerebelo (-6,00 mm, 1,50 mm, -2,25 mm). Las inyecciones se realizaron con una jeringa Hamilton (Hamilton EE.UU., Reno, NV) a una velocidad de 0,5 µl/min, y la aguja se dejó en el lugar durante 2 minutos después de cada inyección para minimizar el flujo ascendente de la disolución vírica al elevar la aguja.
- 10 Todos los ratones ASMKO no tratados y los ratones ASMKO en los grupos de solo AAV2 en el cerebro y AAV8 sistémico eventualmente quedaron moribundos. En contraste, los ratones ASMKO tratados por inyecciones de combinación en el cerebro y sistémicas no alcanzaron el estado de moribundos, aunque se sacrificaron sin embargo a las 54 semanas para el análisis comparativo. Los animales se perfundieron ampliamente para eliminar toda la sangre, y se dividieron en cohortes bioquímicas e histológicas. En la cohorte bioquímica, el hígado, pulmón, bazo y músculo esquelético se cortaron en dos partes; una parte se analizó para los niveles de hEMA y la otra para el almacenamiento de esfingomielina. En el cerebro, los hemisferios izquierdo y derecho se separaron y cada hemisferio se cortó adicionalmente en cinco pedazos de 2 mm a lo largo del eje A-P. Los pedazos del hemisferio izquierdo se analizaron para proteína hEMA y anti-hEMA.
- 15 Los niveles en suero de esfingomielinasa ácida (EMA) y los niveles de anticuerpo en suero anti-EMA se midieron durante todo el estudio. Los ratones se sometieron a varias pruebas durante todo el estudio: evaluaciones de peso corporal, pruebas de rotarod con aceleración, pruebas de rotarod con oscilación y prueba del laberinto de Barnes. Los datos de la curva de supervivencia se recogieron también durante toda la duración del estudio. A la muerte de los ratones, se recogieron los tejidos y se midieron los niveles de esfingomielina en los cerebros, hígados, pulmones, bazos y tejido muscular de cada ratón. La expresión de proteína EMA humana en el cerebro y el hígado también se evaluaron cualitativamente usando inmunohistoquímica. El estudio se terminó a las 54 semanas; todos los ratones del grupo 3 (combo) estaban vivos y sanos cuando el estudio se terminó.
- 20 Los niveles en suero de esfingomielinasa ácida se cuantificaron mediante un ensayo inmunosorbente unido a enzima (ELISA) usando anticuerpos policlonales que se habían generado específicamente contra la enzima humana. La Figura 7 muestra gráficamente los niveles de proteína EMA en el suero sanguíneo con el tiempo. También se midió la EMA por medio de inmunohistoquímica en los cerebros e hígados de ratones a su muerte. Se observó tinción de EMA positiva en los cerebros de ratones de los grupos 2 y 3, con tinción cualitativamente más brillante observada en ratones del grupo 3. Se observó tinción en el cuerpo estriado, hipocampo, mesencéfalo y cerebelo. No se observó tinción de EMA en los cerebros de ratones del grupo 1 o en ratones ASMKO no tratados. Se observó tinción EMA positiva en los hígados de los ratones de los grupos 1 y 3. No se observó tinción de EMA en los hígados de ratones del grupo 2 o en ratones ASMKO no tratados.
- 25 Los niveles de esfingomielina tisular se cuantificaron como sigue. Se prepararon extractos de tejido homogeneizando 10 a 50 mg de tejido en cloroformo:metanol (1:2) e incubando a 37°C durante 1 h. Después de la eliminación de restos celulares por centrifugado, los homogeneizados se extrajeron dos veces con agua y la fase orgánica (que contenía los lípidos) se transfirió a tubos de vidrio limpios y después se secaron en nitrógeno con calentamiento a 37°C. La cantidad de esfingomielina presente en los extractos se determinó indirectamente usando el kit de ensayo de esfingomielinasa Amplex Red (Molecular Probes). Los extractos se trataron con una cantidad fija de esfingomielinasa bacteriana exógena procedente de *Bacillus cereus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en la disolución de trabajo Amplex Red. La esfingomielina se hidrolizó mediante la enzima bacteriana para dar ceramida y fosforilcolina. La última se hidrolizó adicionalmente a colina, que a su vez se oxidó a betaina y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno liberado se cuantificó haciéndolo reaccionar con Amplex Red para generar una resorufina altamente fluorescente que podría detectarse por emisión de fluorescencia a 590 nm. Los niveles normales de esfingomielina en los tejidos de ratones C57BL/6 son aproximadamente 5-10% de los observados en ratones ASMKO de la misma edad. Las Figuras 8 y 9 muestran gráficamente los niveles de esfingomielina en el cerebro y órganos viscerales.
- 30 Los niveles de anticuerpos específicos de anti-esfingomielinasa ácida humana en el suero se determinaron por ELISA. Véase la Figura 7E. Las diluciones en serie de suero se añadieron a pocillos de un plato de 96 pocillos recubiertos con la enzima o partículas AAV inactivadas por calor. Se detectaron anticuerpos unidos usando inmunoglobulina G (IgG), IgM e IgA cabra anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano (Zymed, San Francisco, CA, EE.UU.). Los platos se incubaron con sustrato (Sigma-Aldrich) durante 20 min a temperatura ambiente para el desarrollo del color. Los títulos se definieron como los recíprocos de la mayor dilución de suero que produjeron un OD450 igual a o menor que 0,1. Las Figuras 7A a 7D muestran gráficamente niveles de anticuerpos anti-hEMA en circulación para ratones tratados y no tratados.
- 35 Los anticuerpos en el parénquima cerebral se midieron con un ensayo modificado como sigue. Los lisatos tisulares se diluyeron 1:20 en tampón de dilución de anticuerpo, y se aplicaron por duplicado a un plato de 96 pocillos recubierto con 100 ng de hEMA. Las reacciones de conjugado HRP anticuerpo secundario y de sustrato cromogénico se llevaron a cabo como se describe anteriormente. La concentración de anticuerpo específico de
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

hEMA unido debería correlacionarse directamente con la intensidad de color de la reacción de HRP procedente del conjugado. Por consiguiente, el dato final se presenta como el cambio absoluto en OD450 generado por la dilución de lisato 1:20 para proporcionar una determinación más sensible de los niveles de anticuerpo en comparación con el método de titulación usado para el suero.

5 Las secciones del cerebro se analizaron para la expresión de hEMA usando un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-hEMA a una dilución de 1:200, y se visualizaron con un anticuerpo secundario conjugado con estreptavidina-Cy3 bajo fluorescencia roja [Passini, M.A. et al. (2005). *Mol. Ther.* 11:754-762]. El sustrato colesterol en el cerebro se detectó usando un protocolo de tinción de filipina como se presenta [Passini, M.A. et al. (2005). *Mol. Ther.* 11:754-762]. Brevemente, la filipina (Sigma, St. Louis, MO) se disolvió en metanol al 100% a una concentración de trabajo de 10 mg/ml. Las secciones del cerebro se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente (TA) en la oscuridad, seguido por tres lavados a TA con PBS, y se examinaron bajo fluorescencia azul. La tinción de lisenina se hizo para determinar el patrón del sustrato esfingomielina *in situ*, como se presenta [Shihabuddin, L.S. et al. (2004). *J. Neurosci.* 24:10642-10651]. Brevemente, la lisenina (Peptides International, Louisville, Kentucky) se disolvió a 10 mg/ml en PBS que contenía BSA al 0,5%, saponina al 0,02% (Sigma), y suero de burro normal al 5%. Las secciones de cerebro se incubaron con lisenina a 4°C toda la noche, seguido por incubación toda la noche de dilución 1:250 de anticuerpo anti-lisenina de conejo (Peptides International). Las células positivas en lisenina se visualizaron con dilución 1:250 de anticuerpo anti-conejo FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) y se examinaron usando fluorescencia verde.

20 Cada ratón se probó mediante rotarod con aceleración y con oscilación para la función motora en el Smartrod (AccuScan) usando métodos conocidos en la técnica y reproducidos en Sleat et al. (2004) *J. Neurosci.* 24:9117-9126. Los ratones se probaron en el rotarod con aceleración y con oscilación usando el Programa Smartrod Rotorod (AccuScan Instruments, Columbus, OH) para acceder a la función motora. La velocidad de la rotación del cilindro en el rotarod con aceleración se programó para acelerar a una velocidad constante de 0-30 rpm durante 60 segundos, y el rotarod con oscilación se programó para acelerar hacia adelante y hacia atrás cada 2,5 segundos a una velocidad final de 25 rpm durante 54 segundos. Se realizaron cuatro pruebas en cada animal a cada punto temporal, y se grabó la latencia para caer de la plataforma. La puntuación de latencia alta equivale a buen rendimiento. Las pruebas individuales se separaron en al menos 15 min para dejar al animal un tiempo de descanso. Las Figuras 3 y 4 muestran gráficamente los resultados de las pruebas rotarod como una medida de recuperación de la función motora.

30 Cada ratón se probó usando una prueba del laberinto de Barnes. Los ratones se entrenaron para encontrar un túnel oscuro escondido debajo de uno de los 20 agujeros situados alrededor del perímetro de un disco de plástico grande, plano, que estaba iluminado de forma brillante por cuatro lámparas halógenas elevadas. El tiempo para moverse a través del laberinto para encontrar el agujero oscuro correcto correlaciona inversamente con la función cognitiva – un tiempo de navegación más corto es indicativo de mejor función cognitiva. La Figura 5 muestra gráficamente los resultados de la prueba del laberinto de Barnes como una medida de recuperación de la función cognitiva.

35 Las curvas de supervivencia se muestran gráficamente en la Figura 6.

Un protocolo de inyección de combinación de AAVhEMA que se dirige tanto al cerebro como a las vísceras se evaluó al abordar las anomalías funcionales y secuelas de la enfermedad del ratón ASMKO. En el grupo de combinación (n = 11), los ratones ASMKO a las 4 semanas de edad recibieron  $3,0 \times 10^{11}$  copias genómicas (cg) de AAV8-hEMA por medio de inyección en la vena de la cola. Dos semanas más tarde, a las 6 semanas de edad, los mismos ratones se inyectaron con AAV2-hEMA en la corteza motora, cuerpo estriado, mesencéfalo, y cerebelo del hemisferio izquierdo, y en el hipotálamo, hipocampo, médula y cerebelo del hemisferio derecho. Cada estructura se inyectó con  $1,5 \times 10^{10}$  cg para un total de  $1,2 \times 10^{11}$  cg por cerebro. Los grupos de control tratados recibieron solo inyecciones sistémicas de AAV8-hEMA a las 4 semanas de edad (n = 12) o solo inyecciones en el cerebro de AAV2-hEMA a las 6 semanas de edad (n = 14), y los grupos de control no tratados incluyeron ratones ASMKO (n = 23) y de tipo salvaje (n = 10).

Se realizaron sangrados oculares periódicos para medir los niveles de hEMA y anticuerpos anti-hEMA en circulación. Los análisis del suero de ratones ASMKO tratados solo por inyección sistémica o por inyecciones de combinación mostraron los mayores niveles de hEMA circulante. La transducción y posterior expresión por AAV8-hEMA estuvo mediada por el hígado principalmente por el tropismo de este serotipo vírico y la selección de un promotor restringido al hígado (DC190) en el diseño del cartucho de expresión. Ambos grupos consiguieron niveles pico de hEMA a las 2 semanas después de la inyección, que disminuyeron posteriormente hasta 10 veces durante el periodo del estudio. El suero de los grupos ASMKO no tratado y de solo AAV2 en el cerebro no mostraron niveles detectables de hEMA. El análisis adicional del suero sanguíneo mostró que los niveles de anticuerpo anti-hEMA en los ratones tratados por inyecciones de combinación o solo AAV8 sistémicas fueron similares al bajo nivel de referencia observado en los ratones ASMKO no tratados. En contraste, los ratones del grupo de solo AAV2 en el cerebro mostraron una inducción rápida y robusta (aumento de 200 veces) de títulos de anticuerpo anti-hEMA. Por tanto, los ratones tratados por inyección sistémica de AAV8-hEMA parece que tienen inducida la inmunotolerancia al hEMA expresado.

Fueron evidentes los altos niveles de la enzima en el hígado, pulmón, bazo y músculo de los ratones tratados mediante inyecciones de combinación o solo AAV8 sistémico, presumiblemente después de la endocitosis mediada por el receptor de manosa-6-fosfato de la enzima en circulación. Los niveles de hEMA humana en los órganos viscerales del grupo solo con AAV2 en el cerebro no se elevaron significativamente por encima de los observados en los ratones de control ASMKO no tratados. El análisis del cerebro de los grupos de combinación y de solo AAV2 en el cerebro mostraron altos niveles de hEMA en todo el tubo neural. Sin embargo, el grupo de combinación mostró niveles significativamente mayores de hEMA en comparación con el tratamiento solo en el cerebro a pesar del uso del mismo vector AAV2 recombinante en ambas cohortes. Los niveles de hEMA en cerebros de ratones tratados solamente por inyección sistémica fueron bajos y comparables con los ratones ASMKO no tratados. Esto indica que la hEMA derivada del hígado en la circulación no fue capaz de atravesar la barrera hematoencefálica al SNC. De forma interesante, el título de anticuerpo anti-hEMA en homogeneizados de cerebro fue aproximadamente 10 veces mayor en el grupo solo de AAV2 en el cerebro en comparación con los demás grupos, incluyendo el grupo de combinación. Por consiguiente, los niveles de expresión en el cerebro fue un recíproco de los títulos de anticuerpo; el grupo de combinación mostró altos niveles de hEMA y bajos niveles de anticuerpos anti-hEMA, mientras que el grupo solo de AAV2 en el cerebro mostró bajos niveles de hEMA y altos niveles de anticuerpos anti-hEMA.

Se determinó el efecto de la expresión de hEMA en la corrección de la patología de almacenamiento en la víscera y el cerebro de ratones ASMKO. Hubo una completa corrección del almacenamiento de esfingomielina en todos los tejidos viscerales examinados de los grupos solo de AAV8 sistémico y de combinación. En contraste, los animales que recibieron solo inyecciones en el cerebro contenían altos niveles de esfingomielina en las vísceras que fueron similares a los ratones ASMKO no tratados. El análisis de los niveles de esfingomielina en el cerebro de ratones ASMKO tratados por inyecciones de combinación mostró una reducción global del sustrato a los niveles de los de tipo salvaje. Esto fue una mejora por encima del grupo solo de AAV2 en el cerebro, que mostró una disminución significativa de esfingomielina solo en los pedazos de cerebro correspondientes a un sitio de inyección. Por consiguiente, la extensión de la corrección en el grupo solo en el cerebro fue significativamente menor y nunca se aproximó a la eficacia observada en el grupo de combinación. Esta reducción menos eficiente de almacenamiento de esfingomielina en el grupo de solo AAV2 en el cerebro correlacionó con los niveles menores de enzima observados en este grupo. Un alto nivel de esfingomielina en el cerebro se observó en el grupo de solo AAV8 sistémico que fue similar a ASMKO no tratados.

Las secciones de cerebro se analizaron también histológicamente para la expresión de hEMA, y para almacenamiento de esfingomielina y colesterol *in situ*. El patrón de la expresión de hEMA y aclaramiento del almacenamiento de esfingomielina se solaparon en el grupo de solo AAV2 en el cerebro. En contraste, la corrección de almacenamiento de esfingomielina se extendió mucho más allá de los sitios de inyección en animales que recibieron terapia de combinación. Esto produjo un patrón tanto de solapamiento como no solapamiento de la inversión de la patología en comparación con las áreas de transducción con la terapia de combinación. Esta relación también se observó con el marcador de colesterol, filipina. Grandes regiones del cerebro se limpiaron de almacenamiento de colesterol en el grupo de combinación, mientras que solo se observó limpieza de colesterol local y más limitada en el grupo de solo AAV2 en el cerebro. Por tanto, la capacidad de hEMA de difundirse desde los sitios de inyección para corregir la patología de almacenamiento en regiones distales del cerebro fue significativamente mejor en ratones tratados por inyecciones de combinación en comparación con los ratones que recibieron solo inyección en el cerebro. Como puede esperarse a partir de los datos bioquímicos, el grupo de solo AAV8 sistémico no mostró ninguna corrección medible de almacenamiento de esfingomielina o colesterol en el cerebro.

Empezando a las 10 semanas de edad, los ratones se probaron bisemanalmente para la función motora en los rotarods con aceleración y con oscilación. Los animales en el grupo de combinación mostraron mejoras significativas de rendimiento motor en ambas pruebas de rotarod en todos los puntos temporales examinados ( $p < 0,001$ ). Los ratones tratados solo mediante inyecciones de AAV2 en el cerebro mostraron una modesta mejora en el rendimiento motor en el rotarod con aceleración a puntos temporales tempranos cuando se compara con los ratones ASMKO no tratados. Sin embargo, su rendimiento se deterioró en puntos temporales tardíos demostrando que las inyecciones solo en el cerebro no fueron suficientes para sostener la corrección en la función motora. Con el rotarod de oscilación, que es una prueba más dura de la función motora y la coordinación, el grupo de solo AAV2 en el cerebro rindió pobremente a lo largo del estudio entero. El grupo de solo AAV8 sistémico mostró de poco a ningún beneficio en cualquiera de las pruebas de rotarod.

Empezando a las 17 semanas de edad, los ratones se probaron también para la función cognitiva cada 4 semanas en el laberinto de Barnes. Los ratones utilizaron pistas de navegación espacial mediadas por la memoria para escapar de un laberinto bajo el estímulo luminoso adverso. El grupo de solo AAV2 en el cerebro rindió mejor que los ASMKO no tratado, pero nunca se aproximó al nivel de rendimiento observado en los ratones de tipo salvaje. Los ratones tratados por inyecciones sistémicas solo mostraron una mejora marginal cuando se comparan con controles no tratados. En contraste, el grupo de combinación rindió en el laberinto de Barnes con una capacidad que fue similar a los ratones de tipo salvaje ( $p > 0,05$ ). Tomados junto con los datos de rotarod, la corrección de la patología tanto en el cerebro como en las vísceras fueron necesarios para el mejor resultado funcional.

Los ratones se pesaron cada dos semanas para evaluar su estado físico total, y su supervivencia se analizó mediante un gráfico de Kaplan-Meier. El grupo de combinación tenía un perfil de ganancia de peso que fue similar a

5 los animales de tipo salvaje, que fue significativamente mejor que los grupos de solo AAV2 en el cerebro y AAV8 sistémico ( $p < 0,001$ ). Los animales moribundos, caracterizados por ataxia considerable, incapacidad para andar en una línea recta sin caerse, incapacidad para lamerse, pérdida del 20% de peso corporal y deshidratación, se sacrificaron para propósitos humanos. Los grupos de combinación, solo de AAV2 en el cerebro y AAV8 sistémico presentaron una supervivencia aumentada en comparación con los ratones ASMKO no tratados, que tenían una vida útil media de 34 semanas. Sin embargo, todos los ratones ASMKO tratados por terapia de combinación sobrevivieron a las 54 semanas de edad y no mostraron señales de ataxia. Esto fue una mejora significativa sobre los grupos de solo AAV2 en el cerebro y AAV8 sistémico, en que todos los animales eventualmente quedaron moribundos con vidas útiles medias de 48 y 47 semanas ( $p < 0,0001$ ). Ninguno de los animales en los grupos inyectados de una única forma sobrevivió a las 54 semanas. Por consiguiente, aunque tratar solo el cerebro o las vísceras proporcionó un significativo beneficio de supervivencia, esto fue menos efectivo que tratar ambos compartimientos corporales con terapia de combinación.

15 La memoria se entiende más completamente a la luz de las enseñanzas de las referencias citadas en la memoria. Las realizaciones en la memoria proporcionan una ilustración de realizaciones de la invención y no se construirían para limitar el alcance de la invención. El experto reconoce fácilmente que muchas otras realizaciones están incluidas por la invención.

En el punto en que el material referenciado contradiga o sea inconsistente con la presente memoria, la presente memoria reemplazará a cualquiera de dicho material. La cita de cualquier referencia en la presente memoria no es una admisión de que dichas referencias sean la técnica anterior de la presente invención.

20 A menos que se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, cultivo celular, condiciones de tratamiento, y demás usados en la memoria, incluyendo las reivindicaciones, se va a entender que están modificados en todos los ejemplos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden dependiendo mucho de las propiedades deseadas buscadas obtenerse mediante la presente invención. A menos que se indique otra cosa, el término "al menos" que precede a una serie de elementos se va a entender que se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de verificar usando no más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritos en la presente memoria. Se pretende que dichos equivalentes estén incluidos por las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un inmunógeno; y un segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica el inmunógeno para usar en el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico con implicación del SNC, en el que dicho tratamiento comprende las etapas de:
- 5 a) administrar dicho primer vector vírico al tejido hepático de un mamífero de manera que se induce la tolerancia en el cerebro del mamífero al inmunógeno; y
- b) posteriormente administrar dicho segundo vector vírico al cerebro de dicho mamífero en el que dicha administración posterior del segundo vector vírico se da después de que dicho primer vector vírico que comprende un transgén que codifica el inmunógeno se haya expresado en el hígado del mamífero durante una cantidad de tiempo efectiva para generar la inducción de tolerancia, y en el que el inmunógeno es la enzima defectuosa asociada con la enfermedad de almacenamiento lisosómico a tratar.
- 10 2. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un inmunógeno y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica el inmunógeno para usar en el método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que dicho segundo vector se administra después de detectarse la expresión del transgén en dicho mamífero.
- 15 3. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un inmunógeno y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica el inmunógeno para usar en el método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que el inmunógeno es un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida.
4. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un inmunógeno y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica el inmunógeno para usar en el método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que el mamífero es un humano.
- 20 5. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un inmunógeno y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica el inmunógeno para usar en el método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que la administración al cerebro del mamífero es un sitio seleccionado del grupo que consiste en el bulbo raquídeo, el cerebro medio, el hipocampo, el cuerpo estriado, la médula, la protuberancia anular, el mesencéfalo, el cerebelo, el tálamo, el hipotálamo, la corteza cerebral, el lóbulo occipital, el lóbulo temporal, el lóbulo parietal y el lóbulo frontal.
- 25 6. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un inmunógeno y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica el inmunógeno para usar en el método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que la administración al cerebro del mamífero es en los núcleos cerebelosos profundos del cerebelo.
- 30 7. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un inmunógeno y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica el inmunógeno para usar en el método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que el vector vírico es un virus adeno-asociado (AAV).
8. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un inmunógeno y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica el inmunógeno para usar en el método de tratamiento según la reivindicación 7, en el que el vector AAV se selecciona del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 y AAV8.
- 35 9. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un inmunógeno y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica el inmunógeno para usar en el método de tratamiento según la reivindicación 8, en el que el AAV es un vector AAV recombinante.
- 40 10. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un inmunógeno y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica el inmunógeno para usar en el método de tratamiento según la reivindicación 9, en el que el vector AAV recombinante se selecciona del grupo que consiste en vectores de serotipo AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 y AAV2/8.
- 45 11. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un inmunógeno y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica el inmunógeno para usar en el método de tratamiento según la reivindicación 9, en el que el primer vector AAV recombinante comprende potenciadores específicos del hígado y elementos promotores.
12. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un inmunógeno y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica el inmunógeno para usar en el método de tratamiento según la reivindicación 1, en el que la etapa b) se repite.
- 50 13. Un primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida; y

un segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida para usar en el tratamiento de la enfermedad de Niemann-Pick tipo A en un mamífero que comprende las etapas de:

- a) administrar dicho primer vector vírico al tejido hepático de dicho mamífero; y
- 5 b) posteriormente administrar dicho segundo vector vírico al cerebro de dicho mamífero, en el que dicha administración posterior del segundo vector vírico se da después de que dicho primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida se haya expresado en el hígado del mamífero durante una cantidad efectiva de tiempo para generar la inducción de tolerancia.
- 10 14. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida para usar en el método según la reivindicación 13, en el que la etapa b) se repite.
- 15 15. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida para usar en el método según la reivindicación 13, en el que dicho segundo vector se administra después de que se detecte la expresión del transgén en dicho mamífero.
16. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida para usar en el método según la reivindicación 13, en el que el mamífero es un humano.
- 20 17. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida para usar en el método según la reivindicación 13, donde la administración al cerebro del mamífero es un sitio seleccionado del grupo que consiste en el bulbo raquídeo, el cerebro medio, el hipocampo, el cuerpo estriado, la médula, la protuberancia anular, el mesencéfalo, el cerebelo, el tálamo, el hipotálamo, la corteza cerebral, el lóbulo occipital, el lóbulo temporal, el lóbulo parietal y el lóbulo frontal.
- 25 18. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida para usar en el método según la reivindicación 13, en el que la administración al cerebro del mamífero es en los núcleos cerebelosos profundos del cerebelo.
- 30 19. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida para usar en el método según la reivindicación 13, en el que el vector vírico es un virus adeno-asociado (AAV).
- 35 20. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida para usar en el método según la reivindicación 19, en el que el vector AAV se selecciona del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 y AAV8.
- 40 21. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida para usar en el método según la reivindicación 19, en el que el AAV es un vector AAV recombinante.
22. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida para usar en el método según la reivindicación 21, en el que el vector AAV recombinante se selecciona del grupo que consiste en vectores de serotipo AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 y AAV2/8.
- 45 23. El primer vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida y el segundo vector vírico que comprende un transgén que codifica un polipéptido o proteína de esfingomielinasa ácida para usar en el método según la reivindicación 21, en el que el primer vector AAV recombinante comprende potenciadores específicos del hígado y elementos promotores.



**Figura 1**

- **Cerebro inyectado con AAV2-hEMA para tratar patología cerebral**
- **3  $\mu$ l por sitio x 8 sitios (2,0 e11 copias genómicas por cerebro)**

Two schematic diagrams of a mouse brain, viewed from the side, illustrating the locations of eight injection sites. Each diagram shows four injection sites, with two on the left and two on the right side of the brain. The injection sites are marked with solid black circles, and thin lines indicate the path of the injection needles.



Figura 2.

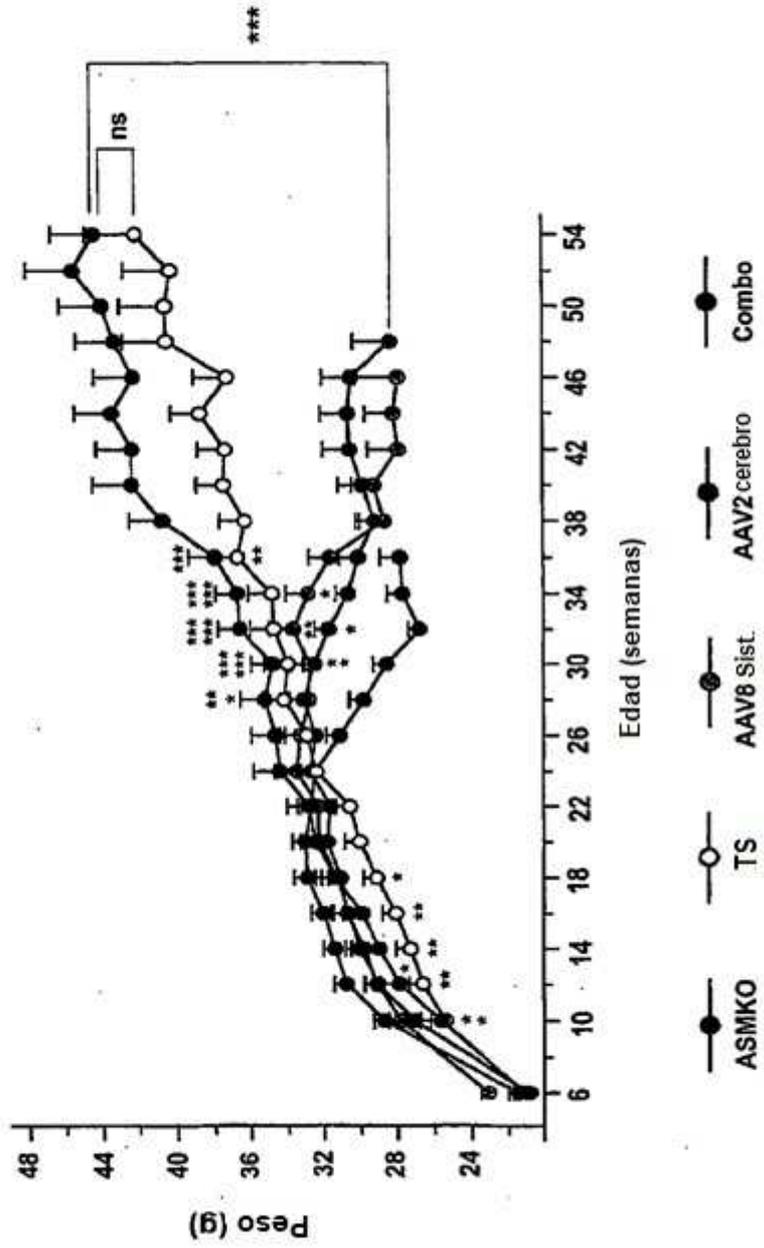


Figura 3

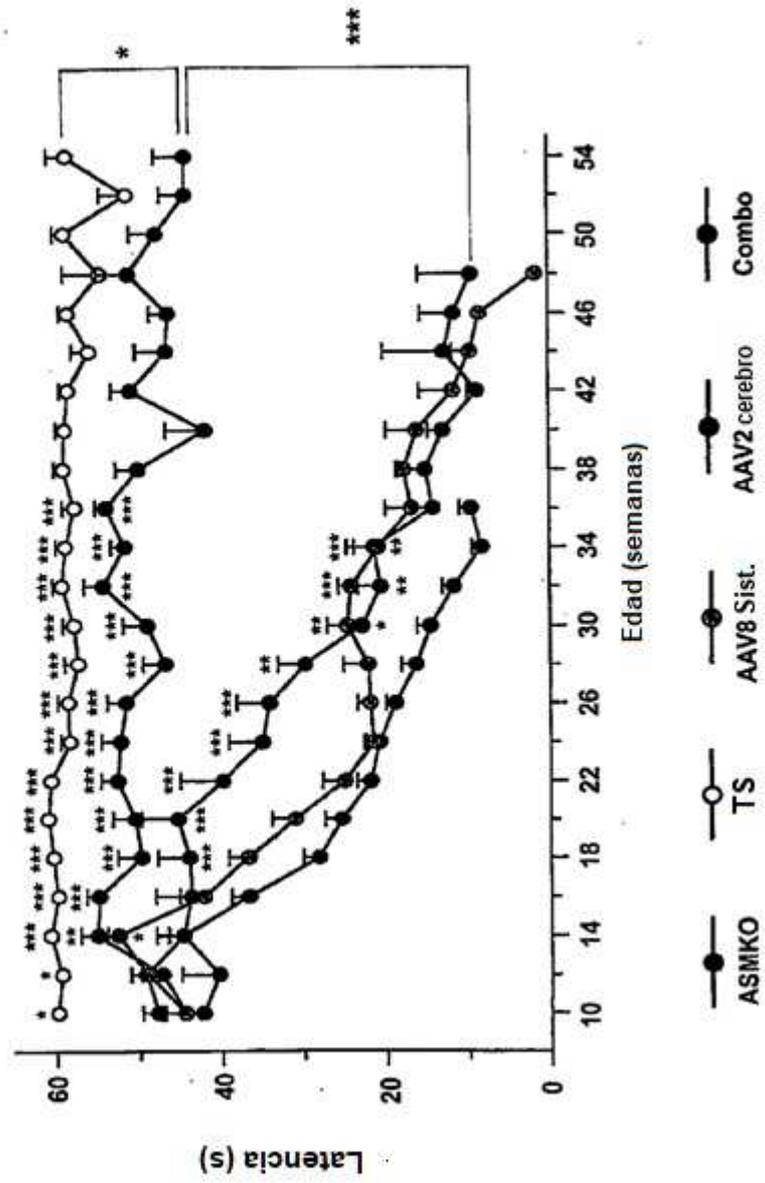




Figura 4

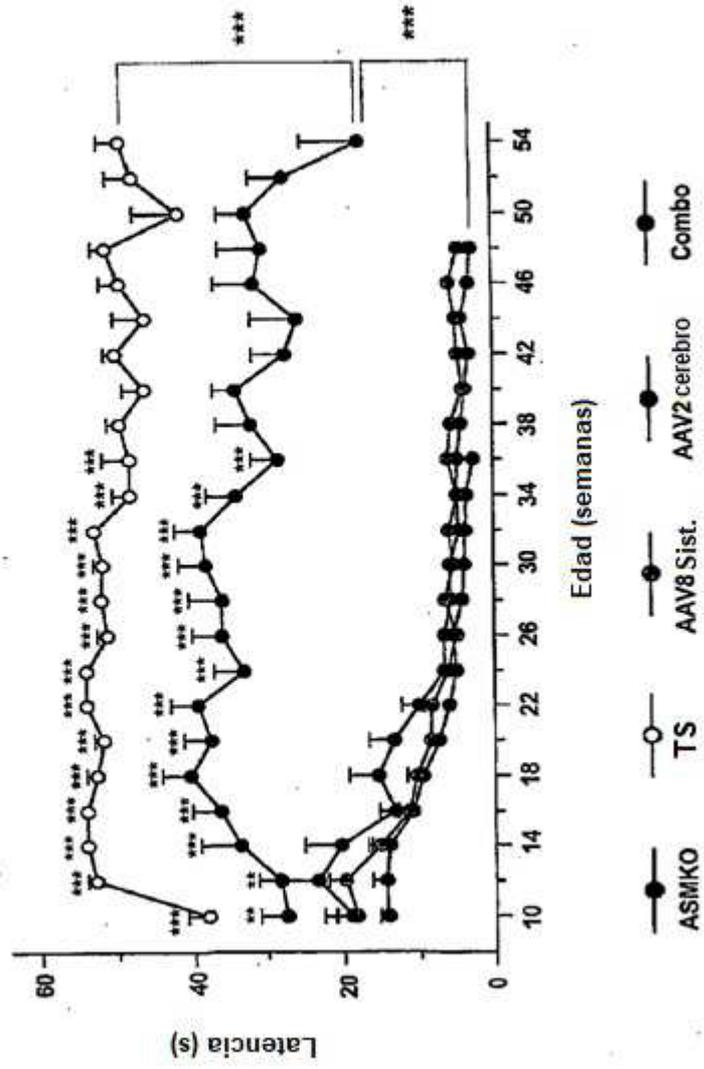


Figura 5

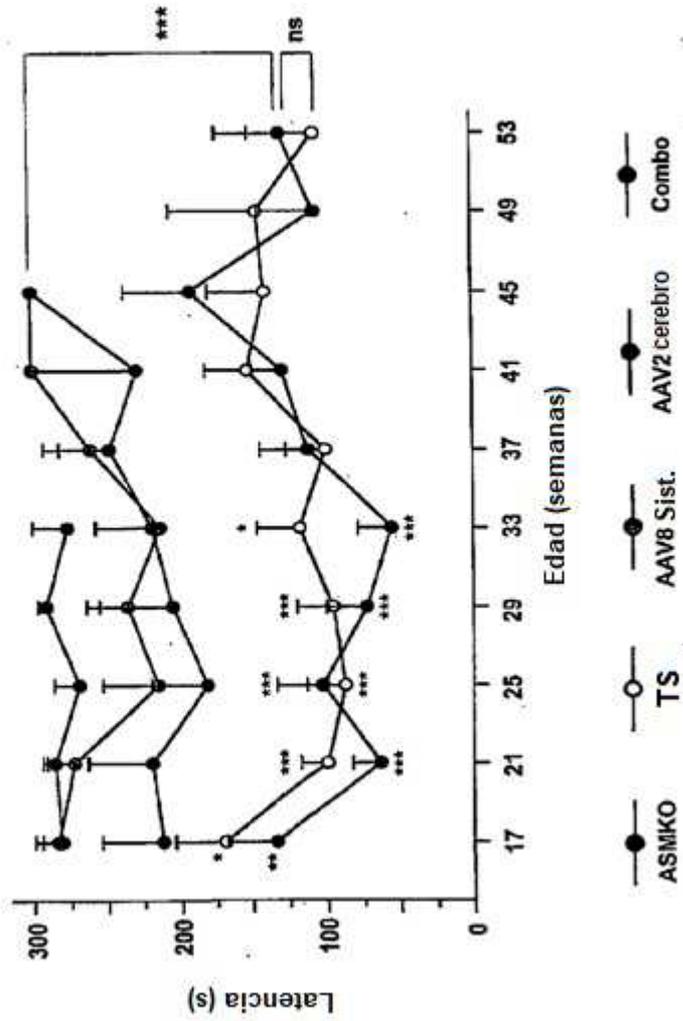
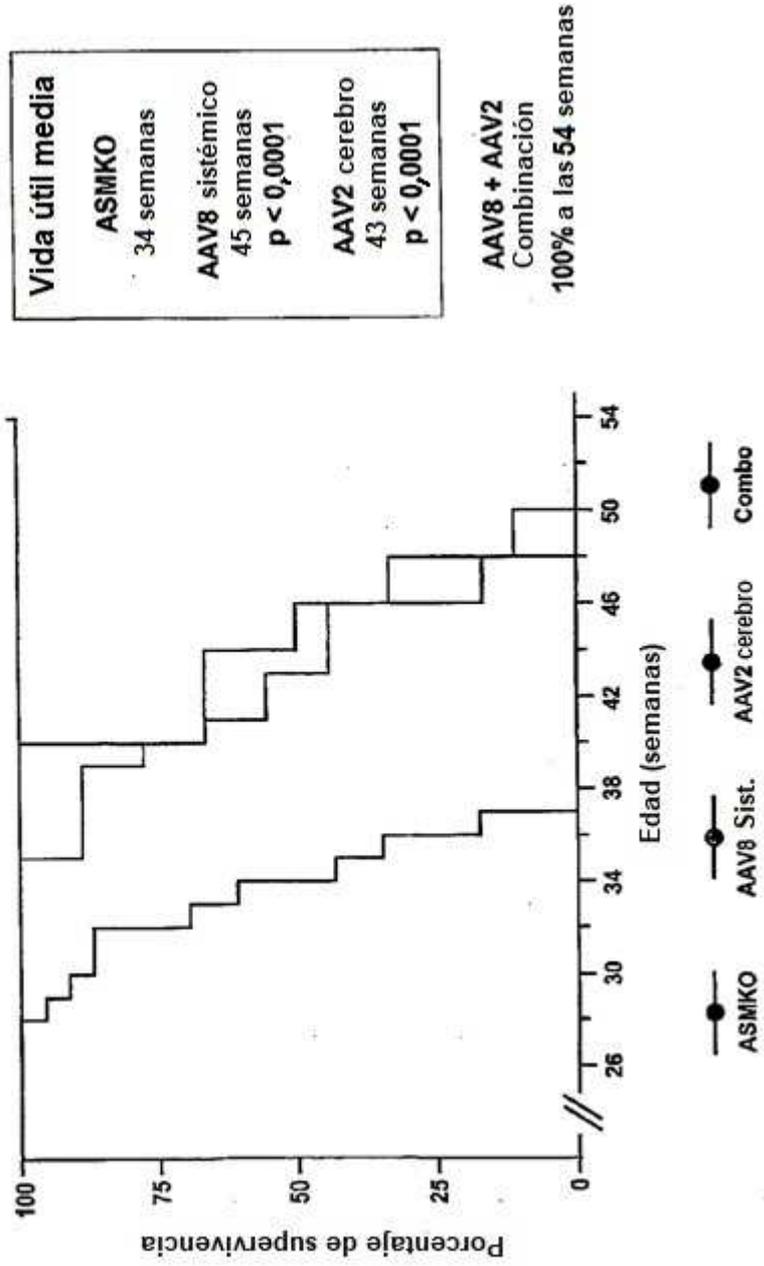
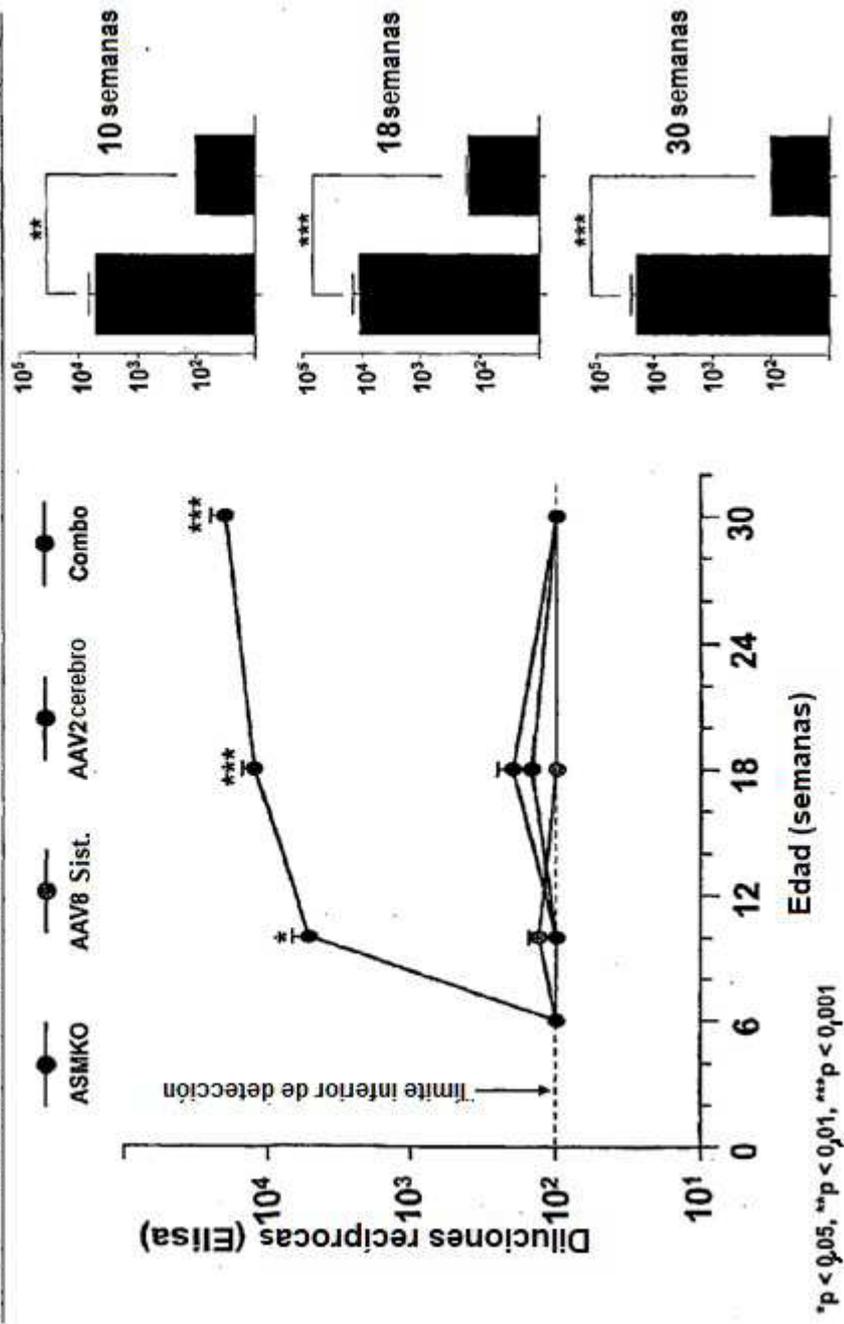


Figura 6



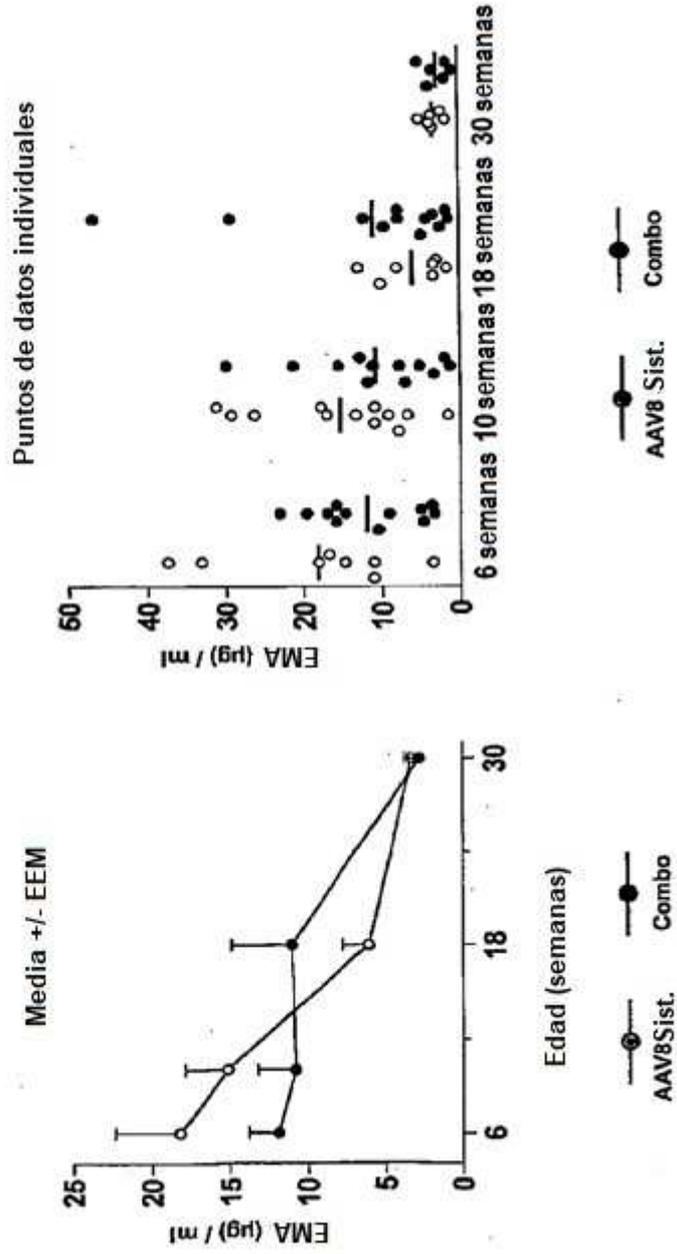
**Figuras 7A a 7D**



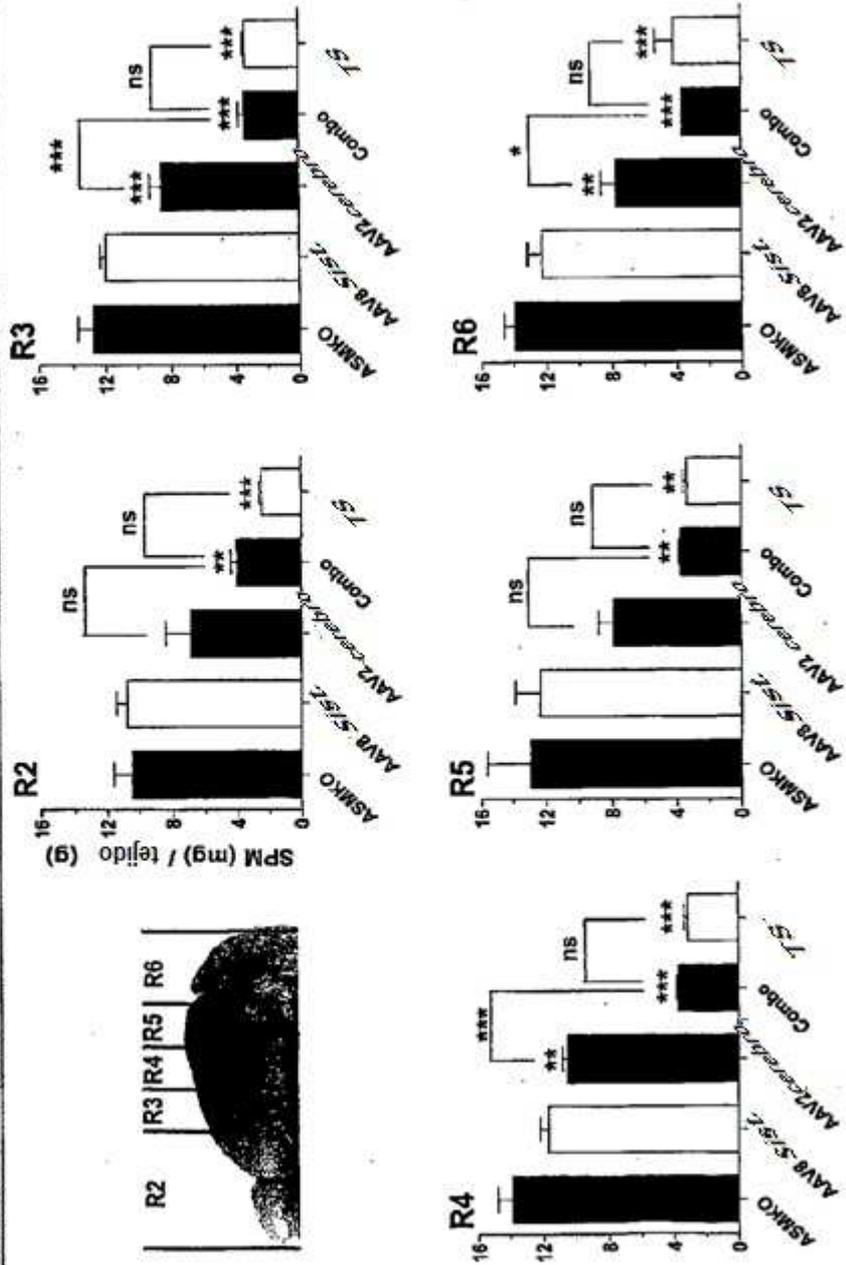
\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001



Figura 7E



Ensayo Elisa en sangrados en el ojo



Figuras 9A a 9D

