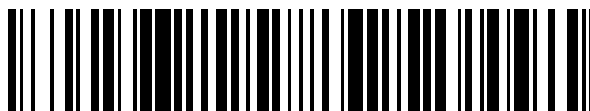


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 034**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/864** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2008** **E 12180951 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019** **EP 2527457**

54 Título: **Administración extendida de genes a neuronas motoras mediante inyección periférica de vectores AAV**

30 Prioridad:

**05.10.2007 EP 07301435**

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

**11.10.2019**

73 Titular/es:

**GENETHON (50.0%)  
1 bis, rue de l'Internationale  
91000 Evry, FR y  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BARKATS, MARTINE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 727 034 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

Administración extendida de genes a neuronas motoras mediante inyección periférica de vectores AAV

5 La presente descripción se refiere a composiciones y métodos para administrar genes a células del sistema nervioso central en mamíferos. La descripción también se refiere a métodos para tratar trastornos de neuronas motoras en mamíferos a través de la expresión de genes terapéuticos. La invención parte del inesperado descubrimiento de que una inyección periférica de vectores AAV conduce a una circunvalación de la barrera hematoencefálica y a una infección masiva de neuronas motoras, así como de otras células del sistema nervioso central. La invención también se puede usar en cualquier mamífero, incluyendo sujetos humanos.

### Introducción

10 Las enfermedades de las neuronas motoras (NM), tal como la atrofia muscular espinal (AME), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o la enfermedad de Kennedy, son trastornos neurodegenerativos que se caracterizan por la degeneración selectiva de NMs en la espina dorsal, el bulbo raquídeo y/o el córtex motor (Monani 2005; Pasinelli y Brown 2006); (MacLean, Warne et al. 1996). No existe tratamiento para estas enfermedades, principalmente debido a que la administración de fármacos a NM a través de inyecciones sistémicas está dificultada por la presencia de la barrera hematoencefálica (BBB, del inglés "blood-brain-barrier"). Esta barrera anatómica y fisiológica está formada por uniones tensadas entre las células endoteliales de los capilares del sistema nervioso central (SNC) y evita el paso fácil de moléculas entre la circulación y el SNC (Scherrmann 2002). La administración alternativa a NMs de proteínas recombinantes inyectadas directamente en el parénquima del SNC también es difícil debido a la invasividad del procedimiento quirúrgico, lo que dificulta una potencial aplicación clínica.

20 El fracaso de la farmacología clásica ha llevado a la comunidad científica a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas basadas, en particular, en tecnología de transferencia de genes usando vectores virales. Sin embargo, los vectores virales convencionales generalmente no atraviesan la BBB, y las primeras estrategias de transferencia génica propuestas incluían la administración intratecal o inyecciones directas de los vectores en el parénquima de la espina dorsal (Davidson, PNAS 2000) (Azzouz, Hottinger et al. 2000). Sin embargo, estas estrategias invasivas no consiguieron producir una transducción extendida en el SNC eficiente. También se usó la inyección de los vectores virales en los ventrículos cerebrales con el objetivo de transducir las células epiteliales del plexo coroideo y el epéndimo, que median en la secreción de las proteínas terapéuticas en el fluido cerebroespinal (CSF del inglés "cerebrospinal fluid") y posterior difusión a través del parénquima del SNC (Passini y Wolfe 2001). Sin embargo, la difusión de las proteínas recombinantes a todo el tejido nervioso dista de ser óptima y, nuevamente, los riesgos potenciales relativos al procedimiento quirúrgico son un obstáculo para la aplicación clínica de este método. Posteriormente se desarrolló una estrategia alternativa no invasiva usando transporte axonal retrógrado de vectores virales a NM mediante inyecciones intramusculares (i.m.). De hecho, vectores génicos tales como adenovirus, vector adeno-asociado (AAV) o virus de equinemia pseudotipados con la glicoproteína G de la rabia (EIAV) fueron transportados a lo largo de los axones de las NM tras inyecciones i.m., y se usaron con éxito para transducir NM inferiores en animales experimentales (Finiels et al., 1995; Kaspar et al., 2003; Azzouz et al., 2004). Sin embargo, el valor clínico de este método sigue siendo cuestionable debido, concretamente, al gran número tanto de sitios de inyección como de partículas víricas que serían necesarios para dirigirse a NM en patologías que afecten a la mayor parte de las unidades motoras del paciente.

40 Con el fin de contrarrestar estas dificultades, nosotros evaluamos la eficacia de la transducción para NM de nuevos serotipos y genomas de AAV tras administración intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.) e intraperitoneal (i.p.) en ratones. En particular, comparamos la eficacia de vectores AAV recombinantes de cadena sencilla y auto-complementarios (ssAAV y scAAV, respectivamente) de serotipo 1 y 9 para la mediación de la transducción de SNC en ratones.

45 Nuestros principales resultados demuestran que los vectores AAV recombinantes (p. ej., scAAV9) son particularmente efectivos para transducir NMs de espina dorsal tras administración i.v. en ratones. Además, mostramos la viabilidad de este método en un modelo animal de mayor tamaño, un modelo de gato doméstico de AME recesiva autosomal similar a la AME humana de tipo III, asociada a carencias del gen LIX1 (Fyfe et al., 2006). Nuestro método también permite transducir otras células del SNC, que incluyen células gliales, neuronas del hipocampo y del núcleo habenuar, y astocitos. Esta invención, por tanto, demuestra por vez primera que es posible transferir genes de interés a NMs tras una inyección i.v. individual en ratones, logrando una amplia administración génica a la espina dorsal y/u otras células nerviosas, por tanto, ofreciendo nuevas vías para el tratamiento de enfermedades de NMs.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a la materia definida en las reivindicaciones.

55 Además, la presente descripción se refiere a nuevas composiciones y métodos para la administración de productos terapéuticos al SNC usando vectores AAV recombinantes. Más específicamente, la descripción se refiere a

composiciones y métodos para administrar genes a neuronas motoras o células gliales de sujetos mamíferos a través de administración periférica de vectores AAV.

5 Un objetivo de esta descripción, más específicamente, se refiere al uso de un vector AAV que comprende un gen de interés (p.ej., que codifica un producto terapéutico o diagnóstico) para la fabricación de un medicamento para la administración del gen a células del sistema nervioso central, particularmente a células motoras o células gliales, mediante administración periférica de dicho vector AAV a dicho sujeto.

Otro objetivo de esta descripción se refiere al uso de un vector AAV que comprende un gen de interés (p.ej., que codifica un producto terapéutico o diagnóstico) para la fabricación de un medicamento para administrar el gen a neuronas motoras de la espina dorsal mediante administración periférica de dicho vector AAV a dicho sujeto.

10 Un objetivo adicional de esta descripción reside en un método para administrar un gen a células del sistema nervioso central, particularmente neuronas motoras o células gliales, en un mamífero, método que comprende la administración al mamífero por ruta periférica de un vector AAV que comprende dicho gen, permitiendo dicha administración la infección de células del sistema nervioso central, particularmente neuronas motoras o células gliales, mediante dichos vectores AAV y con ello la administración de dicho gen a las células del sistema nervioso central, particularmente neuronas motoras o células gliales.

15 Un objetivo de esta descripción se refiere también al uso de un vector AAV que comprende un gen terapéutico para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno de neuronas motoras en un sujeto, donde dicho vector AAV se administra mediante inyección periférica a dicho sujeto, provocando dicha administración la infección de neuronas motoras (de espina dorsal) y la expresión del gen en neuronas motoras (de espina dorsal).

20 Otro objetivo de esta descripción se refiere al uso de un vector AAV para la fabricación de un medicamento para producir una proteína terapéutica o ARN en neuronas motoras (de espina dorsal) de un sujeto mediante inyección periférica de dicho vector.

La descripción se refiere también al uso de un vector AAV para administrar un gen a células del sistema nervioso central, particularmente neuronas motoras o células gliales, atravesando la barrera hematoencefálica.

25 La descripción también se refiere a un método de terapia génica a través de la barrera hematoencefálica en un sujeto mamífero, método que comprende la administración periférica de un vector AAV al sujeto.

Un objetivo adicional de esta descripción es un método para modificar genéticamente células del sistema nervioso central, particularmente neuronas motoras en un sujeto mamífero, método que comprende administrar periféricamente vectores AAV al sujeto.

30 La descripción también se refiere al uso de un vector AAV para la fabricación de un medicamento para administrar un gen a la espina dorsal mediante administración periférica del vector AAV.

La descripción también reside un método de administración génica a la espina dorsal de un sujeto, método que comprende administrar periféricamente al sujeto un vector AAV que comprende dicho gen.

### Leyendas de las figuras

35 **Figura 1.** Administración génica extendida a músculos y SNC de ratones neonatales tras inyección intramuscular de AAV (azul: tinción histoquímica de mSEAP). Secciones transversales representativas de (a) músculo gastrocnemio, (b) cerebro (3<sup>er</sup> ventrículo) y (c) espina dorsal a los 3 días (PN4) ó 7 días (PN8) tras inyección de ss- ó scAAV1 ó AAV9.

40 NI: no inyectado; PN4: post-natal 4; PN8: post-natal 8; ss: cadena sencilla; sc: auto-complementario. Barra de escala (b, c) 100 µm.

**Figura 2.** Administración génica extendida a músculos y SNC de ratones neonatales tras inyección intramuscular de AAV (azul: tinción histoquímica de mSEAP). Secciones representativas de tejido de (a) músculo de diafragma, (b) 3<sup>er</sup> ventrículo cerebral (flechas: células de plexo coroideo que expresan mSEAP; cabezas de flecha: células endimarias), (c) parénquima de SNC (flechas: células neuronales).

45 NI: no inyectado; PN4: post-natal 4; PN8: post-natal 8; ss: cadena sencilla; sc: auto-complementario. Barra de escala (a, b, c) 100 µm; (d) 40 µm.

50 **Figura 3.** La administración intraperitoneal de AA9-GFP auto-complementario media en la transducción del SNC en ratones neonatales. Secciones transversales representativas de cerebro y espina dorsal tratadas para inmunohistoquímica de GFP 7 días después de la administración de AAV. Se detectó expresión transgénica en (a) células epiteliales del plexo coroideo, (b) células del hipocampo con morfología neuronal (cabeza de flecha y recuadro superior) y glial (flecha y recuadro inferior), (c) células del córtex entorrinal (las flechas indican células con

una morfología neuronal típica), (d, e) células de la espina dorsal (la flecha indica una célula marcada con GFP con morfología de neurona motora)), y (f) fibras sensoriales de la espina dorsal cervical. Barra de escala 40  $\mu\text{m}$ .

5 **Figura 4.** La administración intramuscular de vectores AAV9 auto-complementarios permite la transducción de células del SNC en ratones neonatales. Las secciones histológicas de cerebro y espina dorsal fueron tratadas con inmunohistoquímica de GFP 7 días después de la inyección de AAV. Se detectó expresión transgénica en (a) células epiteliales del plexo coroideo (flechas) y del epéndimo (cabezas de flecha), (b, c) células neurales del septum, y (d, e) del córtex entorrinal, y (f) el tracto corticoespinal al nivel de la decusación piramidal de la espina dorsal cervical (flechas). Barra de escala 20  $\mu\text{m}$ .

10 **Figura 5.** La administración intravenosa de vectores AAV9 auto-complementarios media en la expresión de GFP en el SNC en ratones neonatales. Fotomicrografías representativas de secciones histológicas de cerebro y espina dorsal tratadas para inmunohistoquímica de GFP 7 días después de la inyección de AAV. Se detectaron células positivas en GFP en (a) células epiteliales del plexo coroideo (flecha) y el epéndimo (cabezas de flecha), (c) vasos sanguíneos cerebrales, (d, f) células del hipocampo con morfología neuronal (flecha) y glial (cabeza de flecha), (g) células de tipo neurona del córtex entorrinal. Se transdujo de manera eficiente muchos cuerpos celulares (flechas) y fibras celulares (cabezas de flecha) de tipo neurona por toda la espina dorsal en los niveles (h) cervical, (i) torácico y (j) lumbar. No se observó tinción en el SNC de los ratones no inyectados, tal como se muestra en secciones representativas de (b) el 3<sup>er</sup> ventrículo o (e) el hipocampo o (k-m) la espina dorsal. Barra de escala (a, b) 100  $\mu\text{m}$ , (c, d, f) 40  $\mu\text{m}$ , (e, g) 100  $\mu\text{m}$ , (h-m) 20  $\mu\text{m}$ .

20 **Figura 6.** Los vectores de AAV9 de cadena sencilla que expresan GFP median en la expresión transgénica en el SNC de ratones neonatales. Fotomicrografías representativas de secciones de cerebro y espina dorsal de ratones neonatales para inmunohistoquímica de GFP 3 semanas después de inyección i.v. de vectores ssAAV9. Células positivas en GFP en (a) el plexo coroideo (asterisco), el hipocampo (cabeza de flecha y recuadro) y el núcleo habenular (flecha), (b) eminencia media y (c-e) células de tipo neurona motora de la espina dorsal ventral. Paneles de barra de escala b: 100  $\mu\text{m}$ ; c, d, e: 20  $\mu\text{m}$ .

25 **Figura 7.** Los vectores AAV9 recombinantes median en la expresión transgénica en el SNC de ratones adultos. Secciones cerebrales coronales representativas de ratones C57bl6 adultos 4 semanas después de administración intravenosa de  $3 \times 10^{11}$  (b) ó  $1 \times 10^{12}$  (c-h) genoma de vector de scAAV9 (a, c), ssAAV9 (b), scAAV1 (d) y ssAAV1 (e) que expresan mSEAP; paneles de barra de escala g, h, j: 100  $\mu\text{m}$ ; paneles i, k, l: 20  $\mu\text{m}$ .

30 **Figura 8.** Los vectores AAV9 inyectados intravenosamente median en la expresión transgénica en la espina dorsal de ratones adultos. Secciones transversales representativas de espina dorsal de ratones C57bl6 adultos 4 semanas después de administración intravenosa de  $1 \times 10^{12}$  genoma de vector de ssAAV9 (a, b), scAAV9 (c, g) que expresan mSEAP.

Barras de escala (a,b,e): 40  $\mu\text{m}$ , recuadros: 20  $\mu\text{m}$ ; (c,d): 100  $\mu\text{m}$ ; (f): 50  $\mu\text{m}$ ; (g): 20  $\mu\text{m}$ .

35 **Figura 9.** La inyección intravenosa de AAV9-GFP en gatos de LIX-1 media en la expresión transgénica a lo largo de toda la espina dorsal. Se observaron secciones transversales representativas de espina dorsal de gato heterocigoto LIX1 de 2 días de edad usando microscopía confocal de barrido con láser (Fig. 9 a,c) ó tratadas para inmunohistoquímica de GFP (Fig. 9 b, d) 10 días después de inyección de scAAV9 que expresa GFP en la vena yugular.

Barras de escala (a): 200  $\mu\text{m}$ ; (b, d): 50  $\mu\text{m}$ ; (c): 100  $\mu\text{m}$ .

40 **Figura 10:** La inyección intravenosa de AAV9 que expresa GFP ( $1,5 \times 10^{12}$  partículas que contienen genoma de vector de scAAV9-CMV-eGFP) en gatos LIX-1 media en la expresión transgénica en neuronas motoras. Un análisis de inmunotinción doble usando anticuerpos contra GFP y colina acetil transferasa (ChAT) demostró que, tanto en cachorros de gato afectados por AME (a-c) como no afectados (d-f), una parte significativa de las células positivas en GFP eran neuronas motoras.

45 **Figura 11.** La transducción extendida en espina dorsal está mediada por la administración i.v. de scAAV9 altamente concentrada en ratones adultos.

Alta expresión de GFP en células neuronales (flechas) y gliales (cabezas de flecha) en (a-c) secciones de ganglios de espina dorsal cervical y (d,e) lumbar, (f) de raíz dorsal tratadas para inmunotinción de GFP 4 semanas después de inyección i.v. de  $2 \times 10^{12}$  vg scAAV9. (g-l) El análisis de inmunofluorescencia doble para (g, j) GFP y (h, k) GFAP (proteína ácida fibrilar glial, un marcador de astrocitos, rojo) muestra la expresión de GFP en algunos astrocitos (las cabezas de flecha indican células doblemente marcadas). (i, l) Fusión. Barras de escala (a, b, d-l): 50  $\mu\text{m}$ , (c): 20  $\mu\text{m}$ .

#### Descripción detallada de la invención

La administración génica extendida a la espina dorsal es un reto importante para el tratamiento de enfermedades de neuronas motoras (NM) tal como la atrofia muscular espinal (AME) o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). En la presente memoria, describimos una nueva metodología de transferencia génica que permite una transducción de

NM eficiente tras una única inyección periférica de vectores AAV recombinantes. Inyectamos vectores AAV recombinantes de cadena sencilla (ss) y auto-complementarios (sc) de serotipo 1 y 9 intraperitonealmente, intramuscularmente o intravenosamente (i.v.) en ratones neonatales o adultos, y analizamos la expresión transgénica en el sistema nervioso central (SNC). Se observó que ambos vectores recombinantes, ssAAV9 y scAAV9, se dirigen a células cerebrales neurales y epiteliales y, de forma destacada, a neuronas motoras y células gliales de la espina dorsal. Las fibras sensoras dorsales y los ganglios de raíz dorsales también se vieron altamente transducidos. La eficacia de transducción más impresionante se obtuvo con vectores scAAV9 inyectados i.v. Confirmamos adicionalmente la capacidad de scAAV9 inyectado i.v. para circunvalar la barrera hematoencefálica y transducir neuronas motoras en un modelo felino de AME. Esta estrategia representa el primer procedimiento no invasivo que logra una administración transgénica extendida a la espina dorsal, ofreciendo nuevas posibilidades para el tratamiento de enfermedades de NM.

#### *Vectores AAV*

Dentro del contexto de la presente descripción, el término “vector AAV” designa a cualquier vector que comprenda o derive de componentes de AAV y que sea adecuado para infectar células de mamífero, preferiblemente células humanas. El término vector AAV designa típicamente una particular vírica (o virión) de tipo AAV que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica. Como se discutirá más adelante, el AAV puede derivar de varios serotipos, que incluyen combinaciones de serotipos (es decir, AAV “pseudotipado”) o de varios genomas (p.ej. de cadena sencilla o auto-complementarios). Adicionalmente, el vector AAV puede ser de replicación defectuosa y/o estar dirigido.

El virus adeno-asociado (AAV) es un parvovirus dependiente, de aproximadamente veinte nanómetros de tamaño. Como otros parvovirus, el AAV es un virus de ADN no envuelto de cadena sencilla, que tiene un genoma de aproximadamente 5000 nucleótidos de longitud, que contiene dos marcos de lectura abiertos. El marco de lectura abierto a mano izquierda codifica para las proteínas responsables de la replicación (Rep), mientras que el marco de lectura abierto a mano derecha codifica las proteínas estructurales de la cápsida (Cap). Los marcos de lectura abierta están flanqueados por dos secuencias ITR, que actúan como origen de replicación del genoma viral. Además, el genoma también contiene una secuencia de empaquetamiento, que permite el empaquetamiento del genoma viral en una cápsida de AAV.

El AAV requiere funciones de co-ayuda (que pueden ser proporcionadas, p.ej., por un adenovirus, o por células de empaquetamiento o plásmidos colaboradores adecuados) para obtener una infección productiva en células cultivadas. En ausencia de dichas funciones de ayuda, los viriones de AAV esencialmente entran en las células, migran hacia el núcleo como una molécula de ADN de cadena sencilla, y se integran en el genoma de las células. El AAV tiene un amplio rango de hospedantes para infección, que incluye células humanas, es ubicuo en humanos y es completamente no patogénico.

Se han diseñado, producido y usado vectores AAV para mediar en la administración de gene a sujetos humanos, incluyendo propósitos terapéuticos. Actualmente se están desarrollando ensayos clínicos en varios países que usan vectores AAV. Típicamente, los vectores AAV para uso en transferencia génica comprenden un genoma de AAV defectuoso en replicación que carece de secuencias víricas codificadoras Rep y Cap funcionales. Dichos vectores AAV de replicación defectuosa más preferiblemente carecen de la mayoría o de todas las secuencias codificadoras Rep y Cap, y esencialmente retienen una o dos secuencias ITR de AAV y una secuencia de empaquetamiento.

Los métodos para producir dichos vectores AAV se han descrito en la bibliografía, incluyendo el uso de células de empaquetamiento, virus o plásmidos auxiliares y/o sistemas de baculovirus (Samulski et al., (1989) J. Virology 63, 3822; Xiao et al., (1998) J. Virology 72, 2224; Inoue et al., (1998) J. Virol. 72, 7024; WO 98/22607; WO 2005/072364). También se han publicado métodos para producir vectores AAV pseudotipados (p.ej., WO 00/28004), así como diversas modificaciones o formulaciones de vectores AAV, para reducir su inmunogenicidad durante la administración in vivo (véase, p.ej., WO 01/23001; WO 00/73316; WO 04/112727; WO 05/005610; WO 99/06562).

Los vectores AAV pueden prepararse o derivar de varios serotipos de AAVs, que pueden incluso mezclarse entre ellos o con otros tipos de virus para producir virus AAV quiméricos (p.ej. pseudotipados).

En una realización particular, el vector AAV para uso en la presente descripción deriva de un virus AAV humano. Dicho AAV humano (cápsida e ITR) puede derivar de cualquier serotipo conocido, p.ej., de uno cualquiera de los serotipos 1-11, preferiblemente de AAV2, AAV4, AAV6, AAV8 y AAV9, más preferiblemente de AAV6, AAV8 y AAV9, incluso más preferiblemente de AAV9. Los ejemplos específicos de dichos vectores AAV son vectores que comprenden un genoma derivado de AAV2 (una molécula de ácido nucleico que comprende un ITR derivado de AAV2 y una secuencia de empaquetamiento derivada de AAV2 ligada operativamente a un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica, preferiblemente dos ITR derivados de AAV2 que flanquean una secuencia de empaquetamiento derivada de AAV2 y un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica) en una cápsida derivada de AAV2; vectores que comprenden un genoma derivado de AAV4 en una cápsida derivada de AAV4; vectores que comprenden un genoma derivado de AAV6 en una cápsida derivada de AAV6; vectores que comprenden un genoma derivado de AAV8 en una cápsida derivada de AAV8; vectores que comprenden un genoma derivado de AAV9 en una cápsida derivada de AAV9.

5 En otra realización particular, el vector AAV es un vector AAV pseudotipado, es decir, comprende secuencias o componentes que se originan en al menos dos serotipos de AAV distintos. En una realización particular, el vector AAV pseudotipado comprende un genoma de AAV derivado de un serotipo de AAV (por ejemplo, AAV2), y una cápsida derivada al menos en parte de un serotipo de AAV distinto. Los ejemplos específicos de dichos vectores AAV pseudotipados incluyen, sin limitación, vectores que comprenden un genoma derivado de AAV2 en una cápsida derivada de AAV4; o vectores que comprenden un genoma derivado de AAV2 en una cápsida derivada de AAV6; o vectores que comprenden un genoma derivado de AAV2 en una cápsida derivada de AAV8; o vectores que comprenden un genoma derivado de AAV2 en una cápsida derivada de AAV9.

10 En una realización particular adicional, que puede combinarse con una de las anteriores realizaciones, el vector AAV puede comprender una cápsida modificada, que incluya proteínas o péptidos de origen no vírico o que estén modificados estructuralmente para alterar el tropismo del vector. Como ejemplo particular, la cápsida puede incluir un ligando de un receptor particular, o un receptor de un ligando particular, para dirigir al vector hacia el(los) tipo(s) de célula(s) que expresa(n) dicho receptor o ligando, respectivamente.

En los vectores AAV usados en la presente invención, el genoma de AAV es un ácido nucleico de cadena sencilla.

15 Como se ha discutido anteriormente, el genoma derivado de AAV comprende un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica. Típicamente, el ácido nucleico también comprende secuencias reguladoras que permiten la expresión y, preferiblemente, la secreción de la proteína codificada, tal como, p.ej., un promotor, potenciador, señal de poliadenilación, sitios de entrada de ribosoma internos (IRES), secuencias que codifican dominios de transducción de proteínas (PTD), y similares. A este respecto, lo más preferible es que el ácido nucleico comprenda una región promotora, ligada operativamente a una secuencia codificadora, para provocar o mejorar la expresión de la proteína terapéutica en células infectadas. Dicho promotor puede ser ubicuo, específico de tejido, fuerte, débil, regulado, quimérico, etc., para permitir una producción eficiente y adecuada de la proteína en el tejido infectado. El promotor puede ser homólogo a la proteína codificada, o heterólogo, lo que incluye promotores celulares, víricos, fúngicos, vegetales o sintéticos. La mayoría de los promotores preferidos para uso en la presente descripción serán funcionales en células nerviosas, particularmente en células humanas, más preferiblemente en neuronas motoras. Los ejemplos de dichos promotores regulados incluyen, sin limitación, promotores que contengan elementos Tet on/off, promotores inducibles por rapamicina y promotores de metalotioneína. Los ejemplos de promotores específicos para las neuronas motoras incluyen el promotor del Péptido Relacionado a Gen de Calcitonina (CGRP), un conocido factor derivado de neurona motora. Otros promotores funcionales en neuronas motoras incluyen los promotores de Colina Acetil Transferasa (ChAT), Enolasa Específica de Neurona (NSE), Sinapsina o promotores ubicuos que incluyen Elementos Silenciadores Específicos de Neuronas (NRSE). Los ejemplos de promotores ubicuos incluyen promotores virales, particularmente el promotor CMV, el promotor RSV, el promotor SV40, etc. y promotores celulares tales como el promotor PGK (fosfoglicerato quinasa).

35 En una realización preferida, el ácido nucleico comprende una secuencia líder que permite la secreción de la proteína codificada. La fusión del transgén de interés con una secuencia que codifica un péptido de señal de secreción (normalmente localizado en el extremo N de polipéptidos secretados) permitirá la producción de la proteína terapéutica en una forma que pueda ser secretada desde la célula transducida al CSF. Los ejemplos de dichos péptidos señal incluyen la albúmina, la  $\beta$ -glucuronidasa, la proteasa alcalina o los péptidos señal secretores de fibronectina.

40 Según otra realización específica, el transgén se fusiona a secuencias de PTD, tal como las secuencias Tat o VP22, a fin de causar o mejorar la secreción de la proteína terapéutica desde de las células transducidas y la re-captación por las células colindantes.

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

45 En una realización particular adicional, el ácido nucleico comprende, ligado operativamente, un promotor, una secuencia líder y una secuencia PTD, para permitir la expresión y la secreción de la proteína codificada.

En una realización más preferida, el promotor es específico o funcional en neuronas motoras, es decir, permite la expresión (preferencial) del transgén en dichas células.

50 Como se ha discutido anteriormente, los vectores AAV pueden producirse mediante técnicas conocidas *per se* en la técnica, como se ilustra en más detalle en los ejemplos.

#### *Administración periférica*

55 La descripción se basa en el inesperado descubrimiento de que se puede lograr una expresión extendida y efectiva de genes en el interior de neuronas motoras o de células gliales con técnicas no invasivas, a través de la administración periférica de vectores AAV. Dicha administración periférica incluye, sin limitación, cualquier ruta de administración que no implique una inyección directa al cerebro. Más particularmente, la administración periférica comprende inyecciones sistémicas, tal como inyección intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.), intraperitoneal (i.p.),

intra-arterial, subcutánea o transdérmica. La administración periférica también incluye la administración oral de vectores AAV (WO 96/40954), la administración usando implantes (WO 01/91803), o la administración mediante instalación a través del sistema respiratorio, p.ej., usando espray, aerosoles o cualquier otra formulación apropiada.

5 Las rutas de administración más preferidas incluyen inyección periférica, en particular inyección sistémica, más preferiblemente inyección i.m., i.p. ó i.v.

Las dosis de vectores AAV pueden adaptarse fácilmente por parte del especialista, p.ej., dependiendo de la enfermedad, el sujeto, el esquema de tratamiento, etc. Típicamente, se administran entre  $10^9$  y  $10^{14}$  genomas virales (unidades de transducción) por dosis en ratones, preferiblemente entre aproximadamente  $10^{11}$  y  $10^{13}$ .

10 Típicamente, las dosis de vectores AAV a administrar en humanos pueden oscilar entre  $10^{11}$  y  $10^{17}$  genomas virales, preferiblemente entre  $10^{13}$  y  $10^{16}$ .

Una dosis efectiva preferida dentro del contexto de esta invención es una dosis que permite una transducción óptima de las células de espina dorsal (neuronas motoras y/o células gliales).

15 El vector AAV puede administrarse en cualquier forma adecuada, tanto en disolución o suspensión líquida, como en forma de sólido adecuado para disolución o suspensión en un líquido antes de la inyección, como en forma de gel o de emulsión. Los vectores AAV se formulan típicamente con cualquier excipiente, vehículo, adyuvante, diluyente, etc. farmacéuticamente aceptable. Para inyección, el excipiente puede ser un líquido, disolución isotónica, tampón, tal como agua esterilizada y libre de pirógeno, o una disolución salina tamponada con fosfato esterilizada y libre de pirógeno. Para inhalación, el excipiente puede darse en forma particulada.

20 Los vectores AAV se administran típicamente en una cantidad "terapéuticamente efectiva", es decir, una cantidad que sea suficiente para aliviar (p.ej., disminuir, reducir) al menos uno de los síntomas asociados al estado de enfermedad, o para proporcionar una mejoría de la condición del sujeto. Debería destacarse que se pueden llevar a cabo administraciones repetidas, si se requiere, usando la misma ruta de administración periférica o diferente, y/o los mismos serotipos de AAV o distintos.

25 Los inventores han demostrado por primera vez que los vectores AAV, en particular los vectores scAAV, administrados periféricamente, atraviesa la barrera hematoencefálica y provoca una infección sustancial de células de SNC. Este efecto se obtiene sin la necesidad de usar agentes disruptores de la barrera hematoencefálica. Los ejemplos de agentes disruptivos de la barrera hematoencefálica incluyen hipertermia, manitol, bradiquinina y NS1619.

30 Por consiguiente, en una realización particular, la descripción se refiere a un uso o método como se ha definido anteriormente, que comprende la administración periférica de un vector AAV, preferiblemente un vector scAAV, más preferiblemente un vector scAAV9, donde no se implementa ningún agente de disrupción de la barrera hematoencefálica. Además, la descripción se refiere a un uso o método como se ha definido anteriormente, en el que no se inyecta manitol al sujeto.

35 Alternativamente, en otra realización particular, la descripción se refiere a un uso o método como el definido anteriormente, que además comprende la disrupción de la barrera hematoencefálica con un agente o proceso de disrupción de la barrera hematoencefálica, para aumentar aún más el paso de los vectores scAAV implementados en la presente descripción a través de la barrera hematoencefálica.

#### *Trastorno de Neuronas Motoras*

40 La descripción muestra, por vez primera, que los vectores AAV administrados periféricamente atraviesan la barrera hematoencefálica y provocan una infección sustancial de células del SNC, particularmente de neuronas motoras a lo largo de la espina dorsal. Los resultados presentados demuestran que la infección es efectiva desde el segmento cervical hasta el segmento lumbar de la espina dorsal, proporcionando de este modo una administración génica extendida en las neuronas motoras.

45 La descripción se puede usar para tratar una variedad de trastornos a través de la administración de un producto terapéutico a las células del SNC, que incluyen neuronas motoras. El producto terapéutico puede ser cualquier proteína, péptido o ARN que pueda aliviar o reducir los síntomas que resultan de la ausencia o defecto en una proteína en una célula o sujeto, o que de otro modo confiere un beneficio a un sujeto. Los ejemplos de proteínas terapéuticas incluyen factores de crecimiento, citocinas, hormonas, neurotransmisores, enzimas, factores anti-apoptóticos, factores angiogénicos y cualquier proteína que se sepa que está mutada en trastornos patológicos tales como la proteína de "supervivencia de neurona motora" (SMN). Los ejemplos de ARN terapéutico incluyen ARN o ARNi antisentido dirigido a ARNs mensajeros que codifican para proteínas que tengan un interés terapéutico en cualquiera de las enfermedades mencionadas en la presente memoria más adelante. Por ejemplo, un ARNi dirigido a la enzima superóxido dismutasa puede ser codificado por un vector AAV como el definido anteriormente, en vista del tratamiento de ELA.

50

Dependiendo del producto terapéutico, la descripción se puede usar para tratar varias enfermedades, que incluyen cualquier enfermedad que pueda ser tratada o prevenida por la expresión de proteínas terapéuticas en tejidos nerviosos. Dichas enfermedades incluyen trastornos del SNC, preferiblemente seleccionados entre enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neuromusculares, enfermedades lisosomales, traumas, lesiones de médula ósea, dolor (que incluye dolor neuropático), cánceres del sistema nervioso, enfermedades desmielinizantes, enfermedades autoinmunes del sistema nervioso, síndromes neurotóxicos, trastornos del sueño.

Los ejemplos específicos de enfermedades incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, el síndrome de Tourette, esquizofrenia, enfermedad de Sly, enfermedad de Hunter, demencia, paranoia, trastorno obsesivo compulsivo, dificultades en el aprendizaje, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, ataxia espinocerebelar, paraplegia espástica, enfermedad de Kennedy, glioblastoma, neuroblastoma, autismo, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Hurler, enfermedad de Krabbe y alteraciones del comportamiento (p.ej., trastornos del sueño, la percepción o cognitivos).

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

La descripción también se puede usar en métodos diagnósticos, para detectar el estatus o la actividad o el crecimiento de neuronas motoras en sujetos mamíferos. Para dichas indicaciones, el vector comprende típicamente un gen detectable (fluorescente, luminiscente, etc.) y se usa como un marcador.

La descripción también se puede usar en sujetos animales, p.ej., para ayudar en la investigación de fármacos candidatos para tratar trastornos del SNC y/o para comprender los mecanismos del crecimiento, diferenciación, actividad, etc., de las neuronas motoras.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describirán en la siguiente sección experimental, que deberán considerarse meramente como ilustrativa, y no limitativa, del alcance de esta solicitud.

## EJEMPLOS

### Materiales y Métodos

Animales. se compraron ratones C57Bl/6 (de seis a ocho semanas de edad, hembras) adultas y preñadas a Charles River Laboratories (Les Oncins, Francia). Los neonatos fueron inyectados el día del nacimiento (post-natal 1, PN1). Los criadores de gatos con AME (animales heterocigotos y afectados) fueron obtenidos del Dr. Fyfe (Laboratory of Comparative Medical Genetics, Michigan, EE.UU.) y se fueron albergados en el Center of Boisbonne en la Escuela Veterinaria de Nantes. El genotipado de las crías de gato con AME se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Fyfe, Menotti-Raymond et al. 2006). Los experimentos fueron aprobados por el comité de ética regional (CREEA).

Todos los experimentos con animales fueron llevados a cabo según las guías Europeas para el cuidado humano y el uso de animales experimentales.

#### Preparación de vector.

Se generaron vectores AAV2/1 y AAV2/9 pseudotipados mediante empaquetamiento de genomas recombinantes basados en AAV2 de cadena sencilla (ss) y auto-complementarios (sc) en AAV1 y 9 cápsidas. Resumidamente, los vectores fueron producidos usando una transfección de tres plásmidos libre de virus colaborador en células HEK293 con (1) el plásmido colaborador de adenovirus, (2) el plásmido de empaquetamiento AAV que codifica los genes rep2 y cap1 ó 9 (pLTRC02 para AAV1 y p5E18-VD2/9 para AAV9), (3) el plásmido de vector AAV2 que contiene mSeAP o GFP (bajo control del promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV IE)) como genoma ss ó sc (Xiao, Li et al. 1998). Este último plásmido se construyó eliminando la secuencia D y el sitio de resolución terminal (trs) de una de las repeticiones terminales invertidas. Los vectores recombinantes fueron purificados mediante ultracentrifugación doble de CsCl seguida de diálisis contro disolución salina tamponada de fosfato. Se cuantificaron las partículas físicas mediante PCR en tiempo real para vectores inyectados en ratones y mediante hibridación de dot blot para vectores inyectados en crías de gato, y los títulos de vectores se expresaron como genoma vírico por mililitro (vg/mL).

#### Inyección *in vivo* de los vectores AAV

Se inyectó a ratones neonatos el día del nacimiento (post natal 1, PN1). Para las inyecciones i.m., se inyectaron disoluciones de vector AAV (ssAAV2/1 (n=2), ssAAV2/9 (n=2), scAAV2/1 (n=2) ó scAAV2/9 (n=3)) que codifican mSeAP o GFP en los músculos tríceps y gastrocnemio (1 sitio de inyección por músculo, 5  $\mu$ L por inyección,  $8 \times 10^9$  a  $2 \times 10^{10}$  genoma viral por ratón). Para las inyecciones i.p., se inyectaron disoluciones víricas (ssAAV2/1, n=2, ssAAV2/9, n=1, scAAV2/1, n=1 y scAAV2/9, n=2) que codifican mSeAP o GFP en la cavidad peritoneal de ratones C57Bl/6 de un día de edad (100  $\mu$ L, de  $3 \times 10^{10}$  a  $10^{11}$  genoma viral por ratón). Para las inyecciones i.v., se inyectó a ratones C57Bl/6 de un día de edad en la vena temporal con el vector scAAV2/9-GFP (50  $\mu$ L,  $1,5 \times 10^{10}$  genoma viral por ratón, n=3). Se inyectó a ratones C57Bl/6 adultos en la vena de la cola con vector scAAV2/9-mSeAP ó scAAV2/9-GFP (500  $\mu$ L,  $3 \times 10^{11}$  vg por ratón, n=3).



A los dos días del nacimiento, se inyectó un total de  $1,5 \times 10^{12}$  partículas que contienen genoma de vector de scAAV9-CMV-eGFP en la vena yugular de una cría de gato afectada por AME y una cría de gato heterocigota de AME.

#### Perfusión y procesamiento de tejido para histología

5 Se extrajeron músculos, cerebros y espinas dorsales en los días 1 (PN2), 3 (PN4) ó 7 (PN8) tras la inyección de ratones neonatos, ó 7 y 35 días después de inyección en ratones adultos. Los ratones C57Bl6 adultos fueron anestesiados (10 mg/kg de xilazina, 100 mg/kg de quetamina) y fueron perfundidos intracardialmente con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,1 M seguido de paraformaldehído al 4 % (PFA) en PBS. Los tejidos fueron extraídos y fijados posteriormente durante 4 h en la misma disolución antes de ser transferidos durante una noche a 4°C en sacarosa al 15 % para cerebros y músculos y 30 % de sacarosa para las espinas dorsales. Los neonatos fueron decapitados y los tejidos fueron sumergidos en PFA al 4 % durante 4 h antes de ser crioprotectados durante una noche a 4°C. Las muestras fueron congeladas en isopentano frío (-50°C) y se cortaron secciones en serie en un criostato y se almacenaron a -80°C para posterior análisis.

15 A los 10 días de la inyección, los gatos fueron anestesiados (150 µg/kg de medetomidina, 10 mg/kg de quetamina) y perfundidos transcárdialmente con 10 mL de disolución salina tamponada con fosfato seguido de 100 mL de PFA al 4%. Se extrajeron los cerebros y las espinas dorsales y se cortaron en láminas coronales de 5 mm, después se post-fijaron en PFA 4% seguido de una crioprotección durante una noche en sacarosa al 30%, y a continuación se congelaron sobre hielo seco en un compuesto OCT. Las láminas de espina dorsal fueron cortadas en intervalos de 1x100 µm seguido de 5x10 µm en un criostato. Se usaron secciones de cien µm de espesor para el examen de señal GFP mediante microscopía confocal, y se usaron secciones de 10 µm de espesor para la inmunocitoquímica.

#### Evaluación de expresión transgénica

25 Para la histoquímica de mSeAP, se extrajeron músculos, cerebros y espinas dorsales de ratones neonatos en los días 1, 3 y 7 p.i., se congelaron en isopentano frío (-50°C) y se mantuvieron a -80°C para uso extemporal. Se recolectaron los cerebros y las espinas dorsales de animales adultos a los 35 días p.i. y se trataron en las mismas condiciones. Se realizaron secciones de tejido de 16 µm de espesor para cerebro y espina dorsal, y de 8 µm de espesor para músculos en un criostato y se procesaron posteriormente para expresión transgénica. Las secciones se fijaron con un 0,5% de glutaraldehído, se lavaron con PBS y se desactivó térmicamente fosfatasa alcalina endógena durante 30 minutos a 65°C. A continuación las secciones fueron incubadas durante una noche a 37°C en 0,165 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y 0,33 mg/mL de tetrazolio de nitroazul en Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 50 mM, se contratiñe con hematoxilina-eosina y se monta con Eukit.

35 Para la inmunohistoquímica de GFP en ratones, se lavaron secciones en PBS y se incubaron durante 30 minutos en una disolución de peróxido de hidrógeno (disolución de Bloqueo de Peroxidasa, Dako) para inhibición de las peroxidases endógenas. Tras lavar en PBS, las secciones fueron bloqueadas durante una hora a temperatura ambiente en PBS con suero de cabra al 10 % (Dako) y un 0,4 % de Triton, y a continuación se incubaron durante una noche con un anti-GFP policlonal de conejo (Abcam; 1:3000). Se usó un anticuerpo secundario conjugado a biotina (Vectastáina, 1:200) y el kit Vectastain Elite ABC, y se reveló la tinción de DAB con el kit de sustrato para peroxidasa (Vector Laboratories). Las secciones fueron deshidratadas en alcohol y xileno, y se montaron con Eukit.

40 La inmunocitoquímica de GFP en gatos se realizó sobre secciones congeladas de espina dorsal de 10 µm. Resumidamente, las secciones de espina dorsal fueron permeabilizadas con Tween 20 al 0,2 % en PBS (pH 7,4), bloqueadas con un 5 % de suero de cabra, incubadas dos noches a 4°C con anticuerpo policlonal AB3080 de GFP (Chemicon, 1:50) e incubadas con un anticuerpo anti-conejo de cabra biotinilado. El inmunomarcaje fue revelado tras una incubación con el complejo estreptavidina-peroxidasa usando el sustrato de peroxidasa diaminobenzidina. Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina.

45 La colina acetiltransferasa de neuronas motoras fue marcada con anticuerpo ChAT policlonal de cabra de colina acetiltransferasa (ChAT) (AB144P, Chemicon, Francia, 1:100). Resumidamente, se bloquearon secciones de espina dorsal con un 1 % de suero de conejo en PBS/Tx100 al 0,4 %, se incubó una noche a temperatura ambiente con el anticuerpo primario y se incubó con un anticuerpo anti-cabra de conejo biotinilado. El inmunomarcaje fue revelado tras una incubación con estreptavidina Alexa 555 flúor y se cubrieron secciones con medio Mowiol (Calbiochem, EE.UU.) para ser observadas en microscopía confocal.

#### Microscopía de barrido confocal de láser

50 La expresión de GFP y la inmunocitoquímica fueron observadas con un microscopio confocal de barrido láser Nikon TE-2000, equipado con un láser de ion argón azul y un láser de neón de helio que emiten rayos monocromáticos a 488 nm (verde) y 543 nm (rojo), respectivamente. Los portas fueron escaneados en serie usando un objetivo X20 sumergido en agua. Cada imagen fue registrada en un canal separado (canal verde para GFP y canal rojo para estreptavidina 555) y se superpusieron para permitir la detección de señales fluorescentes co-localizadas.

#### **Ejemplo 1. Inyección intramuscular de vectores AAV que expresan mSEAP en ratones neonatales**

En primer lugar, evaluamos el potencial de los vectores ss- ó sc-AAV de serotipo 1 y 9 para transducir las células del SNC tras inyección i.m. El ssAAV1, ssAAV9, scAAV1 ó scAAV9 que codifican la fosfatasa alcalina murina secretada (mSEAP) bajo el promotor de citomegalovirus (CMV) fueron inyectados en los músculos tríceps y gastrocnemio de ratones C57Bl6 de un día de edad ( $8 \cdot 10^{+9}$  a  $2 \cdot 10^{+10}$  genomas vírico por ratón, 3 ratones por grupo). Los tejidos inyectados de músculo, cerebro y espina dorsal fueron extraídos 1, 3 ó 7 días después de la inyección y se analizaron para determinar la expresión de mSEAP usando histoquímica.

La expresión de mSEAP se detectó en los músculos inyectados 3 y 7 días después de la inyección de cada serotipo de AAV, excepto para el ssAAV9, el nivel de expresión aumentó drásticamente con el tiempo (Fig. 1a). En el SNC, se detectó expresión transgénica solo después de inyección i.m. de scAAV9. De forma interesante, se detectó expresión de mSEAP en las células epiteliales del plexo coroideo (Fig. 1b), que desempeñan un papel crucial en la secreción y la eliminación de muchas proteínas y toxinas en el fluido cerebroespinal (CSF) (Redzic, 2005). La expresión de mSEAP en el plexo coroideo se observó en tan solo 3 días desde la inyección (PN4), y los niveles de expresión volvieron a aumentar con el tiempo. También se localizó una débil expresión transgénica dentro y alrededor de los vasos sanguíneos del cerebro y la espina dorsal tras inyección i.m. del vector scAAV9 (Fig. 1c).

### 15 **Ejemplo 2. Inyección intraperitoneal de vectores AAV que expresan mSEAP en el ratón neonatal**

A continuación analizamos si la administración i.p. de ssAAV1, ssAAV9, scAAV1 y scAAV9 en ratones C57Bl6 de un día de edad ( $100 \mu\text{L}$ ,  $3 \cdot 10^{+10}$  a  $1 \cdot 10^{+11}$  genomas virales por ratón) podrían mediar en la expresión transgénica en el SNC 1, 3 ó 7 días después de la inyección.

Se detectó un nivel bajo de expresión de mSEAP en las fibras de músculo de diafragma de ratones inyectados con ssAAV1 a los 3 días post-inyección, que fue similar a lo observado con scAAV1 (Fig. 2a), y con ambos vectores 7 días después de la inyección. (Fig. 2a). El ssAAV9 transduce unas pocas fibras musculares sólo a los 21 días post-inyección, mientras que se observó una intensa tinción de mSEAP en el diafragma cuando se usa scAAV9 desde los 3 días post-inyección (Fig. 2a). Este elevado nivel de transducción también se observó en otros músculos tales como el tríceps braquial o el músculo gastrocnemio (datos no mostrados).

Las células epiteliales del plexo coroideo y el epéndimo aparecieron claramente marcadas tras inyección con scAAV9 (Fig. 2b). Además se observó una transducción robusta en dichas regiones a los 7 días post-inyección (Fig. 2b). También se observó expresión transgénica en las meninges y en los vasos sanguíneos a los 7 días post-inyección, tanto en el cerebro como a lo largo de la espina dorsal, y fue superior a lo observado tras inyección i.m. (Fig. 2c). De forma interesante, también se detectó expresión de mSEAP en algunas células neurales del cerebro y la espina dorsal (Fig. 2d). En conjunto, estos resultados indican que los vectores scAAV9 inyectados i.m. ó i.p. que expresan la proteína mSEAP pueden dirigirse de forma eficaz al SNC, especialmente a células epiteliales del plexo coroideo y el epéndimo.

### 30 **Ejemplo 3. Expresión transgénica en el SNC tras inyección i.m. ó i.p. de scAAV9-GFP en el ratón neonatal**

Puesto que el mSEAP es una proteína secretada, la expresión transgénica observada en las células del SNC tras inyección periférica de AAV podría ser el resultado de una transcitososis proteínica más que de una transducción celular del AAV. Por tanto, verificamos si se podrían obtener resultados similares usando una proteína no secretada.

Se inyectó un vector scAAV9 recombinante que expresa la "proteína fluorescente verde" (GFP) en ratones neonatales bien intraperitonealmente ( $3 \cdot 10^{+10}$  vg por ratón,  $100 \mu\text{L}$ ) o intramuscularmente ( $8 \cdot 10^{+9}$  vg en  $20 \mu\text{L}$  por ratón,  $5 \mu\text{L}$  por músculo). Siete días después, y de forma similar a lo observado con scAAV9-mSEAP, se observó expresión de GFP en el plexo coroideo y en células del epéndimo localizadas en los ventrículos del cerebro (Fig. 3a y Fig. 4a). Adicionalmente, en este caso encontramos muchas células neurales positivas en GFP en varias regiones cerebrales localizadas, en particular, próximas a los ventrículos. Los cuerpos celulares y las fibras celulares del hipocampo (Fig. 3b), el septum (Fig. 4b,c) y el córtex entorrinal (Fig. 3c, Fig. 4d-e) resultaron transducidos de forma efectiva.

Cabe destacar que se detectó expresión de GFP en células de la espina dorsal a los 7 días tras la administración de AAV, incluyendo en células con fenotipo de tipo neurona motora (Fig. 3d,e). También se observó una fuerte expresión de GFP en fibras del tracto corticoespinal que cruza al nivel cervical de la espina dorsal (Fig. 3f y 4h). Probablemente, la transducción de estas fibras es el resultado del ataque a las NMs superiores, cuyos somas están localizados en el córtex motor y que también parecían inmunopositivos para GFP (Fig. 3d). Globalmente, se detectó un número mayor de células inmunopositivas para GFP en el SNC tras inyección i.p. que tras inyección i.m., debido a la diferencia de eficacia entre las rutas de inyección o al mayor título de vector usado en el procedimiento i.p.

### 50 **Ejemplo 4. Expresión transgénica en el SNC tras inyección intravenosa de scAAV9 que expresa GFP en ratones neonatales**

Puesto que el vector recombinante scAAV9 resultó ser el más eficiente para mediar en la transducción celular del SNC tras administración i.m. ó i.p., evaluamos si ésta podría mejorarse usando la ruta i.v. de administración.

De este modo se inyectaron vectores scAAV9 que expresan GFP en la vena temporal de ratones C57Bl6 de un día de edad (50  $\mu$ L,  $1,5 \cdot 10^{10}$  genomas víricos por ratón) y se extrajeron los tejidos del SNC y se procesaron para inmunotinción 7 días después de ello. Se detectó una fuerte expresión de GFP en el plexo coroideo y las células del epéndimo (Fig. 5a) y en los vasos sanguíneos del cerebro (Fig. 5c). Nuevamente, obtuvimos expresión de GFP dentro de células de fenotipo neurona y de fenotipo glial a lo largo del cerebro, en particular del córtex entorrinal (Fig. 5d) y el hipocampo (Fig. 5e,f).

Se observó un nivel muy elevado de expresión transgénica a lo largo de la espina dorsal (desde el segmento cervical hasta el segmento lumbar) en células con un fenotipo y localización de neurona motora (espina dorsal ventral) (Fig. 5h-i). Esto probablemente es el resultado de la difusión del vector a través de los vasos sanguíneos desde la circulación hacia el parénquima cerebral, y/o del transporte de anterógrado axonal desde las regiones superiores del SNC.

A continuación determinamos si el ssAAV9 también podría cruzar la BBB y transducir las células del SNC tras administración i.v., o si esta propiedad es específica del genoma de cadena doble. Con este objetivo, se inyectaron vectores ssAAV9 que expresan GFP en la vena temporal de ratones neonatales y se analizó la expresión de GFP 3 semanas después (a fin de permitir la conversión de genoma en ADN de cadena doble). De forma similar a lo observado con scAAV9, el ssAAV9-GFP demostró mediar en la transducción de células del SNC tras administración i.v., aunque su eficacia fue inferior a la del scAAV9. Nuevamente, las células del plexo coroideo y el epéndimo expresaron grandes cantidades de GFP y se observó que muchas regiones del cerebro próximas a los ventrículos cerebrales eran transducidas (Fig. 6a). Por ejemplo, se detectaron neuronas positivas en GFP en el hipocampo y el núcleo habenular (Fig. 6a) y en la eminencia mediana (Fig. 6b). Cabe destacar que se observó que algunas células de tipo neurona motora expresaban GFP en la espina dorsal ventral (Fig. 6c-e). También se observó que unas pocas células del SNC expresaban GFP tras administración i.m. ó i.p. del ssAAV9 recombinante (datos no mostrados).

Considerados en conjunto, estos datos sugieren una capacidad inesperada de los vectores AAV de serotipo 9 –tanto convencionales como auto-complementarios– para atravesar la BBB y transducir las células del SNC en ratones neonatales, incluyendo las neuronas motoras inferiores, tras una única inyección intravenosa en el ratón neonatal.

#### **Ejemplo 5. Inyección intravenosa de vectores ss y scAAV9 en ratones adultos**

Puesto que la BBB no está completamente formada en ratones neonatales, evaluamos si la capacidad de los vectores AAV9 para transducir células neurales en ratones recién nacidos se mantenía en ratones adultos. Se inyectaron vectores ss y sc AAV9 que codifican para mSEAP ( $3 \cdot 10^{11}$  vg ó  $1 \cdot 10^{12}$  vg por ratón) en la vena de la cola de ratones adultos y se analizó la expresión transgénica en el SNC cuatro semanas después. Tras la administración i.v. de scAAV9-mSEAP, se observó una expresión sostenida del transgén en muchas regiones cerebrales tal como la eminencia media (Fig. 7f), el hipocampo (Fig. 7g) o el cuerpo calloso (Fig. 7h).

Cabe destacar que hubo muchas células y fibras positivas para mSEAP a lo largo de la espina dorsal tras la administración i.v. de vectores AAV recombinantes de serotipo 9 (Fig. 8a-g). Nuevamente, se observó un mayor nivel de expresión transgénica con el vector sc- que con el vector convencional ssAAV9 (Fig. 8a,b frente a 8c-g).

Inyecciones similares con scAAV9-GFP demostraron la superioridad del scAAV9 para la administración génica sistémica a la espina dorsal. Se observó que un número elevado se expresaba cuatro semanas después de la inyección i.v. de  $2 \times 10^{12}$  vg de scAAV9, se expresó GFP en la espina dorsal tanto en células neuronales como gliales, como demuestra la inmunotinción de la proteína ácida fibrilar (GFAP), un marcador de astrocitos (Fig. 11).

Por lo tanto, nuestros resultados muestran una transducción eficaz de las células del SNC, que incluyen NMs inferiores y células gliales, tras administración intravenosa de vectores AAV9 recombinantes en ratones adultos en los que la BBB está formada completamente. Esto enfatiza la propiedad particular de estos vectores de pasar desde la circulación al parénquima del SNC a través de la BBB, logrando una transferencia génica extendida a las células nerviosas.

#### **Ejemplo 6. Inyección intravenosa de AAV9-GFP en un modelo de animal grande**

La validación de esta nueva estrategia de transferencia génica al SNC en modelos animales grandes es un prerrequisito para una potencial aplicación en ensayos clínicos con humanos.

Evaluamos la expresión transgénica en la espina dorsal de crías de gato LIX-1 después de una administración intravenosa de vectores scAAV9 recombinantes. Se inyectó a gatitos de dos días de edad (un homocigoto LIX-1 y un heterocigoto) en la vena yugular con scAAV9 que expresa GFP. Diez días después, se analizaron secciones de tejido de espina dorsal para determinar la expresión de GFP usando microscopía confocal de barrido.

Se observó una fuerte señal de GFP a lo largo de la espina dorsal desde la parte cervical hasta el *cauda equina* tanto en la materia gris como en la blanca, resultando similar el modelo de expresión tanto en animales afectados como heterocigotos. Las fibras nerviosas del fascículo gracilis y los tractos sensoriales dorsales cutáneos expresaron niveles elevados de GFP (Fig. 9a). Además, se detectó la expresión de GFP en una serie de cuerpos celulares en la espina dorsal ventral, tras observación de fluorescencia de GFP (Fig. 9a,c) y análisis

inmunohistoquímico (Fig. 9b-d). Un análisis de inmunotinción doble con anticuerpos contra GFP y colina acetil transferasa (ChAT) demostró que, tanto en gatitos afectados por AME como en no afectados, una parte significativa de las células positivas para GFP eran neuronas motoras (Fig. 10).

### Referencias

- 5 Azzouz, M., A. Hottinger, et al. (2000). "Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2". *Hum Mol Genet* 9(5): 803-11.
- Azzouz, M., et al., (2004). "Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy". *J Clin Invest.* 114(12): 1726-31.
- 10 Boillee, S., K. Yamanaka, et al. (2006). "Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia". *Science* 312(5778): 1389-92.
- Cearley, C. N. y J. H. Wolfe (2006). "Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain". *Mol Ther* 13(3): 528-37.
- 15 Daly, T. M., C. Vogler, et al. (1999). "Neonatal gene transfer leads to widespread correction of pathology in a murine model of lysosomal storage disease". *Proc Natl Acad Sci USA* 96(5): 2296-300.
- Fu, H., J. Muenzer, et al. (2003). "Self-complementary adeno-associated virus serotype 2 vector: global distribution and broad dispersion of AAV-mediated transgene expression in mouse brain". *Mol Ther* 8(6): 911-7.
- Fyfe, J. C., M. Menotti-Raymond, et al. (2006). "An approximately 140-kb deletion associated with feline spinal muscular atrophy implies an essential LIX1 function for motor neuron survival". *Genome Res* 16(9): 1084-90.
- 20 Inagaki, K., S. Fuess, et al. (2006). "Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8". *Mol Ther* 14(1): 45-53.
- Kaspar, B.K., et al. (2003). "Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model". *Science* 301: 839-42.
- 25 MacLean, H. E., G. L. Warne, et al. (1996). "Spinal and bulbar muscular atrophy: androgen receptor dysfunction caused by a trinucleotide repeat expansion". *J Neurol Sci* 135(2): 149-57.
- McCarty, D. M., H. Fu, et al. (2003). "Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo". *Gene Ther* 10(26): 2112-8.
- Monani, U. R. (2005). "Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease". *Neuron* 48(6): 885-96.
- 30 Pasinelli, P. y R. H. Brown (2006). "Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics". *Nat Rev Neurosci* 7(9): 710-23.
- Passini, M. A. y J. H. Wolfe (2001). "Widespread gene delivery and structure-specific patterns of expression in the brain after intraventricular injections of neonatal mice with an adeno-associated virus vector". *J Virol* 75(24): 12382-92.
- 35 Scherrmann, J. M. (2002). "Drug delivery to brain via the blood-brain-brain". *Vascul Pharmacol.* 38: 349-54.
- Xiao, X., J. Li, et al. (1998). "Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus". *J Virol* 72(3): 2224-32.

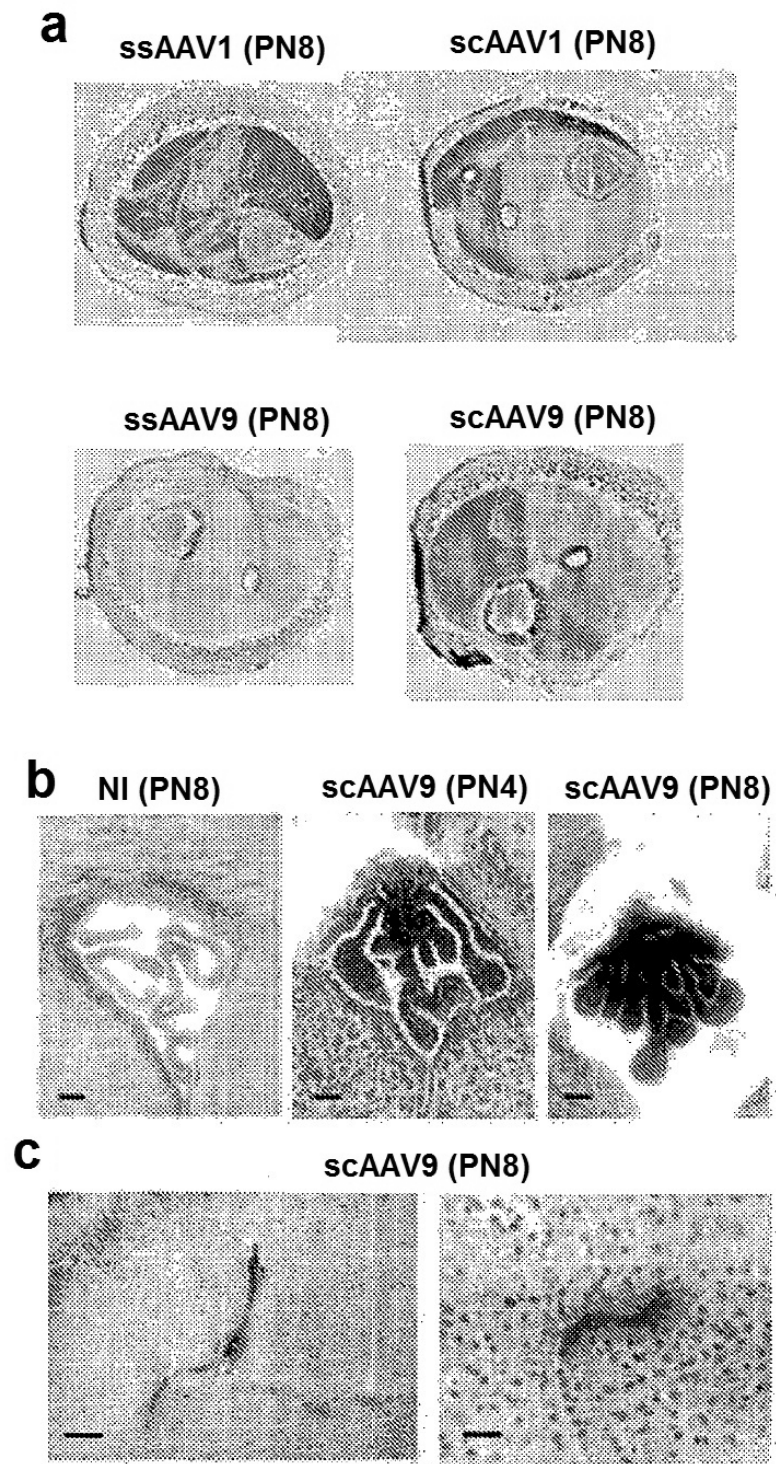
**PUNTOS DESCRITOS**

- Punto 1. El uso de un vector AAV que comprende un gen de interés para la fabricación de un medicamento para administrar el gen a neuronas motoras o células gliales mediante administración periférica de dicho vector AAV a dicho sujeto, en donde dicho vector AAV es un vector AAV de cadena doble auto-complementario.
- 5 Punto 2. El uso de un vector AAV que comprende un gen de interés para la fabricación de un medicamento para administrar el gen a la médula espinal mediante administración periférica de dicho vector AAV a dicho sujeto, en donde dicho vector AAV es un vector AAV de cadena doble auto-complementario.
- Punto 3. El uso de un vector AAV que comprende un gen terapéutico para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno de neuronas motoras en un sujeto, en donde dicho vector AAV se administra mediante inyección periférica a dicho sujeto, causando dicha administración la infección de las neuronas motoras o células gliales y la expresión del gen en las neuronas motoras o células gliales, en donde dicho vector AAV es un vector AAV de cadena doble auto-complementario.
- 10
- Punto 4. El uso de un vector AAV para la fabricación de un medicamento para producir una proteína terapéutica o ARN en las neuronas motoras de un sujeto mediante inyección periférica de dicho vector, en donde dicho vector AAV es un vector AAV de cadena doble auto-complementario.
- 15
- Punto 5. El uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en donde dicha inyección periférica comprende inyección intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.) o intravenosa (i.v.), preferiblemente inyección intravenosa.
- Punto 6. El uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en donde dicho vector AAV es un vector AAV de serotipo humano, preferiblemente seleccionado de los serotipos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11, más preferiblemente de AAV6, AAV8 y AAV9, lo más preferiblemente de AAV9.
- 20
- Punto 7. El uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde el vector AAV es un vector AAV pseudotipado, preferiblemente un vector AAV2/9.
- Punto 8. El uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 7, en donde el vector AAV comprende un genoma de AAV con defecto de replicación que carece de secuencias víricas codificadoras Rep y Cap.
- 25
- Punto 9. El uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 8, en donde el vector AAV es un scAAV9 que puede estar pseudotipado.
- Punto 10. El uso de uno cualquiera de los puntos precedentes, en donde el gen codifica un ARN terapéutico, o una proteína terapéutica seleccionada entre factores de crecimiento, citocinas, hormonas, neurotransmisores, enzimas, factores anti-apoptóticos, factores angiogénicos, cualquier proteína conocida por estar mutada en trastornos patológicos tal como la proteína de "supervivencia de neuronas motoras" (SMN).
- 30
- Punto 11. El uso de uno cualquiera de los puntos precedentes, en donde el trastorno se selecciona entre enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neuromusculares, dolor, enfermedades lisosomales, trauma, lesiones de médula ósea, cánceres del sistema nervioso, enfermedades desmielinizantes, enfermedades autoinmunes del sistema nervioso, síndromes neurotóxicos, trastornos del sueño.
- 35
- Punto 12. El uso de uno cualquiera de los puntos precedentes, en donde la expresión de la proteína terapéutica en el vector está controlada por un promotor ubicuo, regulado y/o específico de tejido

**REIVINDICACIONES**

- 5 **1.** Un vector AAV humano de cadena sencilla (ssAAV) que comprende un gen de interés que codifica un producto terapéutico, para uso en un método para tratar un trastorno de neuronas motoras en un sujeto mediante la administración del gen a las neuronas motoras o células gliales mediante administración periférica de dicho vector ssAAV a un sujeto que lo necesite;
- en donde dicho vector ssAAV es:
- un vector AAV9 de cadena sencilla, o
  - un vector AAV pseudotipado que comprende un genoma de AAV de cadena sencilla derivado de un serotipo de AAV diferente del serotipo AAV9 y una cápsida derivada de una cápsida de AAV9.
- 10 **2.** El vector ssAAV humano para uso según la reivindicación 1, en donde dicha administración periférica causa la infección de las neuronas motoras o células gliales y la expresión del gen en las neuronas motoras o células gliales.
- 3.** El vector ssAAV humano para uso según la reivindicación 1, en donde el gen de interés codifica una proteína terapéutica o ARN.
- 15 **4.** El vector ssAAV humano para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha inyección periférica comprende inyección intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.) o intravenosa (i.v.), preferiblemente inyección intravenosa.
- 5.** El vector ssAAV humano para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha inyección periférica es inyección intravenosa (i.v.).
- 20 **6.** El vector ssAAV humano para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el vector ssAAV es un vector AAV pseudotipado.
- 7.** El vector ssAAV humano para uso según la reivindicación 6, en donde el vector comprende un genoma derivado de AAV2 en una cápsida derivada de AAV9.
- 8.** El vector ssAAV humano para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el vector AAV comprende un genoma AAV con defecto de replicación que carece de secuencias víricas codificadoras Rep y Cap.
- 25 **9.** El vector ssAAV humano para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el gen de interés codifica un ARN terapéutico, o una proteína terapéutica seleccionada entre factores de crecimiento, citocinas, hormonas, neurotransmisores, enzimas, factores anti-apoptóticos, factores angiogénicos, cualquier proteína conocida por estar mutada en trastornos patológicos tal como la proteína de “supervivencia de neuronas motoras” (SMN).
- 30 **10.** El vector ssAAV humano para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el trastorno de neuronas motoras se selecciona entre enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neuromusculares, dolor, enfermedades lisosomales, trauma, lesiones de médula ósea, cánceres del sistema nervioso, enfermedades desmielinizantes, enfermedades autoinmunes del sistema nervioso, síndromes neurotóxicos, trastornos del sueño.
- 35 **11.** El vector ssAAV humano para uso según la reivindicación 10, en donde el gen de interés codifica la proteína SMN y el trastorno es atrofia muscular espinal (AME).
- 12.** El vector ssAAV humano para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la expresión de la proteína terapéutica en el vector está controlada por un promotor ubicuo, regulado y/o específico de tejido.
- 40 **13.** El vector ssAAV humano para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el gen está ligado operativamente a un promotor específico o funcional en neuronas motoras.
- 14.** El vector ssAAV humano para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dichas neuronas motoras o células gliales son neuronas motoras de la médula espinal o células gliales de la médula espinal.

45



**Figura 1**

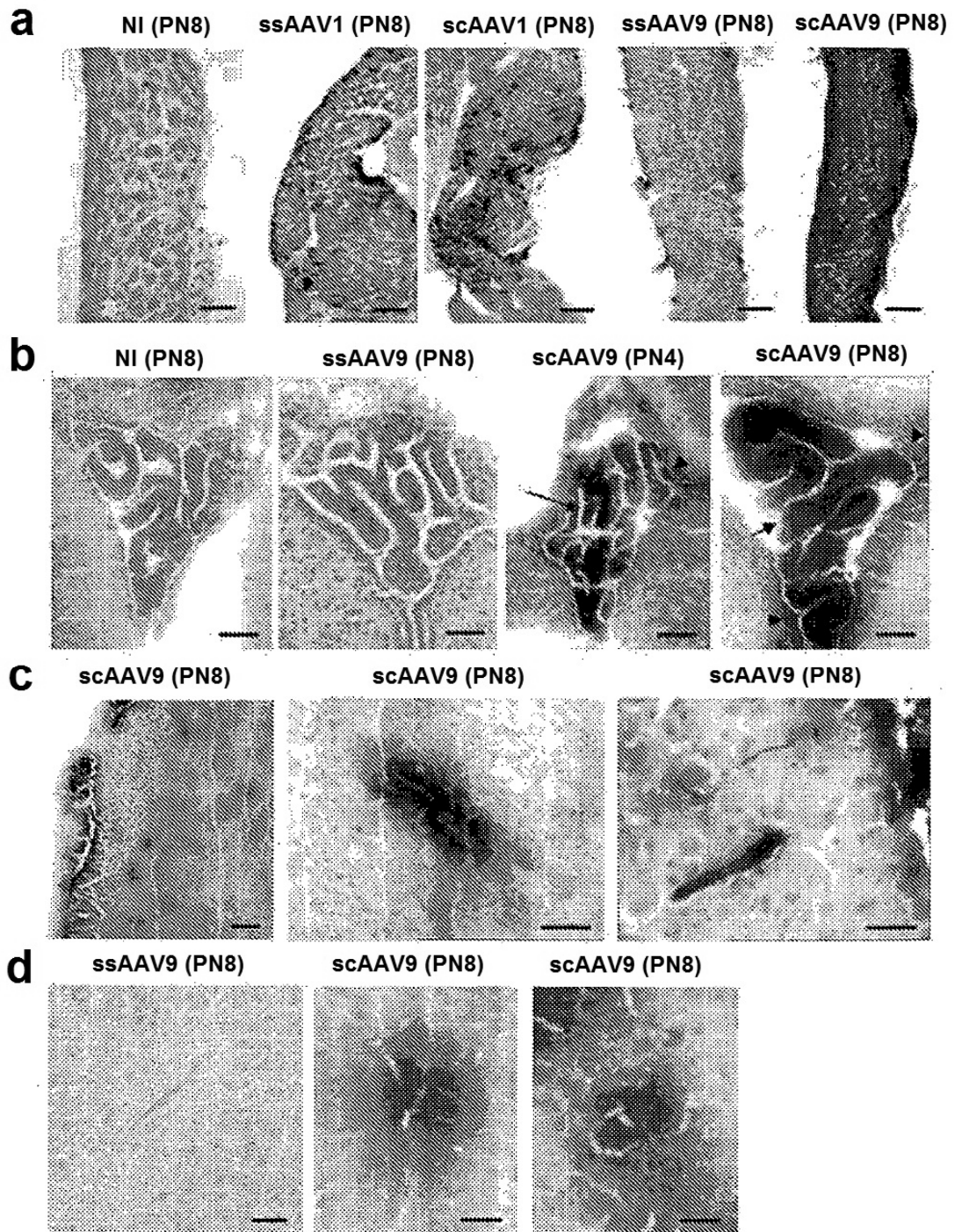


Figura 2



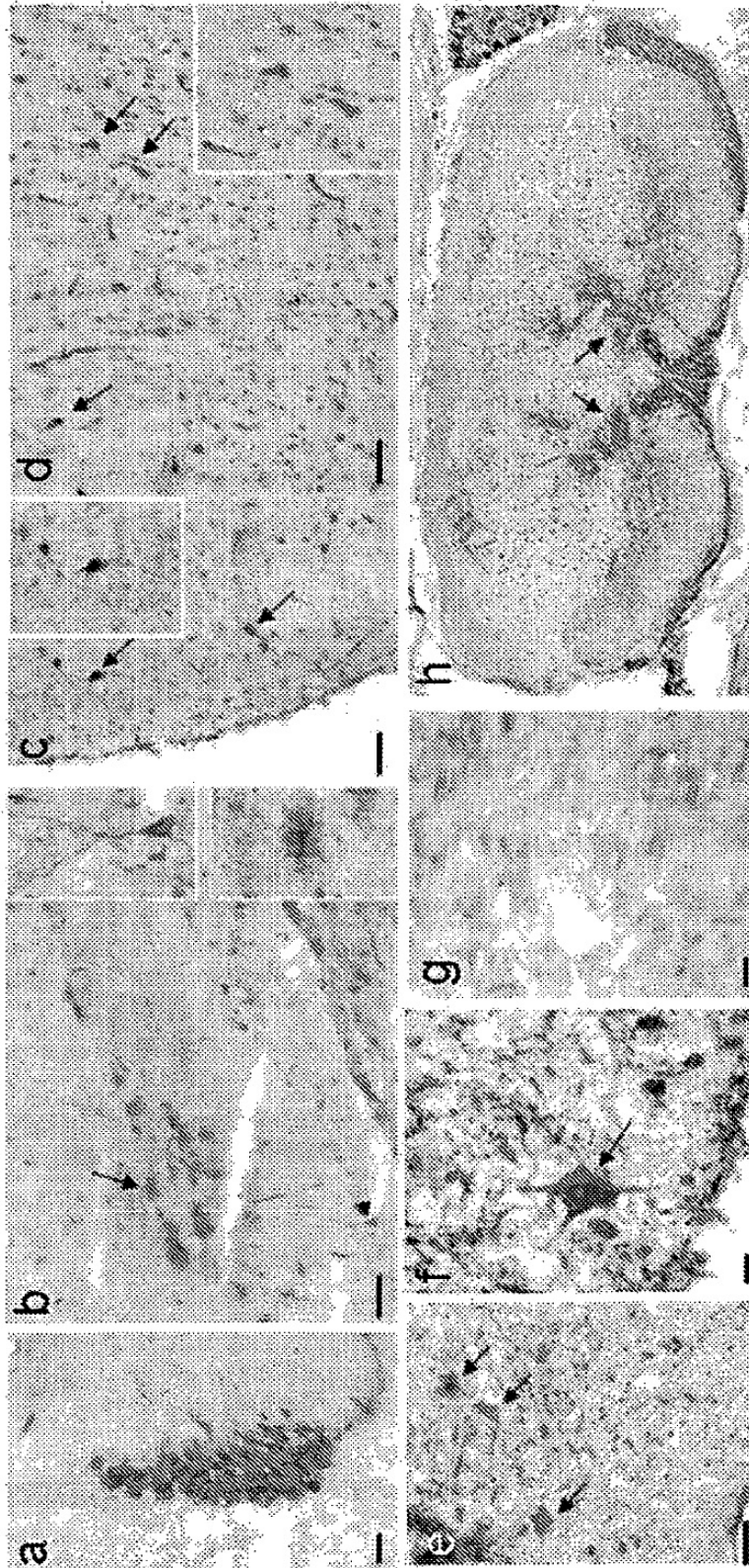


Figura 3

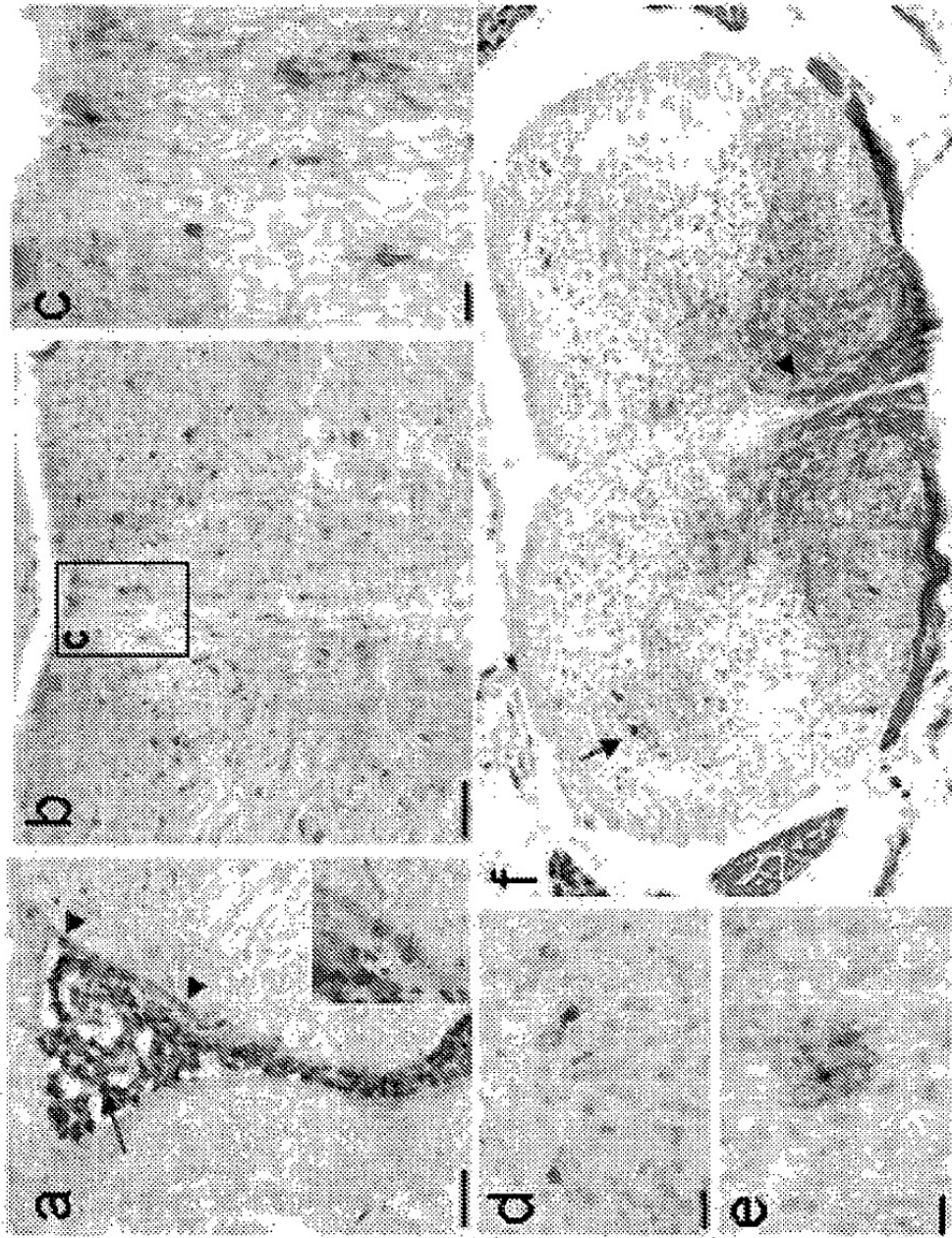
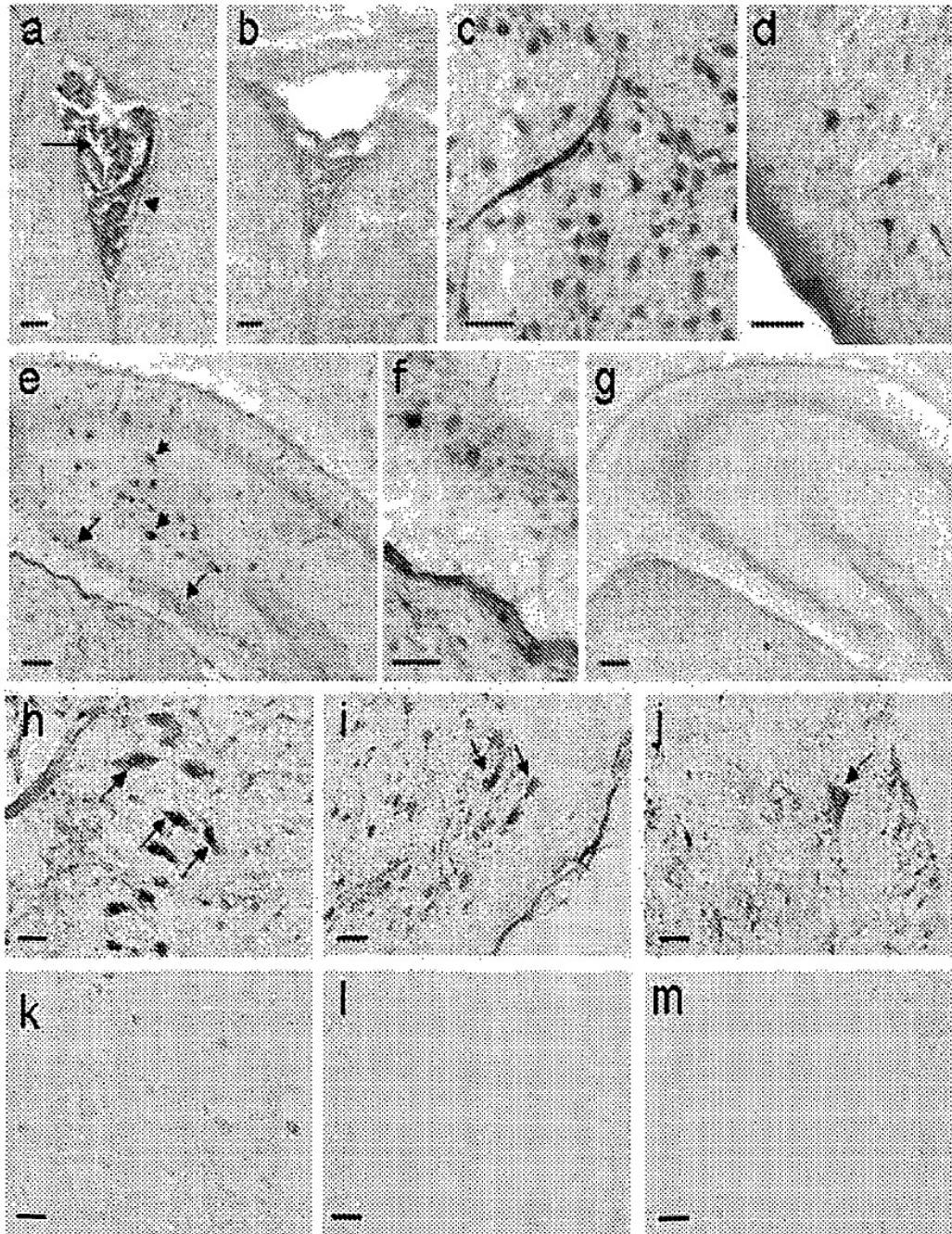


Figura 4



**Figura 5**



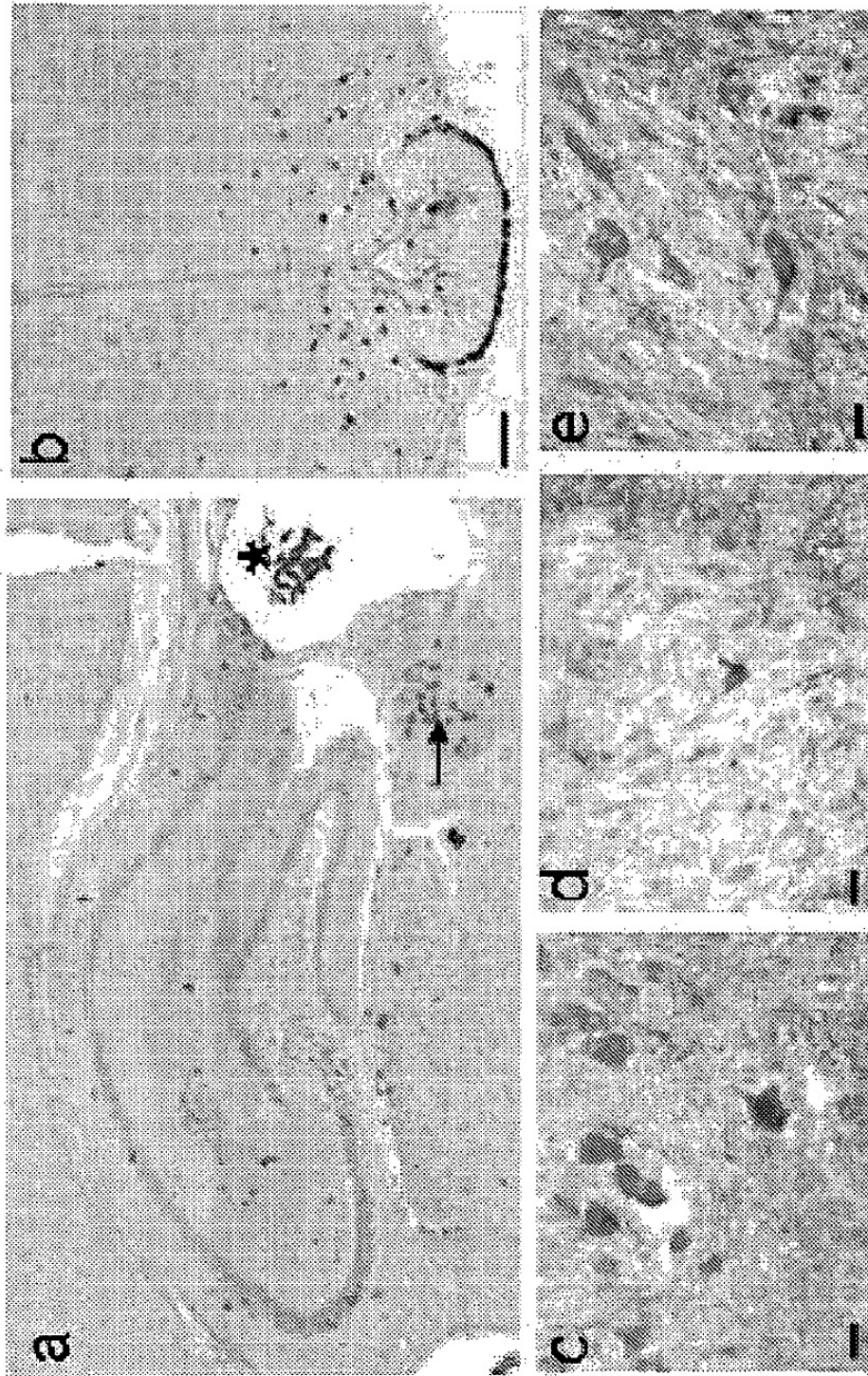


Figura 6

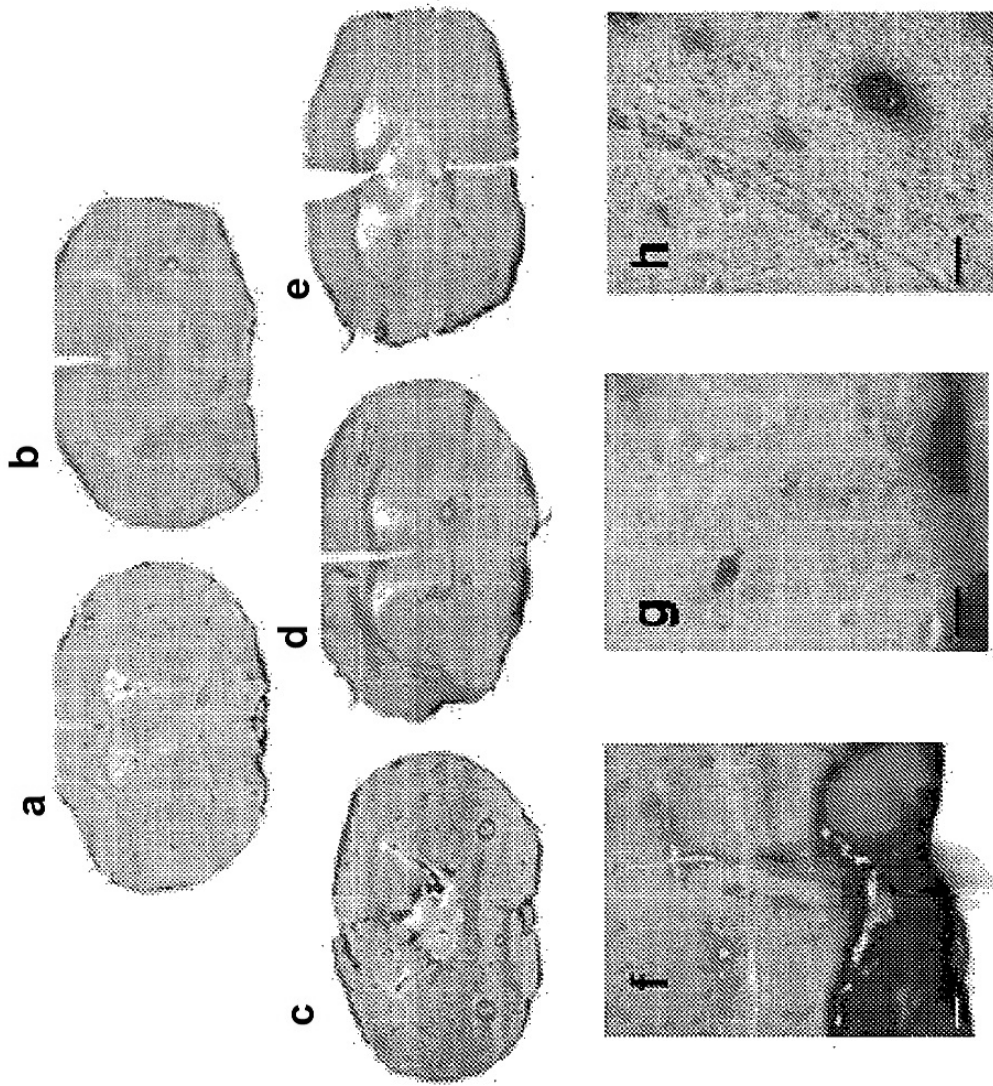


Figura 7

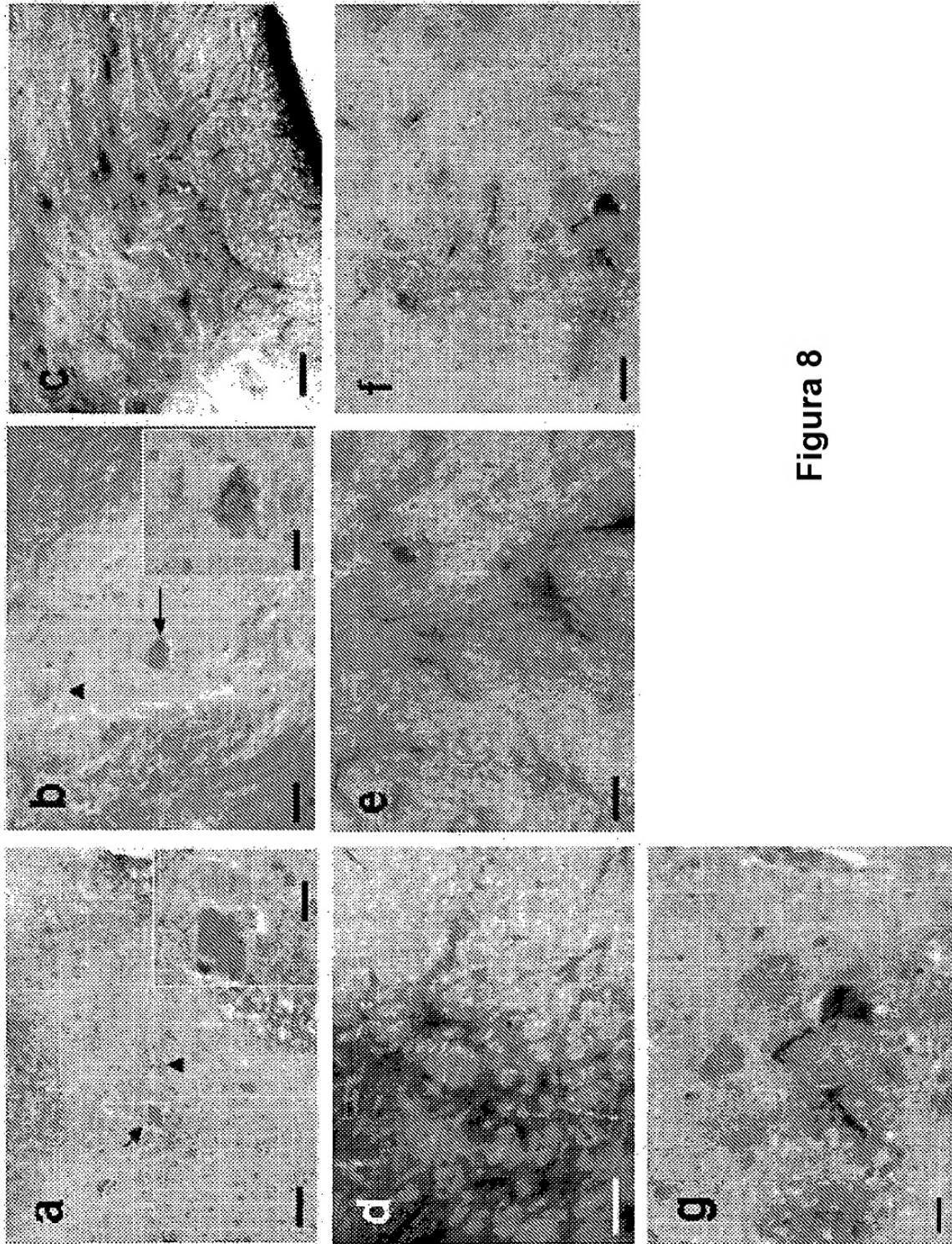


Figura 8



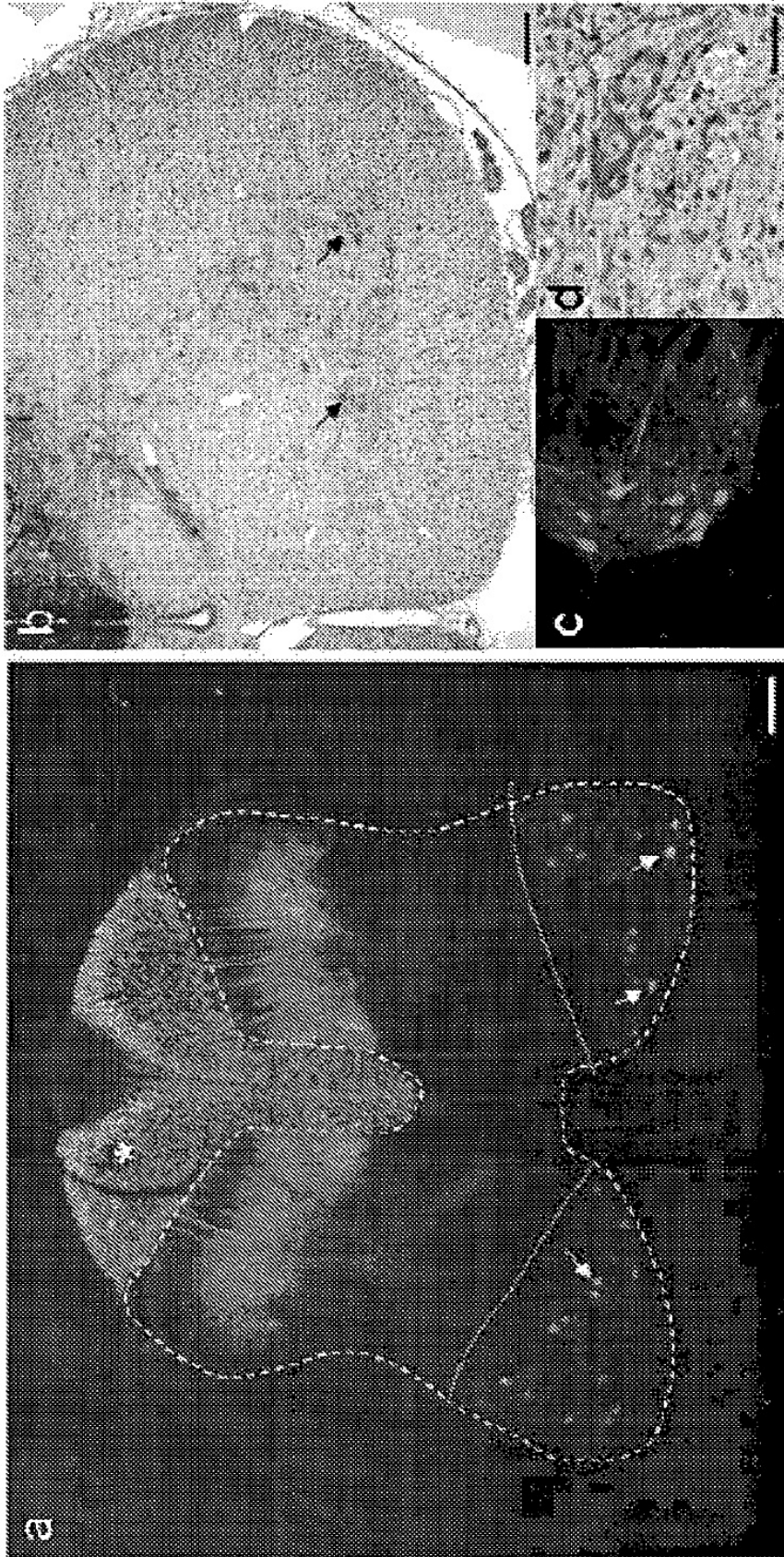


Figura 9

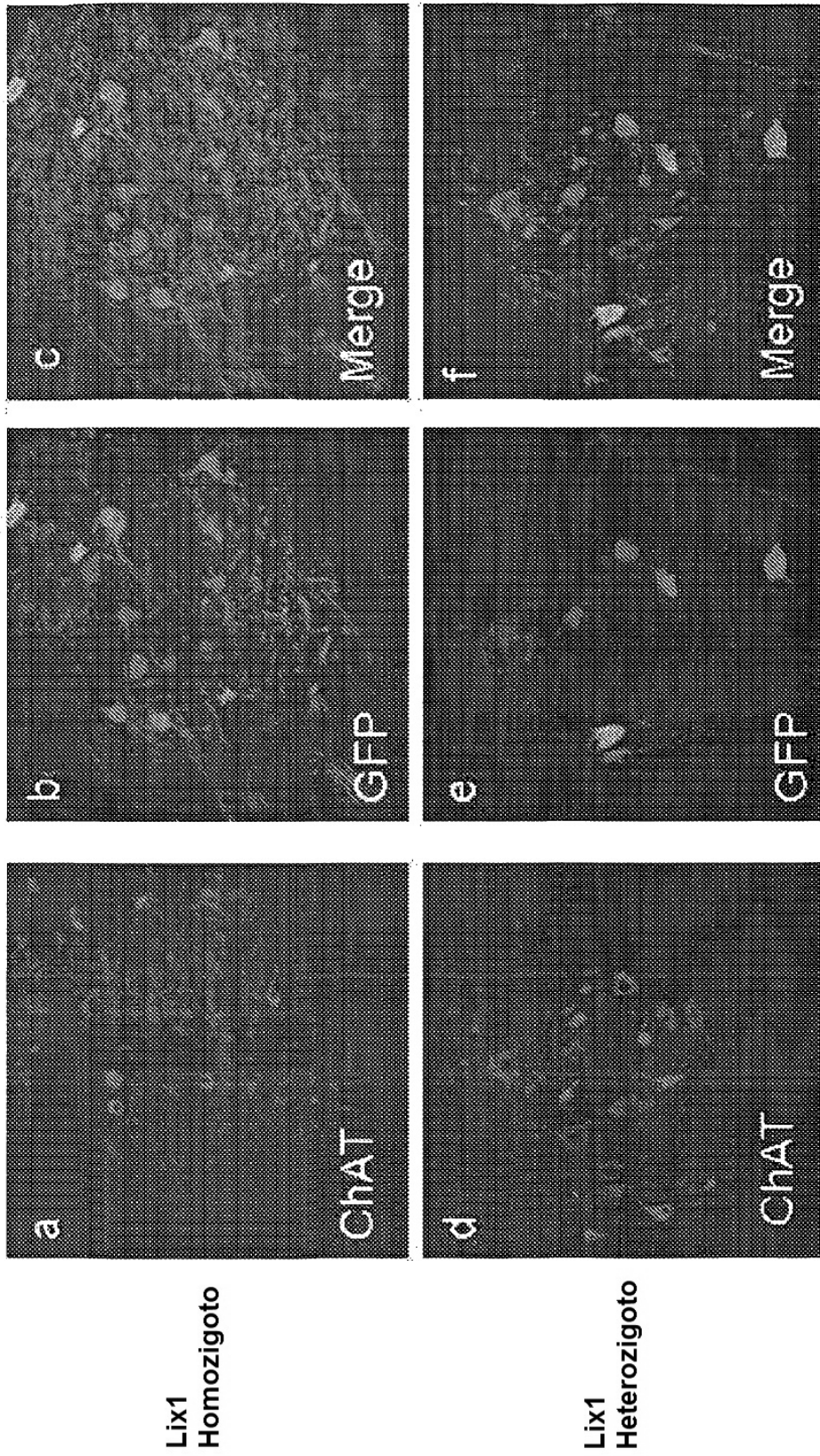


Figura 10



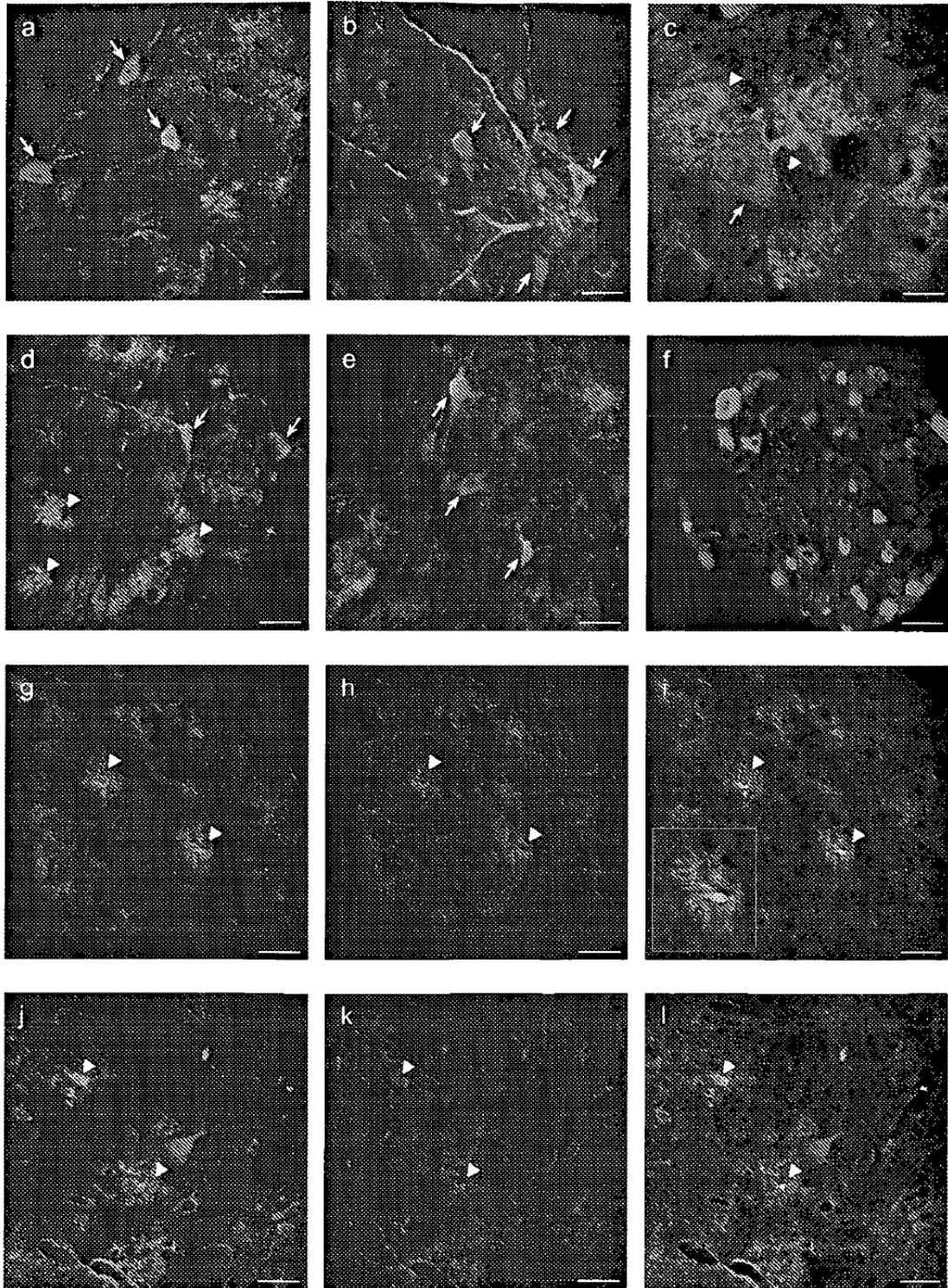


Figura 11