

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 725**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**C12N 15/864** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2016 PCT/US2016/026524**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016 WO16164642**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2016 E 16717228 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 3280451**

54 Título: **Terapia génica viral como tratamiento para una enfermedad o un trastorno por almacenamiento de colesterol**

30 Prioridad:

**08.04.2015 US 201562144702 P**

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

**23.04.2020**

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS  
REPRESENTED BY THE SECRETARY,  
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN  
SERVICES (100.0%)**

**Office of Technology Transfer, National Institutes  
of Health, 6011 Executive Boulevard, Suite 325,  
MSC 7660, Bethesda  
Maryland 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

**VENDITTI, CHARLES, P.;**  
**PAVAN, WILLIAM, J. y**  
**CHANDLER, RANDY**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 755 725 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 viral como tratamiento para una enfermedad o un trastorno por almacenamiento de colesterol

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º de serie 62/144.702, presentada el 8 de abril de 2015, y titulada VIRAL GENE THERAPY AS TREATMENT FOR CHOLESTEROL STORAGE DISEASE OR DISORDER.

10

**Financiación gubernamental**

La investigación que respalda esta solicitud se llevó a cabo por los Estados Unidos de América representados por el secretario del Departamento de Salud y Servicios Humanos.

15

**Antecedentes de la invención**

La enfermedad de Niemann-Pick, tipo C (NPC) es una enfermedad neurodegenerativa, recesiva autosómica, rara y mortal que puede presentarse en lactantes, niños o adultos. Su incidencia en personas de ascendencia de Europa occidental es de 1/90.000 (Wassif CA *et al.*, "High incidence of unrecognized visceral/neurological late-onset Niemann-Pick disease, type C1, predicted by analysis of massively parallel sequencing data sets," *Genet Med.* 12 de marzo de 2015). Aproximadamente el 95% de pacientes con NPC tienen mutaciones en *NPC1*, un gen implicado en tráfico intracelular de colesterol. La mutación de *NPC1* produce la acumulación intracelular de colesterol no esterificado en estructuras endosómicas/lisosómicas tardías y una marcada acumulación de glicoesfingolípidos, especialmente en el tejido neuronal. Por tanto, los pacientes con NPC se presentan generalmente con hepatoesplenomegalia (aumento del tamaño del hígado y bazo) y degeneración neurológica.

20

25

Un síndrome prenatal de hidropesía fetal no inmunitario puede ser el primer síntoma de la enfermedad de NPC. Los neonatos pueden presentar una enfermedad hepática grave por infiltración del hígado y/o insuficiencia respiratoria. Otros lactantes, sin enfermedad hepática o pulmonar, tienen hipotonía y retraso del desarrollo neurológico. La presentación clásica se produce en la fase media a tardía de la infancia con la aparición gradual de ataxia, parálisis de la mirada supranuclear vertical (VSGP) y demencia. La regresión es habitual. Las convulsiones son frecuentes y los síntomas neurológicos se vuelven incapacitantes, haciendo imposible la alimentación oral; la muerte se produce habitualmente al final de la segunda o tercera década por neumonía por aspiración. Los adultos pueden verse afectados de manera más leve y es más probable que presenten demencia o síntomas psiquiátricos. No existen tratamientos probados para la NPC, y después del diagnóstico, es inevitable la neurodegeneración mortal. El hecho de que la mayoría de los pacientes tengan la aparición de la enfermedad en la infancia hace que la búsqueda de terapias eficaces sea urgente.

30

35

El diagnóstico de la enfermedad de NPC se confirma mediante una prueba bioquímica especializada que demuestra el almacenamiento de colesterol y se detecta mediante tinción con filipina en fibroblastos cultivados. La mayoría de los individuos con la enfermedad de NPC tienen NPC tipo 1, producida por mutaciones en *NPC1*; menos de 20 individuos se han diagnosticado con NPC tipo 2, producida por mutaciones en *NPC2*. La prueba genética molecular de *NPC1* y *NPC2* detecta mutaciones que producen la enfermedad en aproximadamente el 94% de los individuos con enfermedad de NPC, mayoría de los cuales tienen mutaciones en *NPC1*. Independientemente del locus y el/los alelo(s), la enfermedad de NPC es un estado metabólico recesivo y las mutaciones son la pérdida de función o la reducción de función. Por tanto, la proporción y expresión de una copia única del gen de tipo natural puede restablecer de manera completa la función enzimática de *NPC1* ó 2.

40

45

Una serie de estudios de referencia realizados por el grupo de investigación del Dr. William Pavan del NHGR1/NIH condujeron a la identificación tanto de genes de ratón como humanos para *NPC1* (Loftus *et al.* *Science* 277: 232-35; Carstea *et al.* *Science* 277: 228-31). Se ha descrito y caracterizado de manera extensiva un modelo murino de NPC, *Npc<sup>nih</sup>* (también denominado BALB/cNctr-Npc1<sup>miNIJ</sup>), que surge de una mutación espontánea del marco de lectura en el gen *NPC1* durante estos esfuerzos de investigación (Loftus *et al.* *Science* 277: 232-35). Los homocigotos de *Npc<sup>nih</sup>* tienen una enfermedad temprana, grave y que progresa rápidamente, que se caracteriza por pérdida de peso, ataxia y letalidad a las 9 semanas de edad. La mutación portada por este ratón es nula, y los ratones homocigotos *Npc<sup>nih</sup>* no pueden producir la proteína Npcl o ARNm. Este modelo animal también presenta síntomas neurológicos y letalidad temprana: los ratones homocigotos *Npc<sup>nih</sup>* empiezan de manera uniforme a perder peso a las 6 semanas de edad y no sobreviven más de 9 semanas. Por tanto, estos animales representan un modelo ideal de enfermedad de NPC humana producida por mutaciones de pérdida de función en el gen *NPC1*.

50

55

60

A lo largo de los años, se han generado otros modelos de ratón de enfermedad de NPC, específicamente producida por mutaciones naturales o modificadas por ingenierías variadas en el gen *Npc1* de ratón, pero presentan un fenotipo de la enfermedad menos grave. Todos los modelos de ratón de enfermedad de NPC producida por una mutación u otro mal funcionamiento del gen *Npc1* en cualquier cepa de ratón puede tratarse mediante el vector y los derivados que se describen en el presente documento y quedan abarcados en dichas reivindicaciones. Tales

65

modelos, como un grupo que incluye animales homocigotos *Npc<sup>nh</sup>*, se consideran generalmente *Npc<sup>-/-</sup>* que designan alelos de pérdida de función de *Npc* homocigotos, de los que *Npc<sup>nh</sup>* es paradigmático.

5 A pesar del desarrollo de tales modelos de ratón, no existe aún una terapia curativa para la NPC. Es necesaria de manera urgente en la técnica una estrategia o metodología para tratar de manera clínica la NPC y/o proporcionar una terapia curativa para la NPC y/o sus síntomas. La presente invención satisface una necesidad de este tipo.

### Sumario de la invención

10 La presente invención proporciona, por primera vez, constructos de terapia génica que comprenden una molécula terapéutica de ácido nucleico humano que puede corregir el defecto celular característico de determinados trastornos o enfermedades por almacenamiento de colesterol, tales como, enfermedad de Niemann-Pick tipo C (“NPC”), cuando la molécula terapéutica de ácido nucleico humano está bajo el control de un promotor específico de tejido, incluyendo, el promotor constitutivo del factor de elongación 1 alfa (EF1 $\alpha$ ). Los inventores contemplan el uso  
15 de estos constructos de vectores para la terapia génica de determinados trastornos o enfermedades por almacenamiento de colesterol, incluyendo la NPC. Los ejemplos que se proporcionan demuestran la reducción de la práctica y la eficacia de la presente invención en el modelo animal más establecido y bien caracterizado de la NPC.

Más en particular, la invención proporciona composiciones y métodos para tratar o prevenir trastornos o enfermedades por almacenamiento de colesterol. En determinados aspectos, la presente invención proporciona composiciones y métodos para tratar o prevenir la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C. En determinadas realizaciones, la invención se refiere a composiciones y métodos para tratar o prevenir trastornos o enfermedades por almacenamiento de colesterol que se caracterizan por o se asocian con un riesgo de la disminución de la función del sistema nervioso central (SNC), incluyendo la NPC. En todavía otras realizaciones, la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican para transgenes terapéuticos, por ejemplo, *NPC1* o *NPC2*, que pueden restablecer la función perdida de uno o más genes defectuosos o productos polipeptídicos de los mismos, por ejemplo, un gen *NPC1* o *NPC2* mutante. En aún otras realizaciones, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para administrar cantidades terapéuticamente eficaces de las moléculas de ácido nucleico de la invención. En todavía realizaciones adicionales, la presente invención se refiere a métodos para diagnosticar la NPC y/o monitorizar el progreso del tratamiento de terapia génica de la NPC monitorizando la expresión y/o función de un gen terapéutico, por ejemplo, *NPC1* o *NPC2*.

La presente invención, en todavía otras realizaciones, se refiere a métodos de terapia génica que implican la administración en una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico que comprende un trasgén terapéutico, por ejemplo, *NPC1* o *NPC2*, para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno por almacenamiento de colesterol, incluyendo la NPC. En todavía otras realizaciones, la presente invención se refiere a métodos de terapia génica que implican la administración, en una cantidad eficaz, de un vector de expresión que codifica para *NPC1* o *NPC2* para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno por almacenamiento de colesterol, incluyendo la enfermedad de NPC. En aún otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico y/o el vector de expresión puede administrarse de manera selectiva a un sitio o tejido diana, por ejemplo, el sistema nervioso central.

En determinadas realizaciones las moléculas de ácido nucleico o constructos de terapia génica comprenden uno o más transgenes terapéuticos, por ejemplo, *NPC1* o *NPC2*, que están bajo el control del promotor constitutivo de EF1 $\alpha$  (“factor de elongación 1 alfa humano”). En otras realizaciones el promotor es una variante truncada novedosa del EF1 $\alpha$  (*miniEF1 $\alpha$* ).

La presente invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico específicas que comprenden un trasgén terapéutico, por ejemplo, *NPC1* o *NPC2*, bajo el control transcripcional de un promotor que puede expresarse en el SNC, incluyendo un promotor de calmodulina neuronal específico o un promotor constitutivo del *miniEF1 $\alpha$* . La invención también contempla que tales constructos de ácido nucleico puedan modificarse mediante ingeniería para dar cualquier vector de terapia génica adecuado, tal como un vector de virus adeno-asociado (VAA), retrovirus, lentivirus, o adenovirus, ácido nucleico tal como ADN de plásmido, ácidos nucleicos peptídicos o ARNm, incluyendo los ARNm que contienen bases modificadas para potenciar la expresión *in vivo*. Todas las formas de ácidos nucleicos pueden administrarse sin modificación adicional, tal como ADN desnudo, o empaquetado en nanopartículas o nanopartículas lipídicas y se administran de una forma apropiada para producir la expresión de NPC1 o 2. En una realización particular, el vector de terapia génica previo es un VAA.

A través de la manipulación de las secuencias de nucleótidos proporcionadas por esta invención mediante técnicas de biología molecular convencionales, pueden producirse variantes de las proteínas NPC1 y NPC2 que difieren en una secuencia de aminoácidos precisa en comparación con las proteínas dadas a conocer que aún mantienen las características funcionales básicas de las proteínas NPC1 y NPC2 dadas a conocer o que se seleccionan para diferir en algunas características en comparación con estas proteínas. Tales variantes son otro aspecto de la presente invención ya que también pueden administrarse usando los vectores de terapia génica y promotores constitutivos (por ejemplo, EF1 $\alpha$  o *miniEF1 $\alpha$* ) de la invención.

65

En otra realización, los vectores descritos en el presente documento pueden modificarse para codificar para versiones de las proteínas NPC1 y NPC2 que se han sometido a optimización de codones para la expresión en un sujeto de prueba, tal como un ratón o un gato o un ser humano, o para su uso en pacientes con la enfermedad de NPC.

5 Lo anterior y otras características y ventajas de la invención resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos. Los expertos en la técnica apreciarán que la utilidad de esta invención no se limita a los modos y materiales experimentales específicos descritos en el presente documento.

10 En una realización preferida, la presente invención se refiere a un constructo de ácido nucleico que comprende: (1) una secuencia del vector viral; y (2) una secuencia de gen *NPC1* bajo el control de un promotor del mini factor de elongación 1  $\alpha$  (*miniEF1 $\alpha$*  corto).

El vector viral puede ser un vector viral adeno-asociado (VAA).

15 El constructo de ácido nucleico puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 7.

20 El constructo de ácido nucleico puede usarse para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno por almacenamiento de colesterol en un sujeto, comprendiendo dicho método: administrar un constructo de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un portador viral farmacéuticamente aceptable a un sujeto, tratando o previniendo de ese modo la enfermedad o el trastorno por almacenamiento de colesterol en dicho sujeto.

La enfermedad o el trastorno por almacenamiento de colesterol puede ser la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C.

25 El sujeto puede ser un ratón u otro animal, por ejemplo, un animal de experimentación. El animal puede ser un ratón deficiente en *Npc1*.

El sujeto también puede ser un ser humano, que tiene o está en riesgo de tener la NPC.

30 El constructo de ácido nucleico puede encapsidarse con una cápsida de VAA de serotipo 9.

La concentración del constructo de ácido nucleico en la composición de constructo de ácido nucleico-portador viral puede ser de  $5 \times 10^{12}$  cg/ml o mayor ("copia genómica" por ml).

35 El portador viral farmacéuticamente aceptable puede ser VAA.

El VAA puede seleccionarse del grupo que consiste en VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAArh8, VAArh10, VAArh33, VAArh34, VAA Anc80 o VAA PHP.B.

40 El portador viral farmacéuticamente aceptable puede comprender una cápsida viral seleccionada del grupo que consiste en cápsida viral de VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAArh8, VAArh10, VAArh33, VAArh34, VAA Anc80 o VAA PHP.B.

45 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para tratar la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C en un sujeto mediante terapia génica que comprende administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del constructo de terapia génica que comprende (1) una secuencia del vector viral; y (2) una secuencia de gen *NPC1* bajo el control de un promotor del mini factor de elongación 1  $\alpha$  (*miniEF1 $\alpha$* ) y un portador farmacéuticamente aceptable.

50 El vector viral puede ser un vector viral adeno-asociado (VAA).

El constructo de terapia génica puede comprender SEQ ID NO: 7 (pVAA-*miniEF1 $\alpha$* -NPC1-RBG).

55 El sujeto puede ser un ratón u otro animal, por ejemplo, un animal de experimentación. El animal puede ser un ratón deficiente en *Npc1*.

El sujeto también puede ser un ser humano, que tiene o está en riesgo de tener la NPC.

60 El constructo de terapia génica puede encapsidarse con una cápsida de VAA de serotipo 9.

La composición puede comprender el constructo de terapia génica a una concentración de  $5 \times 10^{12}$  cg/ml o mayor.

65 La secuencia del vector viral puede ser VAA, que puede seleccionarse del grupo que consiste en VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAArh8, VAArh10, VAArh33, VAArh34, VAA Anc80 o VAA PHP.B.

El constructo de terapia génica puede comprender una cápsida viral seleccionada del grupo que consiste en una cápsida viral de VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAArh8, VAArh10, VAArh33, VAArh34, VAA Anc80 o VAA PHP.B.

- 5 Otros aspectos de la invención se describen en, o son obvios a partir de, la siguiente divulgación, y se encuentran dentro del ámbito de la invención.

#### Breve descripción de los dibujos

- 10 La siguiente descripción detallada, dada a modo de ejemplo, pero que no pretende limitar la invención solamente a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse mejor junto con los dibujos adjuntos. Ahora se hará referencia, a modo de ejemplo, a los dibujos adjuntos que muestran realizaciones de los ejemplos de la presente solicitud.

- 15 La figura 1 muestra un mapa del plásmido de *mini*calmodulina-NPC (pVAA.*mini*CaMKII NPC1.RBG) tal como se da a conocer en el presente documento para la administración mediada por VAA en VAA-*mini*calmodulina-NPC.

La figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos de VAA. *mini*CaMKII NPC1.RBG (SEQ ID NO: 1).

- 20 La figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos de la repetición terminal invertida en el extremo 5' (ITR en el extremo 5') de VAA.*mini*CaMKII NPC1.RBG (SEQ ID NO: 2).

La figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos del promotor de CaMKII (promotor de *mini*calmodulina) de VAA.*mini*CaMKII NPC1.RBG (SEQ ID NO: 3).

- 25 La figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc de *NPC1h* de VAA.*mini*CaMKII NPC1.RBG (SEQ ID NO: 4).

- 30 La figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos de la poli A de inmunoglobulina de conejo de VAA.*mini*CaMKII NPC1.RBG (SEQ ID NO: 5).

La figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos de la repetición terminal invertida en el extremo 3' (ITR en el extremo 3') de VAA.*mini*CaMKII NPC1.RBG (SEQ ID NO: 6).

- 35 La figura 8 muestra la supervivencia en ratones homocigotos *Npc<sup>nh</sup>* (n=10) después de ningún tratamiento (líneas rayadas negras), tratamiento con un vector indicador de VAA2/9.*mini*CaMKII eGFP.RBG (n=6) (línea verde) o tratamiento con VAA2/9.*mini*CaMKII NPC1.RBG (n=9) (línea azul).

- 40 Figura 9. Mapa de VAA-*mini*EF1 $\alpha$ -NPC1 que muestra importantes elementos del vector. El promotor de longitud completa del EFla se truncó (naranja) y se sometió a prueba para determinar la capacidad para impulsar la expresión de eGFP en un experimento de transfección usando células 293T (no presentadas). Luego se introdujo el fragmento de promotor en un vector de VAA frente al ADNc de NPC1 humano de longitud completa (azul), seguido por una señal de poli A de inmunoglobulina beta de conejo, y flanqueado por repeticiones terminales invertidas de VAA2 (ITR), mostradas en amarillo. El vector resultante se empaquetó en un VAA usando una cápsida de serotipo 9 para crear VAA2/9-*mini*EF1 $\alpha$ -NPC1 o VAA9-*mini*EF1 $\alpha$ -NPC1.

La figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos de VAA-*mini*EF1 $\alpha$ -NPC. (SEQ ID NO: 7)

- 50 La figura 11 muestra la secuencia de nucleótidos del promotor del *mini*EF1 $\alpha$  de VAA2/9-*mini*EF1 $\alpha$ -NPC. (SEQ ID NO: 8)

Figura 12. N.º de registro de GenBank BC063302 (enfermedad de Niemann-Pick, tipo C1 de *Homo sapiens*, ARNm (clon de ADNc), que proporciona la secuencia de polipéptido NPC1. (SEQ ID NO: 9).

- 55 Figura 13. N.º de registro de GenBank BC063302 (enfermedad de Niemann-Pick, tipo C1 de *Homo sapiens*, ARNm (clon de ADNc), que proporciona la secuencia codificante del ADNc de NPC1. (SEQ ID NO: 10).

Figura 14. N.º de registro de GenBank BC002532 (enfermedad de Niemann-Pick, tipo C2 de *Homo Sapiens*, ARNm (clon de ADNc), que proporciona la secuencia de aminoácidos de polipéptido NPC2 (SEQ ID NO: 11).

- 60 Figura 15. N.º de registro de GenBank BC002532 (enfermedad de Niemann-Pick, tipo C2 de *Homo Sapiens*, ARNm (clon de ADNc), que proporciona la secuencia de nucleótidos del ADNc de NPC2 (SEQ ID NO: 12).

- 65 La figura 16 (A-G) muestra la distribución neuronal de GFP en el cerebro de ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* después de la inyección retroorbitaria de VAA2/9-*mini*CaMKII-GFP. (a) Extracto del Allen Brain Atlas, que demuestra el patrón de expresión neuronal de CaMKII en el cerebro de ratones de tipo natural. (b) Inmunofluorescencia de VAA9-*mini*CaMKII-GFP

(verde) en el cerebro de *Npc1*<sup>-/-</sup> después de la inyección retroorbitaria, (c-g) localización conjunta de la señal de GFP con inmunofluorescencia con NeuN (rojo), que indica la incorporación de VAA2/9-miniCaMKII-GFP en poblaciones neuronales, incluyendo neuronas piramidales corticales (d, verde eliminado en e para mostrar el doble marcado, puntas de flecha) y CA3 neuronas hipocámpicas (f, verde eliminado en g para mostrar el doble marcado, puntas de flecha).

La figura 17 (A-D) muestra la supervivencia de ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> que sigue a los tratamientos con VAA9. (a) La curva de Kaplan-Meier representa la supervivencia de: crías de *Npc1*<sup>-/-</sup> (*n*=6) tratadas con 2x10<sup>11</sup> CG de VAA2/9-miniCaMKII-NPC1 entre 1 y 3 días, ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> (*n*=9) tratados con 1x10<sup>12</sup> CG de VAA2/9-miniCaMKII-NPC1 entre 20 y 25 días de vida, ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> (*n*=6) tratados con 1x10<sup>12</sup> CG de VAA2/9-miniCaMKII-GFP entre 20 y 25 días de vida y ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> no tratados (*n*=16). (b) Los datos de supervivencia se representaron como un gráfico de dispersión vertical para mostrar la distribución de supervivencia. (c) Semana a la que los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> alcanzaron el peso máximo. (d) Porcentaje de cambio de peso entre las semanas 6 y 9. \*\* *P*<0,01, \*\*\**P*<0,001, prueba de rangos logarítmicos (Mantel Cox) o prueba de la *t* bilateral.

La figura 18 (A-V) muestra el efecto del tratamiento con VAA2/9-miniCaMKII-NPC1 en la CA3 del hipocampo y la capa V de la neocorteza de ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> ratones. (a-r) Inmunohistoquímica que obtiene imágenes de niveles de proteína *Npc1* o NPC1 (rojo) en el hipocampo y la capa V de la neocorteza, teñidas conjuntamente con NeuN (verde) y filipina (azul), (a-f) expresión endógena de NPC1 en el ratón *Npc1*<sup>+/+</sup>, con tinción con NeuN eliminada en (b, d, f) para mostrar mejor la expresión neuronal de *Npc1* o NPC1 e imágenes aumentadas de la capa V de la neocorteza (c-d) y la CA3 del hipocampo (e-f). (g-l) Niveles endógenos de proteína *Npc1* o NPC1 en el ratón *Npc1*<sup>-/-</sup>, con tinción con NeuN eliminada en (h, j, l) para mostrar mejor la carencia de expresión de *Npc1* o NPC1 y el alto nivel de inclusiones de filipina intracelular, con imágenes aumentadas de la capa V de la neocorteza (c-d) y la CA3 del hipocampo (e-f). (m-r) Niveles de proteína NPC1 en los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> inyectados con VAA2/9-miniCaMKII-NPC1. Tinción con NeuN eliminada en (n, p, r) para mostrar mejor la presencia de expresión de NPC1 en algunas neuronas y el nivel reducido de inclusiones de filipina intracelular, con imágenes aumentadas de la capa V de la neocorteza (o-p), y la CA3 del hipocampo (q-r). Cuantificación de filipina e intensidad de píxeles media de *Npc1* o NPC1 del soma neuronal en las neuronas neocorticales de la capa V (s-t) y neuronas hipocámpicas de la CA3 (u-v), datos expresados como la media ±E.E.M. U.A. = unidades arbitrarias. \* *p*<0,05, \*\* *p*<0,01, \*\*\*\* *p*<0,0001, ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey.

La figura 19 (A-N) muestra la corrección bioquímica del fenotipo de almacenamiento de colesterol en neuronas transducidas con VAA9-miniCaMKII-NPC1 en el ratón *Npc1*<sup>-/-</sup>. Inmunohistoquímica que obtiene imágenes de los niveles de proteína NPC1 (rojo) en el hipocampo (a-b) y la capa V de la neocorteza (e-f), teñidos conjuntamente con filipina (azul) y NeuN (verde, en a y e sólo). Las flechas indican neuronas sin proteína NPC1 apreciable y alta tinción con filipina. Las puntas de flecha indican neuronas infectadas de manera exitosa por el VAA9-miniCaMKII-NPC1 con fuerte tinción de NPC1 y marcado con filipina reducido, (c-d) la intensidad de NPC1 de todas las neuronas de la capa V medida, representada gráficamente contra la intensidad de filipina. (g-h) La intensidad de NPC1 de todas las neuronas hipocámpicas de CA3 medida, representada gráficamente contra la intensidad de filipina. Los cuadrantes superiores izquierdos en (d, h) indican el porcentaje de neuronas de *Npc1*<sup>-/-</sup> corregido con respecto a los niveles de control con tratamiento con VAA9-miniCaMKII-NPC1. Densidad de obtención de imágenes de la incorporación de VAA-miniCaMKII-GFP (i-j) y la incorporación de VAA9-miniCaMKII-NPC1 (k-l) en la corteza, capa V (i-k) y CA3 del hipocampo (j-l), con cuantificación en (m-n). n.s. = no significativa.

La figura 20 (A-F) muestra la muerte retrasada de células de Purkinje después del tratamiento con VAA2/9-miniCaMKII-NPC1 en ratones *Npc1*<sup>-/-</sup>. Tinción con calbindina inmunofluorescente de células de Purkinje (verde) en ratones *Npc1*<sup>+/+</sup> (a), *Npc1*<sup>-/-</sup> (b) y *Npc1*<sup>-/-</sup> (c) a las 9 semanas de edad (I-X = i.d. lobular cerebelosa en c). (d-f) Cuantificación del número de células de Purkinje en lóbulos posteriores del cerebelo. Todos los datos en los gráficos de barras expresados como media ±E.E.M., \* *p*<0,05, \*\* *p*<0,01, ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey.

Figura 21. Efecto del tratamiento con VAA2/9-miniEF1α-NPC1 sobre el peso de ratones *Npc1*<sup>-/-</sup>. Se inyectó a los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> de manera retroorbitaria en p24 con 1,21e12 CG de VAA9-EF1a-NPC1. La supervivencia y el aumento de peso se han monitorizado en serie desde la inyección. Obsérvese que algunos de los mutantes tratados alcanzaron un peso igual al de los compañeros de camada no afectados de tipo natural y de manera notable, tienen más del doble de supervivencia en comparación con los controles *Npc1*<sup>-/-</sup> (véanse la figura 2a y la figura 9). La cohorte de ratones en este estudio piloto está viva en el momento de esta actualización de PCT. Una comparación con ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> no tratados y \*\*tratados con VAA9-miniCaMKII-NPC1 se indica en la parte inferior de la figura.

La figura 22(A-B) muestra el efecto sobre el peso del tratamiento con VAA2/9-miniEF1α-NPC1 frente a VAA2/9-miniCaMKII-NPC1. Los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> no tratados o tratados con VAA se pesaron en serie y se compararon con los pesos previos (a) o la edad de peso máximo; \**p*<0,01 \*\*\* *p*<0,001 en comparación con los no tratados. (b). Los ratones tratados con VAA2/9-miniEF1α-NPC1 alcanzaron el peso máximo más tarde que los otros grupos, lo que demuestra que la terapia génica con VAA permiten que los ratones continúen aumentando de peso durante mucho más tiempo que los ratones no tratados o los que recibieron el vector de VAA2/9-miniCaMKII-NPC1; \**p*<0,01.

La figura 23 muestra las diferencias de supervivencia entre VAA2/9-miniEF1α-NPC1 frente a VAA2/9-miniCaMKII-

NPC1. La curva de Kaplan-Meier representa la supervivencia de: ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> no tratados (n=16), ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> (n=9) tratados con 1x10<sup>12</sup> CG de VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 entre 20 y 25 días de vida, y ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> (n=7) tratados con 1x10<sup>12</sup> CG de VAA9<sub>mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC1 entre 20 y 25 días de vida. \*\*\* p<0,001 comparado con ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> tratados con VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1.

5

### Lista de secuencias

La memoria descriptiva incluye una lista de secuencias adjunta con el presente documento que incluye las secuencias de la siguiente manera:

10

SEQ ID NO: 1: secuencia de nucleótidos de VAA<sub>mini</sub>CaMKII NPC1.RBG (figura 2);

SEQ ID NO: 2: secuencia de nucleótidos de la repetición terminal invertida en el extremo 5' (ITR en el extremo 5') de VAA<sub>mini</sub>CaMKII NPC1.RBG (figura 3);

15

SEQ ID NO: 3: secuencia de nucleótidos del promotor de CaMKII (promotor de *minicalmodulina*) de VAA<sub>mini</sub>CaMKII NPC1.RBG (figura 4);

SEQ ID NO: 4: secuencia de nucleótidos del ADNc de *NPC1h* de VAA<sub>mini</sub>CaMKII NPC1.RBG (figura 5);

20

SEQ ID NO: 5: secuencia de nucleótidos de la poli A de inmunoglobulina de conejo de VAA<sub>mini</sub>CaMKII NPC1.RBG (figura 6);

SEQ ID NO: 6: secuencia de nucleótidos de la repetición terminal invertida en el extremo 3' (ITR en el extremo 3') de VAA<sub>mini</sub>CaMKII NPC1.RBG (figura 7);

25

SEQ ID NO: 7: secuencia de nucleótidos de VAA<sub>mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC (figura 10);

SEQ ID NO: 8: secuencia de nucleótidos del promotor del EF1 $\alpha$  de VAA2/9<sub>mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC (figura 11);

30

SEQ ID NO: 9: secuencia de aminoácidos de NPC1 (figura 12);

SEQ ID NO: 10: secuencia de nucleótidos del ADNc de *NPC1* (figura 13);

35

SEQ ID NO: 11: secuencia de aminoácidos de NPC2 (figura 14); y

SEQ ID NO: 12: secuencia de nucleótidos del ADNc de *NPC2* (figura 15).

### Descripción detallada de la invención

40

La presente invención se refiere, al menos en parte, a composiciones y métodos para tratar o prevenir trastornos o enfermedades por almacenamiento de colesterol, tales como la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C producida por la mutación o el mal funcionamiento de las enzimas NPC1 y/o NPC2, que se codifican por los genes *NPC1* y *NPC2*, respectivamente. En determinados aspectos, las composiciones de la presente invención incluyen uno o más constructos de terapia génica que comprenden genes *NPC1* y/o *NPC2*, o derivados y/o mutantes de los mismos, que se unen de manera operativa a al menos un elemento del promotor que puede expresarse en un tejido del sistema nervioso central. El promotor es un promotor constitutivo, por ejemplo, un promotor constitutivo del EF1 $\alpha$  o del *mini*EF1 $\alpha$ , que puede expresarse en tejido neuronal así como en otros tejidos. Tal como se demostró mediante la puesta en práctica usando modelos de ratón con NPC aceptados, los vectores de terapia génica de la presente invención fueron eficaces en el tratamiento y/o prevención de la NPC.

45

50

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la invención, se proporcionan las siguientes definiciones de términos y explicaciones de las abreviaturas, de la siguiente manera:

### Definiciones

55

La presente invención contempla el uso terapéutico o profiláctico de vectores de terapia génica para lograr el tratamiento de sujetos que tienen o en riesgo de desarrollar una enfermedad o un trastorno por almacenamiento de colesterol. En determinadas realizaciones, la invención proporciona composiciones y métodos para tratar o prevenir la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C1, mediante la administración del vector al SNC de una manera dirigida, o de manera sistémica, usando vectores virales VAA recombinantes (por ejemplo, vectores virales VAA9) para lograr una administración de transgenes eficaz en un sujeto y/o en las células de un sujeto. En realizaciones relacionadas, el transgén es *NPC1* o una variante o un fragmento funcional del mismo. En otras realizaciones, el transgén es *NPC2* o una variante o un fragmento funcional del mismo.

60

65

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el significado habitual entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan al experto una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2ª ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker editor, 1988); The Glossary of Genetics, 5ª ed., R. Rieger *et al.* (editores), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Tal como se usan en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados asignados a ellos a continuación, a menos que se especifique lo contrario.

#### 10 Términos generales

Tal como se usa en el presente documento, el término “que comprende” se pretende que signifique que las composiciones y los métodos incluyen los elementos enumerados, pero no excluyen otros elementos. “Que consiste esencialmente en”, cuando se usa para definir composiciones y métodos, debe significar que excluye otros elementos de cualquier significado esencial para la combinación. Por tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos tal como se define en el presente documento no excluirá contaminantes traza del método de aislamiento y purificación y portadores farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes, y similares. “Que consiste en” debe significar que excluye más que los oligoelementos de otros componentes y etapa del método sustanciales para administrar las composiciones de esta invención. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición se encuentran dentro del alcance de esta invención.

Tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma singular “un”, “una” y “el/la” incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Los intervalos proporcionados en el presente documento se entienden como una forma abreviada de todos los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, un intervalo de 1 a 50 se entiende que incluye cualquier número, combinación de números, o subintervalo del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50.

A menos que se mencione lo contrario o que sea obvio a partir del contexto, tal como se usa en el presente documento, el término “o” se entiende que es inclusivo.

La enumeración de una lista de grupos químicos en cualquier definición de una variable en el presente documento incluye definiciones de esa variable como cualquier único grupo o combinación de grupos enumerados. La enumeración de una realización para una variable o un aspecto en el presente documento incluye esa realización como cualquier única realización o en combinación con cualquier otra realización o parte de la misma.

Cualquier composición o método proporcionado en el presente documento pueden combinarse con uno o más de cualquiera de las otras composiciones y métodos proporcionados en el presente documento.

El término “obtención” se entiende en el presente documento como fabricación, compra, u de otra forma adquisición.

Tal como se usa en el presente documento, “kits” se entiende que contiene al menos los reactivos de laboratorio no habituales de la invención y uno o más de reactivos de laboratorio no habituales para su uso en los métodos de la invención.

Los términos “alrededor” y “aproximadamente” deben significar generalmente un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Normalmente, los grados de error a modo de ejemplo están dentro del 20 por ciento (%), preferiblemente dentro del 10%, y más preferiblemente dentro del 5% de un valor o un intervalo de valores dado. Alternativamente, y particularmente en sistemas biológicos, los términos “alrededor de” y “aproximadamente” puede significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 10 o 5 veces, y más preferiblemente dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en el presente documento son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que significa que el término “alrededor de” o “aproximadamente” puede inferirse cuando no se indique de manera expresa.

#### *Términos relacionados con la NPC*

El término enfermedad de Niemann-Pick, tipo C o abreviado como “NPC,” se refiere al trastorno como se conoce en la técnica médica, y es distinto del tipo A o B. Los pacientes con la NPC no pueden metabolizar el colesterol y otros lípidos de manera apropiada dentro de la célula. Por consiguiente, las cantidades excesivas de colesterol se acumulan dentro del hígado y bazo y las cantidades excesivas de otros lípidos se acumulan en el cerebro. La NPC produce una reducción secundaria de la actividad del ASM (ácido esfingomielinasa) como es característico del tipo A y B. La enfermedad de Niemann-Pick de tipo C tiene unos 500 casos estimados diagnosticados en el mundo. Se cree, sin embargo, que el número de personas afectadas por la NPC es mayor, pero las dificultades diagnósticas no



5 permiten una evaluación precisa de la tasa de aparición. La NPC se ha diagnosticado inicialmente como una dificultad de aprendizaje, retraso leve, "torpeza," y desarrollo retrasado de la motricidad fina. No es infrecuente para una familia pasar varios años buscando un diagnóstico antes de que se identifique la NPC. La NPC es siempre mortal. La mayoría de los niños con la NPC mueren antes de los 20 años (muchos mueren antes de los 10 años). La aparición tardía de los síntomas puede conducir a esperanzas de vida mucho más largas pero es muy extremadamente raro para cualquier persona con la NPC alcanzar los 40 años. Un estudio reciente basado en análisis genómicos sugiere que la incidencia de la aparición infantil de la NPC es de 1: 90.000 pero cuando se consideran todas las formas, incluyendo las variantes de aparición en adultos, la enfermedad puede ser tan habitual como 1/19.000-1/36,00. Actualmente no existe una terapia curativa para ninguna forma de la enfermedad de NPC.

10 El término "NPC1" se refiere al gen o proteína NPC1 de tipo natural, diversas formas mutantes del cual se asocian con la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C conduciendo a la acumulación de colesterol no esterificado intracelular. Por comodidad, el gen humano se denomina NPC1h o *NPC1* y el gen murino NPC1m o *Npc1* (la misma nomenclatura también se usa para distinguir entre los ADNc y proteínas humanos y murinos). Donde no se proporciona designación "h" o "m", se pretende hacer referencia generalmente al gen *NPC1* humano. La definición de un gen *NPC1* incluye los diversos polimorfismos de secuencia que existen en la especie en cuestión, es decir, el término "NPC1h" o un NPC1h de tipo natural abarca todos los diversos polimorfismos de secuencia en seres humanos.

15 La proteína NPC1 o un derivado puede caracterizarse de manera funcional por su capacidad, cuando se expresa en células de NPC, para corregir el fenotipo de acumulación lisosómica de colesterol que es característica de tales células. Por tanto, la "actividad biológica de la proteína NPC1" se refiere a la capacidad de una proteína para corregir el fenotipo de acumulación lisosómica de colesterol que es característica de células de NPC.

20 Una "proteína NPC1 de tipo natural" se refiere a cualquier proteína codificada por un gen de tipo natural que puede tener una actividad biológica normal (nivel de función en ausencia de enfermedad o trastorno) cuando se expresa o se introduce *in vivo*. Tal funcionalidad puede someterse a prueba mediante cualquier medio conocido para establecer la funcionalidad de una proteína.

25 El término "gen derivado de NPC1," que puede incluir un "gen NPC1 mutante," se refiere a cualquier secuencia de NPC1 de tipo no natural. Normalmente, un "gen NPC1 mutante" se refiere a una secuencia de tipo no natural que da como resultado una proteína NPC1 que funciona de manera anómala, y por tanto, enfermedad de NPC. Sin embargo, el término "gen derivado de NPC1" se pretende que sea suficientemente amplio para abarcar un gen mutante NPC1, pero también cualquier otro gen NPC1 que porta un cambio genético que puede dar como resultado una proteína NPC1 que tienen cualquiera de un aumento, una disminución o ningún cambio en la actividad en comparación con la proteína de tipo natural.

30 El término "proteína NPC1, derivado o variante funcional de la misma," que puede incluir una "proteína NPC1 mutante," se refiere a cualquier secuencia de NPC1 de tipo no natural o fragmento de la misma. Normalmente, una "proteína NPC1 mutante" se refiere a un polipéptido NPC1 de tipo no natural que tiene una función anómala en comparación con una proteína NPC1 de tipo natural, y que da como resultado la enfermedad de NPC1. Sin embargo, el término "proteína NPC1, derivado o variante funcional de la misma" se pretende que sea suficientemente amplio para abarcar una proteína NPC1 mutante, pero también cualquier otra proteína NPC1 que porta un cambio genético (incluyendo un fragmento) que puede dar como resultado una proteína NPC1 que tiene cualquiera de un aumento, una disminución o ningún cambio en la actividad en comparación con la proteína NPC1 de tipo natural. En el caso de la presente invención, la "proteína NPC1, derivado o variante funcional de la misma" también puede referirse a proteínas NPC1 homólogas de fuentes no humanas, por ejemplo, ratón, mono, caballo, conejo y similares.

35 El término "NPC2" se refiere al gen NPC1 de tipo natural, diversas formas mutantes del cual se asocian con la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C conduciendo a la acumulación de colesterol no esterificado intracelular. Por comodidad, el gen humano se denomina NPC2h o *NPC2* y el gen murino NPC2m o *Npc2* (esta misma nomenclatura también se usa para distinguir entre los ADNc y proteínas humanos y murinos). Donde no se proporciona designación "h" o "m", se pretende hacer referencia generalmente al gen NPC2 humano. La definición de un gen NPC2 incluye los diversos polimorfismos de secuencia que existen en la especie en cuestión, es decir, el término "NPC2h" o un NPC2h de tipo natural abarca todos los diversos polimorfismos de secuencia en seres humanos.

40 El término "gen derivado de NPC2", que puede incluir un "gen NPC2 mutante," se refiere a cualquier secuencia de NPC2 de tipo no natural. Normalmente, un "gen NPC2 mutante" se refiere a una secuencia de tipo no natural que da como resultado una proteína NPC2 que funciona de manera anómala, y por tanto, enfermedad de NPC. Sin embargo, el término "gen derivado de NPC2" se pretende que sea suficientemente amplio para abarcar un gen mutante NPC2, pero también cualquier otro gen NPC2 que porta un cambio genético que puede dar como resultado una proteína NPC2 que tienen cualquiera de un aumento, una disminución o ningún cambio en la actividad en comparación con la proteína de tipo natural.

45 El término "proteína NPC2, derivado o variante funcional de la misma," que puede incluir una "proteína NPC2

mutante,” se refiere a cualquier secuencia de NPC2 de tipo no natural o fragmento de la misma. Normalmente, una “proteína NPC2 mutante” se refiere a un polipéptido NPC2 de tipo no natural que tiene una función anómala en comparación con una proteína NPC1 de tipo natural, y que da como resultado la enfermedad de NPC2. Sin embargo, el término “proteína NPC2, derivado o variante funcional de la misma” se pretende que sea  
 5 suficientemente amplio para abarcar una proteína NPC2 mutante, pero también cualquier otra proteína NPC2 que porta un cambio genético (incluyendo un fragmento) que puede dar como resultado una proteína NPC2 que tiene cualquier de un aumento, una disminución o ningún cambio en la actividad en comparación con la proteína NPC2 de tipo natural. En el caso de la presente invención, la “proteína NPC2, derivado o variante funcional de la misma” también puede referirse a proteínas NPC2 homólogas de fuentes no humanas, por ejemplo, ratón, mono, caballo,  
 10 conejo y similares.

El término “enfermo de NPC” o “homocigoto de NPC” se refiere a una persona que porta un gen *NPC1* o *NPC2* mutante, de manera que la persona presenta síntomas clínicos de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C.

15 El término “portador de NPC” o “heterocigoto de NPC” se refiere a una persona que no presenta síntomas clínicos de la NPC pero que porta una forma mutante del gen *NPC1* o *NPC2* y puede transmitir este gen mutante a su progenie.

Tal como se usa en el presente documento, el término “enfermedad o trastorno por almacenamiento de colesterol” se entiende que se refiere a una enfermedad o un trastorno de o relacionado con el metabolismo del colesterol, opcionalmente que puede tratarse a través del uso de terapia génica para la administración de NPC a un sujeto. Los “trastornos o enfermedades por almacenamiento de colesterol” a modo de ejemplo incluyen pero no se limitan a la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C1. Si el almacenamiento de colesterol y la patofisiología relacionada pueden verse influenciadas por la función de NPC1 en otras condiciones es segura y extiende la utilidad de las terapias dirigidas a NPC, específicamente terapia génica con NPC1, hacia otros trastornos más habituales en el futuro. Por ejemplo, un subconjunto de trastornos neuropsiquiátricos, tales como demencia, convulsiones y enfermedad cerebral aterosclerótica pueden verse influenciados por o mejorarse después de la reducción del colesterol mediada por la actividad de NPC1 y como tal, estos grupos de pacientes pueden ser candidatos para una terapia génica viral con NPC1.  
 20  
 25  
 30

#### *Términos relacionados con la biología molecular*

Según la presente invención pueden emplearse técnicas de biología, microbiología molecular y ADN recombinante convencionales dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican de manera completa en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (en el presente documento “Sambrook *et al.*, 1989”); *DNA Cloning: A Practical Approach*, volúmenes I y II (D. N. Glover editor 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait editor 1984); *Nucleic Acid Hybridization*; B. D. Hames & S. J. Higgins editores (1985); *Transcription And Translation*; [B. D. Hames & S. J. Higgins, editores (1984); *Animal Cell Culture*; R. I. Freshney, editor (1986); *Immobilized Cells And Enzymes*; IRL Press, (1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F. M. Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).  
 35  
 40

Tal como se usa en el presente documento, el término “aislado” significa que el material referenciado se retira del ambiente en el que normalmente se encuentra. Por tanto, un material biológico aislado puede estar libre de componentes celulares, es decir, componentes de las células en las que se encuentra o se produce el material. En el caso de moléculas de ácido nucleico, un ácido nucleico aislado incluye un productor de PCR, un ARNm aislado, un ADNc o un fragmento de restricción. En otra realización, un ácido nucleico aislado se corta preferiblemente del cromosoma en el que puede encontrarse, y más preferiblemente ya no se une a regiones no reguladoras, no codificantes o a otros genes, se localiza en el sentido de 5' o en el sentido de 3' del gen contenido por la molécula de ácido nucleico aislada cuando se encuentra en el cromosoma. En aún otra realización, el ácido nucleico aislado carece de uno o más intrones. Las moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen secuencias insertadas en plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales y similares. Por tanto, en una realización específica, un ácido nucleico recombinante es un ácido nucleico aislado. Una proteína aislada, puede asociarse con otras proteínas o ácidos nucleicos, o ambos, con los cuales se asocia en la célula, o con membranas celulares si se trata de una proteína asociada a la membrana. En una realización específica, una proteína NPC1 aislada es una proteína NPC1 recombinante expresada a partir de un vector de expresión. Un material aislado puede ser, pero no es necesario que sea, purificado.  
 45  
 50  
 55

Tal como se usa en el presente documento, el término “ADNc” (ADN complementario) se refiere a una pieza de ADN que carece de segmentos no codificantes internos (intrones) y secuencias reguladoras que determinan la transcripción. El ADNc puede sintetizarse en el laboratorio mediante transcripción inversa a partir del ARN mensajero extraído de células.  
 60

Tal como se usa en el presente documento, el término “ORF” (marco de lectura abierto) se refiere a una serie de tripletes de nucleótidos (codones) que codifican para aminoácidos sin ningún codón de terminación. Estas  
 65

secuencias pueden traducirse habitualmente para dar un péptido.

Tal como se usa en el presente documento, el término "ortólogo" se refiere a dos secuencias de nucleótidos que comparten una secuencia ancestral común y divergen cuando una especie que porta una secuencia ancestral se divide para dar dos especies. Las secuencias ortólogas también son secuencias homólogas.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "sondas" y "cebadores" se refiere a secuencias de oligonucleótidos que pueden prepararse fácilmente basándose en los ácidos nucleicos proporcionados por esta invención. Una sonda comprende un ácido nucleico aislado unido a una etiqueta detectable o molécula indicadora. Las típicas etiquetas incluyen isótopos radiactivos, ligandos, agentes quimioluminiscentes y enzimas. Los métodos para el marcado y una guía en la elección de etiquetas apropiadas para diversos fines se comentan, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989) y Ausubel *et al.* (1987). Los "cebadores" son ácidos nucleicos cortos, preferiblemente oligonucleótidos de ADN con 15 nucleótidos o más de longitud. Los cebadores pueden aparearse con una cadena de ADN diana complementaria mediante hibridación de ácidos nucleicos para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ADN diana, y luego extenderse a lo largo de la cadena de ADN diana mediante una enzima ADN polimerasa. Los pares de cebadores pueden usarse para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica.

Los métodos para preparar y usar sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989), Ausubel *et al.* (1987) e Innis *et al.*, (1990). Los pares de cebadores de PCR pueden derivarse de una secuencia conocida, por ejemplo, usando programas informáticos destinados a ese fin tal como Primer (versión 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Mass.). Un experto en la técnica apreciará que la especificidad de una sonda o un cebador particular aumenta con su longitud. Por tanto, por ejemplo, un cebador que comprende 20 nucleótidos consecutivos del gen o ADNc de NPC1 humano se apareará con una secuencia diana tal como un homólogo de gen NPC1 de rata contenido dentro de una genoteca de ADN genómica de rata genómica con una especificidad más alta que la de un cebador correspondiente de sólo 15 nucleótidos. Por tanto, para obtener mayor especificidad, pueden seleccionarse sondas y cebadores que comprenden 20, 25, 30, 35, 40, 50 o más nucleótidos consecutivos de las secuencias de gen o ADNc de NPC1.

La invención por tanto incluye moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden longitudes especificadas de las secuencias de ADN (o ADNc) o gen de NPC1 dadas a conocer. Tales moléculas pueden comprender al menos 20, 25, 30, 35, 40 ó 50 nucleótidos consecutivos de estas secuencias y pueden obtenerse de cualquier región de las secuencias dadas a conocer.

Tal como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico "vector" tal como se introduce en una célula huésped, produciendo de ese modo una célula huésped transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que permiten su replicación en la célula huésped, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Un vector puede incluir un "vector de transferencia de genes", "vector de terapia génica" o "constructo de terapia génica" o términos similares, que se refieren a constructos de vectores específicos que son adecuados para realizar la transferencia de genes para administrar un gen deseado.

Los términos "vector," "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante lo cual una secuencia de ADN o ARN de ASM (por ejemplo, un gen foráneo) puede introducirse en una célula huésped de manera que transforma el huésped y promueve la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Los vectores incluyen cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc., que puede replicarse cuando se asocia con los elementos de control apropiados y que puede transferir secuencias de genes de ASM entre células. Por tanto, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores virales.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sistema de expresión" significa una célula huésped y un vector compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína NPC1 codificada por un ADN foráneo portado por el vector e introducido en la célula huésped. Los sistemas de expresión habituales incluyen células huésped y vectores plasmídicos de *E. coli*, células huésped de insecto tales como células Sf9, Hi5 o S2 y vectores y sistemas de expresión de baculovirus, y células huésped y vectores de mamífero. El término "sistema de expresión" también puede referirse a un vector de terapia génica adecuado que puede administrarse mediante cualquier medio, incluyendo métodos *ex vivo* e *in vivo*.

El término "célula huésped" significa cualquier célula de cualquier organismo que se selecciona, se modifica, se transforma, se hace crecer o se usa o se manipula de cualquier manera, para la producción de una sustancia por la célula, por ejemplo la expresión por la célula de un gen de ASM humano, incluyendo una secuencia de ADN o ARN, o la enzima NPC1. Las células huésped pueden usarse además para una evaluación preliminar de otros ensayos. Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que ha experimentado una modificación por ingeniería o manipulación molecular biológica. En una realización de la invención, la célula huésped es un fibroblasto.

Un “gen” es una secuencia de nucleótidos que codifica para un “producto génico”. Generalmente, un producto génico es una proteína. Sin embargo, un producto génico también puede ser otro tipo de molécula en una célula, tal como un ARN (por ejemplo, un ARNt o un ARNr). Para los fines de la presente invención, un producto génico también se refiere a una secuencia de ARNm que puede encontrarse en una célula. Tal como se usa en el presente documento, un gen puede referirse a las secuencias de nucleótidos que codifican para genes *NPC1* o *NPC2* mutantes de tipo natural.

Tal como se usa en el presente documento, una “célula transformada” es una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico mediante técnicas de biología molecular o técnicas de terapia génica. Tal como se usa en el presente documento, el término transformación abarca todas las técnicas mediante las cuales una molécula de ácido nucleico puede introducirse en una célula de este tipo, incluyendo la transfección con vectores virales, transformación con vectores plasmídicos e introducción de ADN desnudo mediante electroporación, lipofección y aceleración por pistola de partículas e incluye tanto condiciones *in vitro* como *in vivo*.

Tal como se usa en el presente documento, el término “purificado” no requiere pureza absoluta; más bien, se entiende como un término relativo. Por tanto, por ejemplo, una preparación de proteína NPC1 purificada es una en la que la proteína NPC1 es más pura que la proteína en su ambiente natural dentro de una célula. Preferiblemente, una preparación de una proteína NPC1 se purifica de modo tal que la proteína NPC1 representa al menos el 50% del contenido en proteína total de la preparación.

Tal como se usa en el presente documento, el término “operativamente unido” se refiere a que una primera secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, un gen NPC1) se une operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia promotora) cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor se une operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN operativamente unidas son contiguas y unen, cuando sea necesario, dos regiones codificantes de proteína, en el mismo marco de lectura.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico recombinante” es uno que tiene una secuencia que no se produce de manera natural o tiene una secuencia que se produce mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otra manera. Esta combinación artificial se consigue a menudo mediante síntesis química o, más habitualmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética.

Tal como se usa en el presente documento, el término “identidad de secuencia” se refiere a la similitud entre dos secuencias de ácido nucleico, o dos secuencias de aminoácidos y se expresa en cuanto a la similitud entre las secuencias, denominada de otra manera identidad de secuencia. La identidad de secuencia se mide de manera frecuente en cuanto al porcentaje de identidad (o similitud u homología); cuanto mayor es el porcentaje, más similares son las dos secuencias. Los homólogos de las proteínas NPC1 de humano y ratón poseerán un grado relativamente alto de identidad de secuencia cuando se alineen usando métodos convencionales.

Los métodos de alineación de secuencias para su comparación son bien conocidos en la técnica. Diversos programas y algoritmos de alineación se describen en: Smith y Waterman (1981); Needleman y Wunsch (1970); Pearson y Lipman (1988); Higgins y Sharp (1988); Higgins y Sharp (1989); Corpet *et al.* (1988); Huang *et al.* (1992); y Pearson *et al.* (1994). Altschul *et al.* (1994) presenta una consideración detallada de métodos de alineación de secuencias y cálculos de homología.

La herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI (Altschul *et al.*, 1990) está disponible de varias fuentes, incluyendo el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, Bethesda, Md.) y en Internet, para su uso junto con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Se puede acceder en el sitio en línea del NCBI bajo el encabezado “BLAST”. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia usando este programa está disponible en el sitio en línea del NCBI bajo el subencabezado “Descripción general de BLAST”.

Los homólogos de las proteínas NPC1 y NPC2 dadas a conocer se caracterizan normalmente porque poseen al menos el 70% de identidad de secuencia contada a lo largo de la alineación de longitud completa con la secuencia de aminoácidos dada a conocer de las secuencias de *NPC1/NPC2* de humano o ratón usando el Blast 2.0 del NCBI, blastp con huecos ajustado a los parámetros predeterminados. Las proteínas con incluso mayor similitud a las secuencias de referencia mostrarán un porcentaje de identidades crecientes cuando se evalúa mediante este método, tal como al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de identidad de secuencia. Cuando se compara menos que la secuencia completa para determinar la identidad de secuencia, los homólogos poseerán normalmente al menos el 75% de identidad de secuencia sobre ventanas cortas de 10-20 aminoácidos, y puede poseer identidades de secuencia de al menos el 85% o al menos el 90% o el 95% dependiendo de su similitud con la secuencia de referencia. Los métodos para determinar la identidad de secuencia sobre tales ventanas cortas se describen en el sitio en línea del NCBI bajo el subencabezado “Preguntas frecuentes”. Un

experto en la técnica apreciará que estos intervalos de identidad de secuencia se proporcionan sólo como guía; es muy posible que puedan obtenerse homólogos muy significativos que estén fuera de los intervalos proporcionados. La presente invención proporciona no sólo los homólogos peptídicos descritos anteriormente, sino también moléculas de ácido nucleico que codifican para tales homólogos, tales como los generados mediante optimización de codones. En una realización, cambiando la secuencia de nucleótidos en los codones correspondientes se generará un gen *NPC1* o *NPC2* sintético que habrá mejorado la eficacia de traducción y la detección en presencia del gen endógeno.

Una muestra de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que el polipéptido para el que codifica el primer ácido nucleico produce reacción inmunológicamente cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico (por ejemplo, una proteína NPC1 humana y un homólogo de NPC1 de otra especie, o una proteína NPC1 humana variante).

Otra muestra de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones más rigurosas. Las condiciones más rigurosas dependen de la secuencia y son diferentes bajo parámetros ambientales diferentes. Generalmente, las condiciones más rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente de 5°C a 20°C menores que el punto de fusión térmico ( $T_f$ ) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. El  $T_f$  es la temperatura (bajo la fuerza iónica y el pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente adaptada. Las condiciones para la hibridación del ácido nucleico y el cálculo de las rigurosidades pueden encontrarse en Sambrook *et al.* (1989) y Tijssen (1993) y son por lo demás conocidas en la técnica.

#### *Términos relacionados con la terapia génica*

El término "terapia génica" se refiere a un método de cambio de la expresión de un gen endógeno mediante la administración exógena de un gen, es decir, un gen *NPC1* o *NPC2* de tipo natural o mutante. Tal como se usa en el presente documento, la terapia génica también se refiere a la sustitución de un gen *NPC1* o *NPC2* defectuoso, o la sustitución de un gen *NPC1* o *NPC2* ausente, introduciendo un gen funcional o una porción de un gen que corresponde al gen *NPC1* o *NPC2* defectuoso o ausente en células somáticas o madre de un individuo que lo necesita. La terapia génica puede conseguirse mediante métodos "ex vivo", en los que se retiran células madre somáticas o diferenciadas del cuerpo del individuo seguido por la introducción de una copia normal del gen defectuoso en las células explantadas usando un vector viral como el vehículo de administración de genes. Además, la transferencia *in vivo* implica la transferencia de genes directa en células en el individuo *in situ* usando una amplia gama de vectores virales (por ejemplo, VAA), liposomas, nanopartículas, complejos proteína:ADN, ácidos nucleicos modificados o ADN desnudo para alcanzar un resultado terapéutico.

El término "transgén" se refiere a un polinucleótido que se introduce en una célula de y puede expresarse en condiciones apropiadas y confiere una propiedad deseada a una célula en la que se introdujo, o de otra manera conduce a un resultado terapéutico deseado.

Los términos "partículas de genoma (gp)" o "equivalentes de genoma" o copias de genoma (cg) tal como se usan en referencia a un título viral, se refieren al número de viriones que contienen el genoma del ADN de VAA recombinante, sin considerar la infectividad o funcionalidad. El número de partículas de genoma en una preparación del vector particular puede medirse mediante procedimientos tales como los descritos en otra parte en el presente documento, o por ejemplo, en Clark *et al.* (1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk *et al.* (2002) Mol. Ther., 6:272-278.

Los términos "unidad de infección (ui)", "partícula infecciosa" o "unidad de replicación" tal como se usa en referencia a un título viral, se refieren al número de partículas de vector de VAA recombinantes competentes para replicación e infecciosas medidas por el ensayo de centro infeccioso, también conocido como ensayo de centro de replicación, tal como se describe, por ejemplo, en McLaughlin *et al.* (1988) J. Virol., 62:1963-1973.

El término "unidad de transducción (ut)" tal como se usa en referencia a un título viral, se refiere al número de partículas de vector de VAA recombinantes infecciosas que resultan en la producción de un producto de transgén funcional tal como se mide en ensayos funcionales tales como los descritos en otra parte en el presente documento, o por ejemplo, en Xiao *et al.* (1997) Exp. Neurobiol., 144:113-124; o en Fisher *et al.* (1996) J. Virol., 70:520-532 (ensayo LFU).

#### *Términos relacionados con la aplicación terapéutica*

La presente invención proporciona además un método para la prevención o el tratamiento de ENP de tipo A y tipo B, método que comprende aumentar la expresión o actividad de la enzima ASM mutante, o aumentando la actividad de enzima ASM de sustitución de tipo natural recombinante, en un sujeto o paciente que necesita tal tratamiento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "administrar" se pretende hacer referencia a un medio para proporcionar la composición (por ejemplo, al sujeto de una manera que da como resultado que la composición esté

dentro del cuerpo del sujeto). Una administración de este tipo puede ser por cualquier vía incluyendo, sin limitación, subcutánea, intradérmica, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, sublingual, bucal e intramuscular. En determinadas realizaciones, la administración puede ser apropiada para administración al SNC, por ejemplo, epidural, intracerebral o intracerebroventricular.

5 La invención proporciona un número de composiciones (por ejemplo, secuencias y vectores) que son útiles para el desarrollo de fármacos muy específicos para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno en un sujeto, tal como se caracteriza además mediante los métodos descritos en el presente documento. Además, los métodos de la invención proporcionan un medio fácil para identificar terapias que son seguras para su uso en sujetos. Se  
10 contemplan otros trastornos que pueden caracterizarse por el almacenamiento de colesterol, incluyendo las formas adultas de demencia y estados que pueden producirse, en parte, por una actividad de NPC1 disminuida.

Tal como se usa en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" abarca cualquiera de los portadores farmacéuticos convencionales, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua y emulsiones, tales como una emulsión aceite/agua o agua/aceite, y diversos tipos de agentes humectantes. Las  
15 composiciones también pueden incluir estabilizadores y conservantes. Para ejemplos de portadores, estabilizadores y adyuvantes, véase Martin Remington's Pharm. Sci., 15<sup>a</sup> ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975)).

Un "sujeto" o "paciente" es un ser humano o un animal que ha desarrollado, o es probable que desarrolle la enfermedad de NPC, más particularmente un mamífero, preferiblemente un roedor o un primate, y lo más preferiblemente un ser humano. En una realización, el paciente es un miembro de la población judía asquenazí que ha sido diagnosticado con, o que se ha identificado como que tiene un riesgo aumentado de desarrollar la NPC debido a mutaciones hereditarias en el gen NPC1 o NPC2. En otra realización, el paciente es un miembro de la población francocanadiense de Nueva Escocia, un habitante de la región del Magreb (Túnez, Marruecos, Argelia) del  
20 norte de África o un miembro de la población hispanoamericana del sur de Nuevo México y Colorado. Sin embargo, la enfermedad de Niemann-Pick es panétnica, y el término sujeto abarca cualquiera en el mundo que tiene, o en riesgo genéticamente de desarrollar, la enfermedad de NPC. El término "*in vitro*" tiene su significado reconocido en la técnica, por ejemplo, implicando reactivos o extractos purificados, por ejemplo, extractos celulares. El término "*in vivo*" también tiene su significado reconocido en la técnica, por ejemplo, implicando células vivas, por ejemplo, células inmortalizadas, células primarias, líneas celulares y/o células en un organismo.

"Tratamiento" o "tratar" tal como se usa en el presente documento, se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico (por ejemplo, un vector de VAA-NPC) a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un línea celular o tejido aislado de un paciente, que tiene un trastorno con el fin de curar, sanar,  
35 aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, corregir o afectar la enfermedad o el trastorno, o los síntomas de la enfermedad o el trastorno. El término "tratamiento" o "tratar" también se usa en el presente documento en el contexto de administrar agentes de manera profiláctica. En el contexto de la presente invención, los síntomas que pueden aliviarse pueden incluir, pero sin limitarse a, la acumulación de esfingomielina en lisosomas reticuloendoteliales, que da como resultado hepatoesplenomegalia, enlentecimiento psicomotor, anomalías pulmonares, neurodegeneración progresiva. En algunos casos, el tratamiento prevendrá la muerte que resulta de la enfermedad de NPC.

El término "prevención" se refiere a la prevención de la aparición de la enfermedad, lo que significa interferir de manera profiláctica un mecanismo patológico que da como resultado la enfermedad. En el contexto de la presente  
45 invención, un mecanismo patológico de este tipo puede ser una expresión aumentada del NPC1 o NPC2 mutante.

Los términos "dosis eficaz" o "dosificación eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se definen como una cantidad suficiente para alcanzar o al menos alcanzar de manera parcial el efecto deseado. El término "dosis terapéuticamente eficaz" se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener de manera parcial la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad o prevenir la enfermedad de manera profiláctica. El término "paciente" incluye seres humanos y otros sujetos mamíferos que reciben tratamiento o bien profiláctico o bien terapéutico. En lo que se refiere a la presente invención, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" también se usa en el presente documento para indicar una cantidad o dosis de un vector de terapia génica que codifica para NPC1 o NPC2 (o un mutante o una variante funcional de la misma) suficiente para aumentar el  
50 nivel de actividad de NPC1 o NPC2 sobre el nivel del mutante o defectuoso hasta aproximadamente el 3-5%, preferiblemente en aproximadamente el 10%, y más preferiblemente en aproximadamente el 30%, o aproximadamente el 40%, o aproximadamente el 50%, o aproximadamente el 60%, o aproximadamente el 70%, o aproximadamente el 80%, o aproximadamente el 90%, o aproximadamente el 95% o incluso hasta el 100% del nivel encontrado en células normales. Preferiblemente, una cantidad terapéuticamente eficaz puede mejorar o prevenir un déficit clínicamente significativo en NPC1 o NPC2 en el sujeto. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para producir una mejora en un estado clínicamente significativo en el sujeto, por ejemplo, mejora de la neurodegeneración progresiva en pacientes con ENP tipo C.

Determinadas metodologías de la presente invención incluyen al menos una etapa que implica la comparación de un valor, nivel, rasgo característico, una característica, propiedad, etc. con un "control adecuado", denominado de  
65 manera intercambiable en el presente documento un "control apropiado". Un "control adecuado" o "control

apropiado” es un control o estándar familiar para un experto habitual en la técnica útil para fines de comparación. En una realización, un “control adecuado” o “control apropiado” es un valor, nivel, rasgo característico, una característica, propiedad, etc. determinado antes de realizar una metodología de terapia génica, tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una tasa de transcripción, un nivel de ARNm, una tasa de traducción, un nivel de proteínas, una actividad biológica, característica o propiedad celular, un genotipo, fenotipo, etc. pueden determinarse antes de introducir un VAA u otro vector de la invención en una célula o un organismo. En otra realización, un “control adecuado” o “control apropiado” es un valor, nivel, rasgo característico, una característica, propiedad, etc. determinado en una célula o un organismo, por ejemplo, un control o una célula o un organismo normal, que presenta, por ejemplo, caracteres normales. En aún otra realización, un “control adecuado” o “control apropiado” es un valor, nivel, rasgo característico, una característica, propiedad, etc. predefinido.

Otras definiciones aparecen en contexto a lo largo de toda la divulgación.

#### Vectores de terapia génica

En un aspecto, la presente invención se refiere a constructos o vectores de terapia génica que comprenden genes *NPC1* y/o *NPC2*, o derivados y/o mutantes de los mismos, que se unen de manera operativa a al menos un elemento del promotor que puede expresarse en un tejido del sistema nervioso central. En determinadas realizaciones, el promotor es un promotor de calmodulina neuronal específico o derivado del mismo. En otras realizaciones, el promotor es un promotor constitutivo, por ejemplo, un promotor constitutivo del EF1 $\alpha$  o derivado del mismo, que puede expresarse en tejidos neuronales. Tal como se demostró mediante una puesta en práctica usando modelos de ratón con NPC aceptados, los vectores de terapia génica de la presente invención fueron eficaces en el tratamiento y/o la prevención de la NPC.

En determinadas realizaciones, los constructos o vectores de terapia génica comprenden un gen *NPC1*, o un gen *NPC1* derivado y/o mutante. El gen *NPC1*, incluyendo cualquier derivado y/o mutante del mismo, puede codificar un polipéptido NPC1 de tipo natural, cualquier variante o fragmento funcional del mismo. Las variantes o los fragmentos funcionales de NPC1 pueden tener una actividad aumentada o disminuida en comparación con una proteína NPC1 de tipo natural, o puede no cambiarse la actividad.

En determinadas otras realizaciones, los constructos o vectores de terapia génica comprenden un gen *NPC2*, o un gen *NPC2* derivado y/o mutante. El gen *NPC2*, incluyendo cualquier derivado y/o mutante del mismo, puede codificar para un polipéptido NPC2 de tipo natural, cualquier variante o fragmento funcional del mismo. Las variantes o los fragmentos funcionales de NPC2 pueden tener una actividad aumentada o disminuida en comparación con una proteína NPC2 de tipo natural, o puede no cambiarse la actividad.

Las secuencias de nucleótidos de o genes *NPC1* y/o *NPC2* que comprenden una región codificante para proteínas NPC1 y/o NPC2 pueden obtenerse de cualquier fuente, incluyendo ser humano, ratón, caballo, cerdo, mono y similares. Las secuencias de nucleótidos que codifican para *NPC1* y/o *NPC2* en ser humano, y homólogos de *NPC1* y/o *NPC2* de una especie distinta de la humana, se conocen generalmente en la técnica y pueden obtenerse de repositorios de secuencias públicos, incluyendo, por ejemplo, GenBank. En particular, las secuencias de ADNc que codifican para las proteínas NPC1 y/o NPC2 (o variantes de las mismas) también pueden obtenerse de repositorios de secuencias públicos tales como GenBank.

Por ejemplo, se contemplan las siguientes secuencias de NPC1 (o cualquier variante que comprende o modificada genéticamente para comprender cualquier mutación que codifica para una variante funcional NPC1) para su uso en los constructos de terapia génica de la presente invención:

n.º de registro de GenBank BC063302 (enfermedad de Niemann-Pick, tipo C1 de *Homo sapiens*, ARNm (clon de ADNc)), que proporciona la secuencia codificante del ADNc de *NPC1* (SEQ ID NO: 10, figura 13) y la secuencia de aminoácidos de polipéptido NPC1 (SEQ ID NO: 9, figura 12);

n.º de registro de GenBank BC117178 *NPC1* ARNm (clon de ADNc) del (gen de la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C1) de *Homo Sapiens* de tipo 1, que proporciona una secuencia codificante del ADNc de *NPC1* variante y una secuencia de amino del polipéptido NPC1;

n.º de registro de GenBank BC143756 ARNm (clon de ADNc) del *NPC1* (gen de la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C1) de *Homo Sapiens* de tipo 1, que proporciona una secuencia codificante del ADNc de *NPC1* variante y una secuencia de amino del polipéptido NPC1;

n.º de registro de GenBank AF258783,1 (ARNm de la proteína de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C1 (NPC1) de *Felis catus*, cds completa) que proporciona una secuencia codificante del ADNc de NPC1 de gato y una secuencia de amino del polipéptido NPC1 de gato;

n.º de registro de GenBank BC054539 (ARNm (clon de ADNc) de *Npc1* (gen de la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C1) de ratón), que proporciona una secuencia codificante del ADNc de *NPC1* de ratón y una secuencia de

amino del polipéptido NPC1 de ratón;

5 n.º de registro de GenBank BC151276 (ARNm (clon de ADNc) de NPC1 (gen de la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C1) bovino), que proporciona una secuencia codificante del ADNc de NPC1 bovina y una secuencia de amino del polipéptido NPC1 bovina; y

10 n.º de registro de GenBank BC090541 (ARNm (clon de ADNc) de NPC1 (gen de la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C1) de pez cebra), que proporciona una secuencia codificante del ADNc de NPC1 de pez cebra y una secuencia de amino del polipéptido NPC1 de pez cebra.

El contenido dado a conocer abarca además cualquier secuencia de polipéptido de y/o gen *NPC1* no expresamente indicado en el presente documento, pero que está públicamente disponible en el momento de la presente invención, o que esté disponible después del momento de la invención.

15 Por ejemplo, se contemplan las siguientes secuencias de *NPC2* (o cualquier variante que comprende o modificada genéticamente para comprender cualquier mutación que codifique para una variante funcional NPC2) para su uso en los constructos de terapia génica de la presente invención:

20 n.º de registro de GenBank BC002532 (enfermedad de Niemann-Pick, tipo C2 de *Homo Sapiens*, ARNm (clon de ADNc)), que proporciona la secuencia codificante del ADNc de NPC2 (SEQ ID NO: 12, figura 15) y la secuencia de aminoácidos de polipéptido NPC2 (SEQ ID NO: 11, figura 14);

25 n.º de registro de GenBank KJ893081 (gen NPC2 clon ccsbBroadEn\_02475 de *Homo sapiens*, constructo sintético, codifica para una proteína completa), que proporciona la secuencia codificante del ADNc de NPC2 y la secuencia de aminoácidos de polipéptido NPC2;

30 n.º de registro de GenBank BC045895 (enfermedad de Niemann-Pick, tipo C2, de pez cebra, ARNm (clon de ADNc), que proporciona la secuencia codificante del ADNc de NPC2 de pez cebra y la secuencia de aminoácidos de polipéptido NPC2 de pez cebra;

n.º de registro de GenBank NM\_173918 (enfermedad de Niemann-Pick, tipo C2, bovina, ARNm (clon de ADNc), que proporciona la secuencia codificante del ADNc de NPC2 bovina y la secuencia de aminoácidos de polipéptido NPC2 bovina;

35 n.º de registro de GenBank BC102504 (enfermedad de Niemann-Pick, tipo C2, bovina, ARNm (clon de ADNc), que proporciona la secuencia codificante del ADNc de NPC2 bovina y la secuencia de aminoácidos de polipéptido NPC2 bovina; y

40 n.º de registro de GenBank NM\_214206 (enfermedad de Niemann-Pick, tipo C2, porcina, ARNm (clon de ADNc), que proporciona la secuencia codificante del ADNc de NPC2 de cerdo y la secuencia de aminoácidos de polipéptido NPC2 de cerdo.

45 El contenido dado a conocer abarca además cualquier secuencia de polipéptido de y/o gen *NPC2* no expresamente indicado en el presente documento, pero que está públicamente disponible en el momento de la presente invención, o que esté disponible después del momento de la invención.

50 En realizaciones preferidas, el transgén codifica para una molécula biológicamente activa, cuya expresión en el sujeto, por ejemplo, en el SNC de un sujeto, da como resultado al menos la corrección parcial de la enfermedad o el trastorno por almacenamiento de colesterol, por ejemplo, enfermedad de Niemann-Pick, tipo C. En algunas realizaciones, el transgén codifica para *NPC1* (o una variante y/o un fragmento funcional del mismo). En otras realizaciones, el transgén codifica para *NPC2* (o una variante y/o fragmento funcional del mismo). Se conocen el ARNm, ADNc y las secuencias de polipéptido genómicos y funcionales correspondientes de genes y proteínas NPC1 y NPC2 de ser humano, ratón u otras especies, tal como se indicó anteriormente, y en particular están disponibles con los n.ºs de registro de GenBank: NM\_000271.4; NM\_008720.2; NM\_006432.3; NM\_023409.4; y los polipéptidos correspondientes NP\_000262.2; NP\_032746.2; NP\_006423.1; y NP\_075898.1.

60 Las secuencias de nucleótidos que codifican para genes *NPC1* o *NPC2* (o variantes de los mismos) pueden obtenerse mediante cualquier técnica de biología molecular conocida, incluyendo clonación, síntesis o amplificación por PCR. Los oligonucleótidos para su uso en reacciones y/o sondas de amplificación para su uso en clonación de genes pueden sintetizarse u obtenerse de otra manera mediante cualquier medio conocido y basándose en las secuencias de nucleótidos que flanquean el gen deseado o la región codificante que codifican para los genes diana NPC1 o NPC2. Los métodos y técnicas para la clonación de genes y/o amplificación por PCR se conocen bien en la técnica y se comentan en otra parte en el presente documento.

65 Los constructos de terapia génica descritos en el presente documento también comprenden un vector (o vector de expresión de terapia génica) en el que el gen de interés (por ejemplo, gen *NPC1* o *NPC2*) se clona o que incluye de



otra manera el gen de interés de una manera tal que las secuencias de nucleótidos del vector permitan la expresión (constitutiva o por el contrario regulada de alguna manera) del gen de interés. Los constructos de vectores descritos en el presente documento incluyen cualquier vector de expresión génica adecuado que puede administrarse a un tejido de interés (por ejemplo, SNC) y que se proporcionará para la expresión del gen de interés en el tejido seleccionado de interés (por ejemplo, SNC). En una realización preferida, el vector de terapia génica puede administrarse eficazmente a un tejido del sistema nervioso central, incluyendo la columna vertebral y el cerebro, y en particular, puede cruzar la barrera hematoencefálica del cerebro.

En una realización preferida, el vector es un vector de virus adeno-asociado (VAA) debido a la capacidad de los vectores de VAA para cruzar la barrera hematoencefálica y la transducción de tejido neuronal. En los métodos dados a conocer en el presente documento, puede usarse VAA de cualquier serotipo, aunque en determinadas realizaciones, es ventajoso usar un vector que puede experimentar transporte axónico retrógrado en un cerebro inmunodeprimido por la enfermedad. El serotipo del vector viral usado en determinadas realizaciones de la invención se selecciona del grupo que consiste en VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAArh8, VAArh10, VAArh33, VAArh34, VAA Anc80, VAA PHP.B, y otros (véanse, por ejemplo, Gao *et al.* (2002) PNAS, 99:11854-11859; y *Viral Vector for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Humana Press, 2003, incorporados en el presente documento como referencia). También se contempla otro serotipo además de los enumerados en el presente documento. En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, se usa VAA 2/9. Las composiciones y los métodos dados a conocer en el presente documento también pueden usar vectores quiméricos de VAA, mediante lo cual se fusionan porciones de VAA con otros vectores similares, tales como adenovirus.

Los vectores de VAA se derivan de parvovirus de ADN monocatenario (mc) que no son patógenos para los mamíferos (revisados en Muzyscka (1992) *Curr. Top. Microb. Immunol.*, 158:97-129, incorporado en el presente documento como referencia). En resumen, los vectores basados en VAA tienen los genes virales *rep* y *cap* que representan el 96% del genoma viral eliminado, dejando las dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de 145 pares de bases (pb) flanqueantes, que se usan para iniciar la replicación, empaquetamiento e integración del ADN viral. En ausencia de un virus auxiliar, el VAA de tipo natural 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 manera episómica. Una única partícula de VAA puede acomodar hasta 5 kb de ADNmc, por tanto, dejando aproximadamente 4,5 kb para un transgén y elementos regulatorios, que es normalmente suficiente. Sin embargo, los sistemas de corte y empalme en trans tal como se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 6.544.785, pueden casi duplicar este límite.

En una realización ilustrativa, la estructura principal del VAA, que comprende secuencias entre dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de VAA, se pseudotipa usando la cápsida de serotipo 2 para crear un vector de VAA2. El virus adenoasociado de muchos serotipos, especialmente VAA2, se han estudiado y se caracterizan de manera extensa como vectores de terapia génica. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con la preparación de vectores de terapia génica basados en VAA funcionales. Numerosas referencias a diversos métodos de producción, purificación y preparación de VAA para la administración a sujetos humanos pueden encontrarse en la extensa colección de bibliografía publicada (véase, por ejemplo, *Viral Vector for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Humana Press, 2003, incorporado en el presente documento como referencia). De manera adicional, se ha descrito la terapia génica basada en VAA dirigida a células del SNC en las patentes de EE.UU. n.ºs 6.180.613 y 6.503.888 (cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia).

Opcionalmente, la cápsida viral de VAA es VAA2/9, VAA9, VAArh8, VAArh10, VAA Anc80 o VAA PHP.B.; sin embargo, el serotipo de la cápsida viral usado en determinadas realizaciones de la invención puede seleccionarse entre cápsidas virales conocidas, incluyendo cápsidas virales de VAA de otros serotipos conocidos.

Opcionalmente, el vector de terapia génica, por ejemplo, vector de VAA o basado en VAA, puede modificarse para mejorar la captación del virus en el tejido diana de interés (por ejemplo, SNC), la estabilidad viral y el tropismo. Por ejemplo, la cápsida de un vector de VAA puede modificarse con un ligando (por ejemplo, molécula pequeña, péptido, o polipéptido u otra biomolécula que se produce de manera sintética o natural) que se une a un receptor en o dentro del tejido de interés (por ejemplo, SNC). Son posibles otras modificaciones para mejorar y/o potenciar las propiedades funcionales del vector que se usa tanto para seleccionar como diana el tejido de interés como para permitir que el constructo entre y transduzca de manera eficaz las células diana. Tales modificaciones estarán dentro del conjunto de experiencias de una persona que tiene experiencia habitual en la técnica.

La información adicional en cuanto al uso de vectores de VAA puede encontrarse en la técnica, por ejemplo, en 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, cada uno de los cuales se incorporan en el presente documento como referencia. Además, estos vectores virales pueden transducir una variedad de tipos de células del SNC, incluyendo neuronas, cuando se administran por la vía sistémica, vía intratecal o mediante inyección directa en el cerebro.

Tal como se contempla adicionalmente en el presente documento, los vectores de terapia génica pueden comprender un transgén (por ejemplo, *NPC1* o *NPC2*) que se une de manera operativa a un promotor u otros elementos de control transcripcionales y/o traduccionales genéticos. Determinados vectores de VAA modificados por

ingeniería previamente con o que comprenden promotores pueden obtenerse de fuentes públicas, incluyendo, por ejemplo [www.vectorbiolabs.com](http://www.vectorbiolabs.com) o [www.addgene.org](http://www.addgene.org).

5 En otra realización particular, las composiciones y los métodos dados a conocer utilizan un vector de VAA junto con un promotor del factor de elongación 1 alfa (también conocido como promotor del EF1 $\alpha$ ) (SEQ ID NO: 8, figura 11) que es constitutivo y se expresa en tejidos neuronales. Para el fin de este documento, EF1 $\alpha$  puede ser intacto o truncado y los términos EF1 $\alpha$  o EF1 $\alpha$  (corto) o miniEF1 $\alpha$  pueden usarse de manera intercambiable. Además, EF1 $\alpha$  es igual que Efla y puede obtenerse de ser humano o ratón.

## 10 Métodos de tratamiento

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar una enfermedad o un trastorno por almacenamiento de colesterol en mamíferos, tales como la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C. En realizaciones preferidas, las poblaciones tratadas mediante los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, pacientes que tienen o en riesgo de desarrollar una enfermedad o un trastorno por almacenamiento de colesterol, por ejemplo, la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C1, particularmente, si una enfermedad de este tipo afecta al SNC. En una realización ilustrativa, la enfermedad es la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C1.

20 En determinados aspectos de la invención, el método de tratamiento de una enfermedad o un trastorno por almacenamiento de colesterol comprende la administración de un vector de terapia génica de título alto descrito en el presente documento (por ejemplo, un vector de terapia génica basado en VAA) que porta un transgén terapéutico de manera que el producto de transgén se expresa a un nivel terapéutico en el SNC de un sujeto. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es de al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 x 10<sup>12</sup> cg/ml; (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 x 10<sup>9</sup> ut/ml; o (c) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 x 10<sup>10</sup> ui/ml. En realizaciones adicionales, la administración se realiza mediante inyección intraparenquimal directa de una disolución que comprende un vector de terapia génica de título alto descrito en el presente documento (por ejemplo, un vector de terapia génica basado en VAA) en el cerebro enfermo, después de eso el transgén se expresa de manera distal, contralateral o ipsilateral, con respecto al sitio de administración a un nivel terapéutico de al menos 2, 3, 5, 8 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 mm desde el sitio de administración.

30 En realizaciones adicionales, la administración se realiza mediante inyección intratecal directa de una disolución que comprende un vector de terapia génica de título alto descrito en el presente documento (por ejemplo, un vector de terapia génica basado en VAA) en el compartimento del líquido cefalorraquídeo, como es corriente para médicos de la técnica, y después de eso el transgén se expresa de manera distal, contralateral, ipsilateral y global en el SNC, con respecto al sitio de administración a un nivel terapéutico de al menos 2, 3, 5, 8 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 mm desde el sitio de administración.

40 En determinadas realizaciones, el producto de transgén (por ejemplo, polipéptido NPC1 o NPC2) se expresa a un nivel terapéutico en un segundo sitio dentro del SNC distal al primer sitio. La distancia entre los sitios primero y segundo se define como la región de distancia mínima entre el sitio de administración (primer sitio) y el límite de la transducción detectable del sitio distal (segundo sitio) tal como se mide usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, obtención de imágenes por resonancia magnética incluyendo espectroscopía o biopsia directa del cerebro. Algunas neuronas en el SNC de mamíferos mayores pueden abarcar grandes distancias en virtud de sus proyecciones axónicas. Por ejemplo, en seres humanos, algunos axones pueden abarcar una distancia de 1000 mm o mayor. Por tanto, en diversos métodos de la invención, un vector de terapia génica de la invención puede transportarse de manera axónica a lo largo de toda la longitud del axón a una distancia tal como para alcanzar y transducir el soma original.

50 Un sitio de administración de vector dentro del SNC puede elegirse basándose en la región diana deseada de neuropatología y, opcionalmente, la topología de los circuitos cerebrales implicados cuando un sitio de administración y la región diana tienen conexiones axónicas. En determinadas realizaciones, la región diana puede definirse, por ejemplo, usando coordenadas estereotácticas en 3 dimensiones. En algunas realizaciones, el sitio de administración se elige de manera que al menos el 0,1, el 0,5, el 1, el 5 ó el 10% de la cantidad total del vector inyectado se administra de manera distal a la región diana de al menos 1, 200, 500 ó 1,000 mm<sup>3</sup>. Un sitio de administración puede localizarse en una región innervada por las neuronas de proyección que conectan regiones distales del cerebro. Por ejemplo, la sustancia negra y el área ventrosegmentaria envían proyecciones densas al caudado y al putamen (conocidos de manera conjunta como el cuerpo estriado). Las neuronas dentro de la sustancia negra y el tegmento ventral pueden seleccionarse como diana para la transducción mediante transporte retrógrado de un constructo de terapia génica descrito en el presente documento (por ejemplo, vector basado en VAA) seguido por inyección en el cuerpo estriado. Como otro ejemplo, el hipocampo recibe proyecciones axónicas predecibles bien definidas de otras regiones del cerebro. Otros sitios de administración pueden localizarse, por ejemplo, en la médula espinal, el tronco encefálico (bulbo raquídeo y protuberancia), mesencéfalo, cerebelo, diencefalo (tálamo, hipotálamo), telencefalo (cuerpo estriado, corteza cerebral, o, dentro de la corteza, los lóbulos occipital, temporal, parietal o frontal), o combinaciones de los mismos.

65 Para la identificación de estructuras en el cerebro humano, véanse, por ejemplo, The Human Brain: Surface, Three-

Dimensional Sectional Anatomy With MRI, and Blood Supply, 2ª ed., editores Deuteron *et al.*, Springer Vela, 1999; Atlas of the Human Brain, editores Mai *et al.*, Academic Press; 1997; y Co-Planar Sterotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging, editores Tamarack *et al.*, Thyme Medical Pub., 1988. Para la identificación de estructuras en el cerebro de ratón, véase, por ejemplo, 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 seres humanos y roedores, muestran una organización topográfica similar de las proyecciones de corteza entorrinal-hipocampo, con neuronas en la parte lateral de la corteza entorrinal tanto lateral como media que se proyecta a la parte dorsal o polo septal del hipocampo, mientras que la proyección al hipocampo ventral se origina principalmente a partir de las neuronas en las partes medias de las corteza entorrinal (Principles of Neural Science, 4ª ed., editors, Kandel *et al.*, McGraw-Hill, 1991; The Rat Nervous System, 2ª ed., editor 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 exteriores de la capa molecular de la circunvolución dentada. Los axones de las células de la capa III se proyectan de manera bilateral a las áreas del *Cornu ammonis* CA1 y CA3 del hipocampo, terminando en la capa molecular del estrato lacunoso.

En determinadas realizaciones, es sitio diana puede localizarse en cualquier región del SNC, incluyendo el cerebro y la médula espinal, que contiene neuronas que se proyectan al primer sitio (de administración). En algunas realizaciones, el segundo sitio está en una región del SNC elegida de la sustancia negra, el bulbo raquídeo o la médula espinal.

Para administrar un vector de terapia génica descrito en el presente documento específicamente a una región particular del sistema nervioso central, especialmente a una región particular del cerebro, puede administrarse mediante microinyección estereotáctica. Por ejemplo, el día de la cirugía, los pacientes tendrán la base del marco estereotáctico fijada en su lugar (atornillada en el cráneo). Se obtendrán imágenes del cerebro con la base del marco estereotáctico (compatible con MRI con marcados fiduciales) usando MRI de alta resolución. Las imágenes de MRI se transferirán luego a un ordenador que ejecute un software estereotáctico. Una serie de imágenes frontales, sagitales y axiales se usarán para determinar el sitio diana de la inyección del vector y la trayectoria. El software traduce directamente la trayectoria en coordenadas tridimensionales apropiadas para el marco estereotáctico. Se perforan orificios de trepanación por encima del sitio de entrada y se localiza el aparato estereotáctico con la aguja implantada a la profundidad dada. Luego se inyectará el vector en un portador farmacéuticamente aceptable. Luego se administra el vector de VAA mediante inyección directa al sitio diana principal y se transporta de manera retrógrada a los sitios diana distales a través de los axones. Pueden usarse vías de administración adicionales, por ejemplo, aplicación cortical superficial bajo visualización directa, u otra aplicación no estereotáctica.

Opcionalmente, también puede realizarse una administración no al SNC, por ejemplo, para trastornos o enfermedades por almacenamiento de colesterol en los que también puede ser deseable una administración no al SNC. Tal administración no al SNC de las composiciones (por ejemplo, constructos) de la presente invención puede realizarse junto con o como una alternativa a la administración al SNC. En determinadas realizaciones de este tipo, puede realizarse la inyección, por ejemplo, inyección intravenosa, intraperitoneal, etc. usando las composiciones de la presente invención. Se considera también la administración directa a nervios periféricos grandes.

En aún otro método, un vector de VAA adecuado configurado para expresar NPC1 o NPC2 puede encapsidarse con una cápsida conocida para lograr la transducción de la barrera hematoencefálica y la penetración adicional del SNC y sus elementos. En esta realización, el vector de VAA puede administrarse de manera sistémica, mediante infusión i.v., y generar corrección tanto periférica como del SNC, dependiendo del promotor y el serotipo del vector.

El volumen total de material que va a administrarse y el número total de partículas de vector que van a administrarse serán determinados por los expertos en la técnica basándose en los aspectos de terapia génica conocidos. Puede someterse a prueba la eficacia terapéutica y la seguridad en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, para la NPC, en cualquier modelo de ratón *Npc1<sup>-/-</sup>* como los ratones homocigotos *Npc<sup>nih</sup>*.

En ratones de experimentación, el volumen total de disolución de vector inyectado, por ejemplo, vector de VAA, es de, por ejemplo, entre 1 a 10  $\mu$ l. Para otros mamíferos, incluyendo el cerebro humano, los volúmenes y tasas de administración se escalan de manera apropiada. Por ejemplo, se ha demostrado que volúmenes de 150  $\mu$ l puede inyectarse de manera 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 de la vía de inyección, si es necesario. Pueden usarse múltiples sitios de inyección. Por ejemplo, en algunas realizaciones, además del primer sitio de administración, una composición que comprende un vector de terapia génica descrito en el presente documento que porta un transgén se administra en otro sitio que puede ser contralateral o ipsilateral con respecto al primer sitio de administración.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de administración de un producto de transgén a una célula diana del SNC, que es una neurona o un neuroglíocito, en un mamífero afectado por una enfermedad o un trastorno por almacenamiento de colesterol, por ejemplo, la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C. El método comprende

poner en contacto una terminación axónica de una neurona con una composición que comprende un vector de VAA que porta al menos una parte de un gen que codifica para un producto de transgén terapéutico, por ejemplo, NPC1; permitir la endocitosis y el transporte de manera retrógrada de las partículas virales a lo largo del axón al núcleo de la neurona; permitir la expresión y el transporte del producto de transgén dentro de la(s) membrana(s) de la neurona, en el que el producto de transgén alivia de ese modo la patología relacionada con el almacenamiento de colesterol. En algunas realizaciones, la concentración del vector de VAA en la composición es de al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó  $50 \times 10^{12}$  cg/ml; (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó  $50 \times 10^9$  ut/ml; o (c) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó  $50 \times 10^{10}$  ui/ml.

La presente invención proporciona métodos tanto profilácticos como terapéuticos de tratamiento de un sujeto en riesgo de (o susceptible a) una enfermedad o un trastorno producido, en su totalidad o en parte, por el almacenamiento de colesterol alterado, que puede tratarse opcionalmente a través de administración selectiva o sistémica de un vector de terapia génica que contiene NPC1 y/o NPC2 a un sujeto.

En determinados aspectos, la invención proporciona un método para prevenir en un sujeto, una enfermedad o un trastorno tal como se describe en el presente documento (incluyendo, por ejemplo, NPC), administrando al sujeto una composición de terapia génica. Los sujetos en riesgo por la enfermedad pueden identificarse mediante, por ejemplo, uno o una combinación de ensayos diagnósticos o pronósticos conocidos en la técnica (por ejemplo, evaluación genética del sujeto y/o evaluación fenotípica). La administración de un agente profiláctico puede producirse antes de la detección de, por ejemplo, la NPC en un sujeto, o la manifestación de síntomas característicos de la enfermedad o el trastorno, de manera que se previene o, alternativamente, se retrasa la progresión de la enfermedad o el trastorno.

Otro aspecto de la invención se refiere a métodos de tratamiento de sujetos de manera terapéutica, es decir, que alteran la aparición de síntomas de la enfermedad o el trastorno. Estos métodos pueden realizarse *in vitro* (por ejemplo, cultivando la célula con la composición de terapia génica) o, alternativamente, *in vivo* (por ejemplo, administrando la composición de terapia génica a un sujeto).

Con respecto a los métodos tanto profilácticos como terapéuticos de tratamiento, tales tratamientos pueden adaptarse o modificarse específicamente, basándose en el conocimiento obtenido del campo de la farmacogenómica. Tal como se usa en el presente documento, "farmacogenómica" se refiere a la aplicación de tecnologías genómicas tales como secuenciación genética, genética estadística y análisis de expresión génica a fármacos en desarrollo clínico y a la venta. Más específicamente, el término se refiere al estudio de cómo los genes de un paciente determinan su respuesta a un fármaco (por ejemplo, un "fenotipo de respuesta al fármaco" o "genotipo de respuesta al fármaco" del paciente). Por tanto, otro aspecto de la invención proporciona métodos para adaptar un tratamiento profiláctico o terapéutico del individuo con el transgén de terapia génica de la presente invención al genotipo de respuesta al fármaco del individuo. La farmacogenómica permite al médico clínico o médico dirigir tratamientos profilácticos o terapéuticos a pacientes que se beneficiarán más del tratamiento y para evitar el tratamiento de pacientes que experimentarán efectos secundarios tóxicos relacionados con el fármaco.

#### Composiciones de terapia génica

La invención, en parte, se refiere a una composición de terapia génica que comprende los vectores que proporcionan NPC tal como se describe en el presente documento. La composición de terapia génica de la invención puede aumentar la entrada a una célula o un tejido, por ejemplo, una célula o un tejido del SNC, para tratar o prevenir la enfermedad de NPC o mitigar las complicaciones, tales como enfermedad hepática, empeoramiento neurológico o convulsiones.

Ventajosamente, la composición de terapia génica de la invención contempla una administración controlada de un gen activo, especialmente un gen terapéutico, a un sitio de acción a una tasa óptima y dosis terapéutica. Por tanto, pueden obtenerse mejoras en el índice terapéutico modulando la distribución del principio activo en el cuerpo y/o modulando el promotor usado en tal constructo de terapia génica. La asociación del vector de terapia génica y/o el vector viral que contiene tal vector de terapia génica con un sistema de administración permite, en particular, su administración específica al sitio de acción o su expresión controlada de un gen después de seleccionar como diana el sitio de acción. Reduciendo la cantidad de vector activo de terapia génica que se distribuye a cualquier compartimento en el que su presencia no se desea, es posible aumentar la eficacia del agente de terapia génica, y reducir cualquier efecto secundario tóxico o incluso modificar o restablecer la actividad de los agentes de terapia génica. En esta solicitud, el serotipo de la cápsida puede influir en la vía de administración, la eficacia de la transducción celular y la dosis requerida para un efecto terapéutico. El promotor del vector dicta además la expresión de tipo celular es decir, en todas las células o sólo en neuronas y el grado al que se produce la expresión al nivel celular. Como tales, algunos promotores son más fuertes que otros, y producen mayor expresión transgénica. En otra realización, los sitios de unión de microARN (ARNmi) están incorporados en la región no traducida 3' del transgén terapéutico para proporcionar una inhibición específica celular de traducción si el producto de transgén NPC es tóxico en un tipo celular en comparación con otro. Este enfoque reducirá la expresión diana en tipos celulares distintos de las neuronas si es necesario.

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas o diagnósticas que comprenden los vectores que incluyen NPC de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Como tales, ARN o ADN directo o formas modificadas si se consideran tales, incluyendo un péptido o ácidos nucleicos modificados covalentemente, inyecciones en el cerebro u otros emplazamientos usando los transgenes terapéuticos descritos en esta solicitud. En otra realización, se usan nanopartículas que contienen ácidos nucleicos que codifican para NPC1 para la administración de genes. La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" se reconoce en la técnica e incluye un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable, adecuado para administrar compuestos usados en los métodos descritos en el presente documento a sujetos, por ejemplo, mamíferos. Los portadores incluyen una carga líquida o sólida, un diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, implicados en llevar o transportar el agente objeto desde un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada portador puede ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la formulación y no ser perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; goma tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semillas de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes de tamponamiento, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; disolución de Ringer; alcohol etílico; disoluciones de tampón fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en las formulaciones farmacéuticas. Se describen portadores farmacéuticos adecuados en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, un texto de referencia habitual en este campo.

En determinadas realizaciones, la presente invención contempla una composición de vector viral que comprende un agente de terapia génica (por ejemplo, NPC1 o NPC2 unido operativamente a un promotor sistémico o específico de tejido, opcionalmente dentro de un plásmido que corresponde a la forma del sistema de administración viral empleado, por ejemplo, un plásmido del vector viral VAA) de la presente invención. El vector activo viral puede formularse de manera adecuada e introducirse en el ambiente de la célula mediante cualquier medio que permita que una porción suficiente de la muestra entre en la célula para inducir la expresión del agente de terapia génica, si se produce. Muchas formulaciones para VAA y otra administración de terapia génica basada en vectores se conocen en la técnica y pueden usarse.

Tales composiciones pueden incluir el agente de terapia génica y un portador farmacéuticamente aceptable. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones. La cápsida de VAA puede modificarse asimismo para mejorar la captación y estabilidad viral, y alterar el tropismo.

Una composición de terapia génica puede formularse para ser compatible con su vía prevista de administración. Los ejemplos de vías de administración incluyen parenteral, por ejemplo, administración intravenosa, intracraneal, intratecal, intraventricular, intramuscular, intrahepática, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación, bucal, sublingual, intranasal), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Los ácidos nucleicos pueden administrarse usando estimulación eléctrica o magnética, o captación física directa usando presión hidrodinámica. Las disoluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encapsularse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples fabricados en vidrio o plástico.

Las composiciones de terapia génica adecuadas para un uso inyectable pueden incluir disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, en determinadas realizaciones, los portadores pueden incluir solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL® (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). Sin embargo, la técnica tal como se refiere a un vector de administración viral específico será conocida por el experto en la técnica y proporcionará los constituyentes apropiados para una composición de vector de terapia génica. Una composición para inyección puede ser estéril (aparte del VAA u otro vector viral empleado para la administración) y deberá ser fluida en la medida que exista una inyectabilidad fácil. En determinadas realizaciones, tales composiciones son estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se protegen contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. Los portadores a modo de ejemplo pueden ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y

antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse aproximadamente incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando los vectores de terapia génica dados a conocer en el presente documento en la cantidad requerida en un disolvente seleccionado con uno o una combinación de componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y liofilización que proporciona un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución esterilizada por filtración previamente de la misma.

Las preparaciones de VAA de alto título pueden producirse usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.658.776 y *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, editor Machida, Humana Press, 2003.

Para la administración por inhalación, las composiciones de administración de genes pueden administrarse en forma de un pulverizador de aerosol de un recipiente o dispensador a presión que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tales como dióxido de carbono, o un nebulizador. Tales métodos incluyen los descritos en la patente de EE.UU. n.º 6.468.798, que se incorpora en el presente documento como referencia.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivos celulares y los estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de tales composiciones está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE<sub>50</sub> con poca o sin toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para las composiciones usadas en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Una dosis puede formularse en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración de plasma circulante que incluye la CI<sub>50</sub> (es decir, la concentración de las composiciones de prueba que logra una inhibición a la mitad del máximo de los síntomas) tal como se determina en el cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Los constructos de expresión de la invención pueden administrarse a un sujeto mediante, por ejemplo, inhalación, por vía oral, inyección intravenosa, administración local (véase la patente de EE.UU. n.º 5.328.470) o mediante inyección estereotáctica (véase por ejemplo, Chen *et al.* (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3054-3057) o mediante cualquier vía de administración mencionada anteriormente. La preparación farmacéutica del vector de administración puede incluir el vector en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que se incluye un vehículo de administración. Alternativamente, donde el vector de administración completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración de genes.

Los constructos de expresión pueden ser constructos adecuados para su uso en el sistema de expresión apropiado e incluyen, pero no se limitan a vectores retrovirales, casetes de expresión lineal, ARNm modificados, plásmidos y vectores virales o derivados de manera viral, tal como se conocen en la técnica. Los ácidos nucleicos pueden modificarse covalentemente, tal como ácidos nucleicos peptídicos o ácidos ribonucleicos modificados con bases. Tales constructos de expresión pueden incluir uno o más promotores tal como se detalla en otra parte en el presente documento.

Deben introducirse cantidades adecuadas de una composición de terapia génica y estas cantidades pueden determinarse de manera empírica usando métodos convencionales.

La composición de terapia génica puede formularse como una composición que comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un transgén y/o vector viral que contiene un transgén, y un portador farmacéuticamente aceptable. Una cantidad farmacológica o terapéuticamente eficaz se refiere a esa cantidad de agente de terapia génica eficaz para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo previsto. Las expresiones "cantidad farmacológicamente eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" o simplemente "cantidad eficaz" se refieren a esa cantidad de un transgén de terapia génica eficaz para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo previsto. Por ejemplo, si un tratamiento clínico dado se considera eficaz cuando existe al menos el 20% de aumento en un parámetro medible asociado con una enfermedad o un trastorno, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de terapia génica para el tratamiento de esa enfermedad o ese trastorno es la cantidad necesaria para efectuar al menos el 20% de aumento en ese parámetro. En otro ejemplo, si un tratamiento clínico dado se considera eficaz cuando existe al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el

60%, el 70% o el 80% o más de aumento en un parámetro medible asociado con una enfermedad o un trastorno, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de terapia génica para el tratamiento de esa enfermedad o ese trastorno es la cantidad necesaria para efectuar al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70% o el 80% o más de aumento en ese parámetro.

5

#### Marcadores de expresión/actividad de transgenes

La toxicidad y eficacia terapéutica de las composiciones de administración de genes pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos habituales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la  $DL_{50}$  (la dosis letal para el 50% de la población) y la  $DE_{50}$  (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La razón de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la razón  $DL_{50}/DE_{50}$ . Se prefieren composiciones de terapia génica que presentan altos índices terapéuticos. Aunque pueden usarse composiciones de terapia génica que presentan efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado para diseñar un sistema de administración que dirige tales composiciones al sitio del tejido afectado para minimizar el posible daño a células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

10

15

En determinadas realizaciones, la localización de la membrana, incluyendo la localización intracelular de un transgén o producto del mismo, por ejemplo, NPC1, se evalúa en el sujeto y/o en las células del sujeto. En otras realizaciones, la evaluación de la eficacia de la administración de transgenes NPC1 se realiza a través de la medición de la captación del colesterol (por ejemplo, captación endocítica de colesterol) de las células de un sujeto y/o a través de la evaluación fenotípica de un sujeto antes y después de la administración de la(s) composición/composiciones de VAA-NPC. Tal evaluación puede realizarse en un plazo de días de administración de una composición de VAA-NPC de la invención, o puede realizarse en el momento de, por ejemplo, una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, un año o más posadministración. El uso de los biomarcadores descritos anteriormente tales como colesterol no esterificado, esfingomielina, bis(monoacilglicero)fosfato, glucosilceramida, lactosilceramida, globotriaosilceramida, esfingosina libre, gangliósidos GM2 y GM3; galectina 3 (LGALS3), una molécula proinflamatoria y catepsina D (CTSD), una proteasa aspártica lisosómica; y productos de oxidación de colesterol y neuroesteroides tales como colestano- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol ("trioleol"), un producto de oxidación de colesterol que se eleva 10 veces en el plasma de sujetos con NPC1 y 24(S)-hidroxicolesterol (24(S)-HC), un colesterol oxigenado generado de manera enzimática que se reduce en el plasma de sujetos con NPC1. La metabolómica no seleccionada como diana se prevé asimismo para monitorizar la eficacia y la actividad de terapia génica con VAA para la NPC.

20

25

30

En determinadas realizaciones, antes del tratamiento, se evalúa un sujeto para determinar la identidad de una deficiencia genética que ha producido la NPC en el sujeto, ya sea NPC1 o NPC2, y luego se le administra al sujeto un transgén NPC1 o NPC2 apropiado dependiendo del resultado de tal evaluación. En otra realización, el transgén que codifica para un transgén que ha sometido a optimización de codones para la expresión humana se denomina *coNPC1* o *coNPC2*. Los métodos para diagnosticar la enfermedad de NP pueden encontrarse, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.ºs 4.039.388, 5.686.240, 6.426.198 y 7.045.675 cada una de las cuales se incorpora como referencia.

35

40

La invención proporciona además un método para tratar trastornos relacionados de acumulación de colesterol no esterificado, tal como aterosclerosis.

45

50

El nivel o actividad de un ARNm o polipéptido de transgén puede determinarse mediante un método adecuado conocido actualmente en la técnica o que se desarrolle posteriormente, por ejemplo, analizando los niveles de expresión mediante PCR, hibridación, microalineamientos u otras metodologías similares. Los cebadores, sondas y oligonucleótidos adecuados para realizar tal detección se conocerán y obtendrán fácilmente en la técnica. Puede apreciarse que el método usado para medir un ARNm transgénico y/o la expresión de una proteína transgénica puede depender de la naturaleza del transgén. Tales mediciones pueden realizarse sobre células, extractos celulares, tejidos, extractos de tejidos u otro material de fuentes adecuadas.

La determinación de si la expresión de un transgén se ha aumentado puede ser mediante un método adecuado que puede detectar de manera fiable cambios en los niveles de ARN o proteínas. En determinadas realizaciones, la determinación se realiza introduciendo en el ambiente de una célula una composición de terapia génica de la invención de manera que al menos una porción del vector de terapia génica entra en el citoplasma (opcionalmente, el núcleo; opcionalmente, con integración cromosómica nuclear), y luego midiendo el nivel del ARN y/o polipéptido de transgén. La misma medición se realiza en células no tratadas idénticas y se comparan los resultados obtenidos a partir de cada medición.

55

60

#### Terapias de combinación

Se contempla que las composiciones de la presente invención puedan combinarse con otras terapias propuestas (por ejemplo, para NPC) para ralentizar la progresión de la enfermedad y mejorar los síntomas, incluso en pacientes con enfermedad avanzada. No existen criterios publicados de cuidados para la NPC aparte del tratamiento sintomático de las manifestaciones de la enfermedad, las convulsiones se controlan como sea posible y se

65

proporciona cuidado complementario según sea necesario. En una realización, la terapia génica con VAA se combinará con el excipiente farmacéutico 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD). En otra, la terapia génica con VAA se combinará con terapias que muestran que tienen una eficacia modesta en estudios de modelos de ratón o de cultivos celulares incluyendo el tratamiento con antioxidantes tales como N-acetilcisteína; vitamina E o derivados tales como  $\alpha$ -tocoferol o  $\delta$ -tocoferol; miglustat, un pequeño azúcar de imino que inhibe parcialmente la glucosilceramida sintasa y la síntesis de todos los glicoesfingolípidos basados en glucosilceramida; curcumina para compensar el defecto de calcio lisosómico elevando el calcio citosólico; el fármaco antiinflamatorio no esteroideo ibuprofeno o compuestos relacionados para reducir la inflamación del sistema nervioso central; donepezilo, un inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChE) ampliamente usados; o inhibidores de histona desacetilasa (HDACi) tal como vorinostat. En otra realización, la terapia génica con VAA se combinará con otras terapias que tienen una base teórica para la eficacia, tales como las que influyen en el metabolismo del colesterol, pero tienen eficacia limitada hasta la fecha. Estas incluyen los agentes que reducen el colesterol colestiramina, lovastatina y ácido nicotínico así como una dieta baja en colesterol.

## 15 Dosificación

Las cantidades de dosificación en seres humanos pueden determinarse inicialmente extrapolando a partir de la cantidad usada en ratones, tal como un experto en la técnica reconoce es corriente en la técnica modificar la dosificación para seres humanos en comparación con los modelos animales. En determinadas realizaciones se prevé que la dosificación puede variar desde entre aproximadamente 1 mg de compuesto/kg de peso corporal hasta aproximadamente 5000 mg compuesto/kg de peso corporal; o desde aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 4000 mg/kg de peso corporal o desde aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 3000 mg/kg de peso corporal; o desde aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 2000 mg/kg de peso corporal; o desde aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal; o desde aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal. En otras realizaciones esta dosis puede ser aproximadamente de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 mg/kg de peso corporal. En otras realizaciones, se prevé que puedan usarse dosis mayores, tales dosis pueden estar en el intervalo de aproximadamente 5 mg compuesto/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg compuesto/kg de peso corporal. En otras realizaciones las dosis pueden ser de aproximadamente 8, 10, 12, 14, 16 ó 18 mg/kg de peso corporal. Por supuesto, esta cantidad de dosificación puede ajustarse hacia arriba o hacia abajo, tal como se hace de manera corriente en tales protocolos de tratamiento, dependiendo de los resultados de los ensayos clínicos iniciales y las necesidades de un paciente particular.

En determinadas realizaciones, una unidad de dosificación adecuada de un vector de transgén está en el intervalo de 0,001 a 0,25 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor por día, o en el intervalo de 0,01 a 20 microgramos por kilogramo de peso corporal por día, o en el intervalo de 0,001 a 5 microgramos por kilogramo de peso corporal por día, o en el intervalo de 1 a 500 nanogramos por kilogramo de peso corporal por día, o en el intervalo de 0,01 a 10 microgramos por kilogramo de peso corporal por día, o en el intervalo de 0,10 a 5 microgramos por kilogramo de peso corporal por día, o en el intervalo de 0,1 a 2,5 microgramos por kilogramo de peso corporal por día. Una composición de terapia génica que comprende el transgén puede administrarse una vez o en múltiples ocasiones.

Los datos pueden obtenerse a partir de ensayos de cultivos celulares y estudios con animales para formular un intervalo de dosificación adecuado para los seres humanos. La dosificación de las composiciones de la invención puede estar dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE<sub>50</sub> (tal como se determina mediante métodos conocidos) con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para una composición usada en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Una dosis puede formularse en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración de plasma circulante de la composición que incluye la CI<sub>50</sub> (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza una inhibición a la mitad del máximo de los síntomas) tal como se determina en el cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles de una composición de terapia génica en plasma pueden medirse mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

En determinadas realizaciones, la dosificación puede ser en cuanto a la concentración de vector. Por ejemplo, la concentración de vector de terapia génica descrito en el presente documento es al menos de: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 x 10<sup>12</sup> cg/ml; (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 x 10<sup>9</sup> ut/ml ("unidades de transducción por ml"); (c) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 x 10<sup>10</sup> ui/ml ("unidades internacionales por ml"), o (d) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ó 50 x 10<sup>10</sup> ufp/ml ("unidades formadoras de placas por ml").

## 65 Kits y/o envases farmacéuticos

Las composiciones de terapia génica de la invención pueden incluirse en un kit y/o envase, recipiente, paquete o



dispensador farmacéutico junto con las instrucciones para la administración.

La divulgación proporciona kits para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, por ejemplo, enfermedad de NP, tipo C. En una realización, el kit incluye una composición terapéutica o profiláctica que contiene una cantidad eficaz de un agente de la invención (por ejemplo, NP) en una forma de dosificación unitaria. En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente estéril que contiene un compuesto terapéutico o profiláctico; tales recipientes pueden ser cajas, ampollas, frascos, viales, tubos, bolsas, bolsitas, envases tipo blíster u otras formas de recipientes adecuadas conocidas en la técnica. Tales recipientes pueden fabricarse de plástico, vidrio, papel laminado, lámina metálica u otros materiales adecuados para contener medicamentos.

Si se desea un agente de la divulgación se proporciona junto con las instrucciones para administrarlo a un sujeto que tiene o en riesgo de desarrollar una enfermedad. Las instrucciones incluirán generalmente información sobre el uso de la composición para el tratamiento o la prevención de la enfermedad (por ejemplo, NPC). En otras realizaciones, las instrucciones incluyen al menos uno de los siguientes: descripción del compuesto; pauta posológica y administración para el tratamiento o la prevención de la enfermedad o los síntomas de la misma; precauciones; advertencias; indicaciones; contraindicaciones; información de sobredosis; reacciones adversas; farmacología animal; estudios clínicos; y/o referencias. Las instrucciones pueden imprimirse directamente en el recipiente (cuando esté presente), o como una etiqueta aplicada al recipiente, o como una hoja, papel, tarjeta o folleto separado suministrado en o con el recipiente.

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante, genética, inmunología, biología celular, cultivo celular y biología transgénica, que están dentro de la experiencia de la técnica. Véanse, por ejemplo, Maniatis *et al.*, 1982, Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning, 2ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Sambrook y Russell, 2001, Molecular Cloning, 3ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Ausubel *et al.*, 1992, Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, incluyendo las actualizaciones periódicas); Glover, 1985, DNA Cloning (IRL Press, Oxford); Anand, 1992; Guthrie y Fink, 1991; Harlow y Lane, 1988, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Jakoby y Pastan, 1979; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins editores 1984); Transcription and Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins editores 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos editores, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, vols. 154 y 155 (Wu *et al.* editores), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, editores, Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, editores, 1986); Riott, Essential Immunology, 6ª edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Hogan *et al.*, Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986); Westerfield, M., The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), (4ª ed., Univ. of Oregon Press, Eugene, 2000).

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado tal como se entiende habitualmente por un experto habitual en la técnica a la que esta invención pertenece. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente invención, se describen métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos habituales en la técnica una divulgación y descripción completa de cómo realizar usar los métodos de ensayo, selección y terapéuticos de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores estiman como su invención.

### Ejemplos

La presente invención se describe en referencia a los siguientes ejemplos, que se ofrecen a modo de ilustración y no se pretende que limiten la invención de ninguna manera. Se utilizaron técnicas convencionales bien conocidas en la técnica o las técnicas específicamente descritas a continuación.

#### Ejemplo 1. Vector viral adeno-asociado (VAA) específico de neuronas para la administración de NPC1

Para desarrollar una nueva clase de agentes terapéuticos basados en genes para la NPC en seres humanos, se desarrollaron una serie de vectores virales adeno-asociados (VAA) para la administración del gen *NPC1*, en primer lugar a neuronas y luego a otros tipos celulares. Se modificó por ingeniería un gen *NPC1* para la expresión bajo el control del promotor de calmodulina. Se clonó este casete de expresión en un vector de VAA2 vacío, que creó VAA<sub>mini</sub>calmodulina-NPC1. Se encapsuló este vector con una cápsida de VAA de serotipo 9 y se usó para producir VAA2/9<sub>mini</sub>calmodulina-NPC.

Se realizó la eficacia preclínica de VAA<sub>-mini</sub>calmodulina-NPC como un tratamiento para la NPC *in vivo*. Ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* (n=9) recibieron  $1 \times 10^{12}$  GC de VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 o un control indicador equivalente, se administró VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-GFP (n=6), entre los días 20 y 25 de vida mediante inyección retroorbitaria. Para lograr la transducción neuronal, se contó con la propiedad bien establecida de los vectores de VAA9 para cruzar la barrera hematoencefálica y transducir neuronas después de la administración sistémica. En relación con los ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* no tratados o tratados con VAA-GFP [supervivencia media de 66 días], los ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* que recibieron VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 presentaron una esperanza de vida aumentada (supervivencia media de 105 días;  $P < 0,02$ ). La administración sistémica mediante inyección retroorbitaria de VAA2/9<sub>mini</sub>calmodulina-NPC en ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* dio como resultado una supervivencia aumentada y mitigación de los síntomas relacionados con la enfermedad. Estos resultados establecieron este VAA como un agente terapéutico de genes exitoso para la NPC.

#### Ejemplo 2. Vector viral adeno-asociado (VAA) para la administración de NPC1 y expresión ubicua

Se sintetizó también un vector similar que expresa el gen *NPC1* a partir del promotor del factor de elongación  $1 \alpha$  (EF1 $\alpha$ ).

Aunque el VAA2/9<sub>mini</sub>calmodulina-NPC dirigió la expresión de la NPC en neuronas, el VAA2/9<sub>mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC se espera que produzca una expresión más extendida, ya que el promotor del factor de elongación  $1 \alpha$  se sabe que dirige la expresión en todos los tipos celulares (ubicua). Este vector de terapia génica puede usarse para tratar síntomas neurológicos, hepáticos y otros extra-CNS en pacientes con la NPC. Se usó un promotor truncado para crearlo en primer lugar y el VAA que expresó la eGFP como control. Este VAA se denomina VAA<sub>-mini</sub>EF1 $\alpha$ -eGFP. A continuación, se extrajo la eGFP, se retiró el elemento WPRE, ambos se reemplazaron con el ADNc de NPC1 humano para crear VAA<sub>-mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC1 y se usó para tratar ratones *Npc1<sup>-/-</sup>*.

#### Ejemplo 3. Tratamiento terapéutico de sujetos con NPC usando un vector viral adeno-asociado (VAA) para la administración específica de neuronas de NPC1

Se identifican los sujetos humanos con NPC a través de métodos conocidos en la técnica, incluyendo opcionalmente la prueba genética de loci de *NPC1* y/o *NPC2* para confirmar los diagnósticos basados en fenotipos. Se les administra a los sujetos con NPC VAA<sub>-mini</sub>calmodulina-NPC (opcionalmente, VAA2/9<sub>mini</sub>calmodulina-NPC) mediante inyección como tratamiento para la NPC. Se usarán otros serotipos de VAA, tal como VAArh8 y VAArh10. Después de la inyección, se evalúan uno o más fenotipos asociados con la NPC (por ejemplo, incidencia de convulsiones) y biomarcadores (por ejemplo, gangliósidos, colesterol no esterificado) en sujetos con NPC tratados y/o el/los nivel(es) de expresión de ARNm o polipéptido NPC1 o NPC2 se mide(n) en las células de sujetos con NPC, y se compara(n) con un control adecuado (por ejemplo, mediciones iniciales antes del tratamiento, una población de control de sujetos con NPC, etc.). Se identifican de esa manera la eficacia terapéutica *in vivo* del tratamiento de terapia génica empleando el VAA y el vector de la invención VAA<sub>-mini</sub>calmodulina-NPC.

#### Ejemplo 4. Tratamiento terapéutico de sujetos con NPC, administración de NPC1 y expresión ubicua

Se identifican los sujetos humanos con NPC a través de métodos conocidos en la técnica, incluyendo opcionalmente la prueba genética de loci de *NPC1* y/o *NPC2* para confirmar los diagnósticos basados en fenotipos. Se les administra a los sujetos con NPC VAA<sub>-mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC1 (opcionalmente, VAA2/9VAA<sub>-mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC1) mediante inyección como tratamiento para la NPC. Se usarán otros serotipos de VAA, tal como VAArh8 y VAArh10. Después de la inyección, se evalúan uno o más fenotipos asociados con la NPC (por ejemplo, incidencia de convulsiones) y biomarcadores (por ejemplo, gangliósidos, colesterol no esterificado, medidas de función hepática) en sujetos con NPC tratados y/o el/los nivel(es) de expresión de ARNm o polipéptido NPC1 o NPC2 se mide(n) en las células de sujetos con NPC, y se compara(n) con un control adecuado (por ejemplo, mediciones iniciales antes del tratamiento, una población de control de sujetos con NPC, etc.). Se identifican de esa manera la eficacia terapéutica *in vivo* del tratamiento de terapia génica empleando el VAA y el vector de la invención VAA<sub>-mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC1.

#### Ejemplo 5. Transducción mediada por VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-GFP de poblaciones neuronales en ratones *Npc1<sup>-/-</sup>*

Se diseñó un vector de VAA que podía tanto transducir como expresar el gen *NPC1* humano en neuronas usando un pequeño promotor neuroespecífico, CaMKII (375 pb). Se seleccionó CaMKII porque podía clonarse en un vector de VAA con ADNc de *NPC1* (3,8 kb) dada la limitación de tamaño para el empaquetamiento de VAA. El tamaño final del vector de VAA incluyendo las ITR en los extremos 5' y 3', que flanqueaban el promotor de CaMKII, el ADNc de *NPC1* y una señal de poliadenilación, era de alrededor de 4,8 kilobases. Se empaquetó este constructo de vector usando una cápsida de serotipo 9, que ha demostrado que puede cruzar la barrera hematoencefálica después de la administración sistémica y puede ser muy eficaz en la transducción de neuronas. Para definir el tropismo y el patrón de expresión del vector de VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII *in vivo*, se usó un indicador que expresa el vector, verde fluorescente (VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-GFP). Se realizó una única inyección retroorbitaria de  $1 \times 10^{12}$  GC de VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-GFP en ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* en el día de vida 23. El patrón de expresión del promotor endógeno de CaMKII en un ratón adulto de tipo natural se muestran en la figura 16a. La obtención de imágenes de inmunohistoquímica de los ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* tratados con VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-GFP tomadas a las 9 semanas de edad mostró un patrón de expresión notablemente

similar, con fuerte expresión de GFP en el bulbo olfativo, la corteza cerebral, el cuerpo estriado y el hipocampo, con una expresión de GFP más débil a lo largo del mesencéfalo y rombencéfalo (figura 16b).

Al contrario que el patrón de expresión endógeno, se observó una pequeña incorporación cerebelosa (figura 16b). Se marcaron también todas las células positivas para GFP con NeuN, indicando que la expresión del producto génico viral sólo se produce en las neuronas (figura 16c). Las imágenes de aumento mayor de la corteza cerebral (figura 16d, e) y el campo CA3 del hipocampo (figura 16f, g) muestran claramente el doble marcado neuroespecífico (puntas de flecha) y la morfología neuronal de las células transducidas con VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-GFP.

10 Ejemplo 6. La administración de gen VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 mejora la supervivencia y retrasa la pérdida de la función motora y disminución de peso de ratones *Npc1*<sup>-/-</sup>

Para someter a prueba la eficacia de la terapia génica como tratamiento para la NPC en diferentes puntos de tiempos de administración, crías *Npc1*<sup>-/-</sup> (*n*=6) recibieron 2x10<sup>11</sup> GC de VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 entre los días 1 y 3 y los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> (*n*=9) recibieron 1x10<sup>12</sup> GC de VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 entre los días 20 y 25 de vida mediante inyección retroorbitaria. Un grupo de control de ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> (*n*=6) recibió 1x10<sup>12</sup> GC de VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-GFP entre los días 20 y 25 de vida administrado mediante inyección retroorbitaria. De acuerdo con informes previos, los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> no tratados (*n*=16) tenían una supervivencia media de 69 días y el tratamiento con VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-GFP de ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia con una supervivencia media de 65 días (figura 17a y b). En cambio, los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> que recibieron VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 a o bien 1-3 o bien 20-25 días de vida presentaron una esperanza de vida aumentada, con una supervivencia media de 97 y 103 días, respectivamente (*P*<0,001, figura 17a y b). Con relación a los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> no tratados, ratones NPC1<sup>-/-</sup> de la misma edad tratados con VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 a las 8-9 semanas de edad presentaron mejoras fisiológicas que correspondieron a una mejora objetiva en la función motora, donde los ratones parecía que mantenían su fuerza y coordinación para caminar y explorar la jaula con signos reducidos de temblor.

Aunque la administración de genes mejora tanto la supervivencia como la movilidad de ratones *Npc1*<sup>-/-</sup>, no tuvo un efecto significativo sobre la masa entre las 4 y 9 semanas. La semana en la que los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> alcanzaron su peso máximo o pico se usó para determinar si la administración de genes retrasa o previene la pérdida de peso que se produce en *Npc1*<sup>-/-</sup> no tratados (figura 17c). Tanto los ratones no tratados (*n*=16) como los tratados con VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-GFP (*n*=6) alcanzan de manera casi uniforme sus pesos máximos a las 6 semanas. Mientras, las crías *Npc1*<sup>-/-</sup> (*n*=6) que recibieron 2x10<sup>11</sup> GC de VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 entre los días 1 y 3 y los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> (*n*=9) que recibieron 1x10<sup>12</sup> GC de VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 entre los días 20 y 25 de vida en promedio alcanzan su peso máximo a las 8 semanas (en relación con ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> no tratados *P*<0,01 y *P*=0,08, respectivamente). Debido a que la disminución de peso de ratones no tratados comenzó a las 6 semanas y la mayoría de los ratones no tratados no sobrevivió más allá de las 9 semanas, se comparó el porcentaje de cambio de peso desde las 6 hasta las 9 semanas (% de cambio de peso (peso) = [peso<sub>9 semanas</sub> - peso<sub>6 semanas</sub>] / peso<sub>6 semanas</sub> x 100) de ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> no tratados, tratados con VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 y con VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-GFP (figura 17d). Los ratones no tratados y tratados con VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-GFP tuvieron un porcentaje de cambio de peso de -17% y -23%, respectivamente. En relación con los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> no tratados, las crías *Npc1*<sup>-/-</sup> tratadas a los 1-3 días y los ratones tratados a los 20-25 días con VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 demostraron una reducción significativa en la pérdida de peso, -3,8% (*P*<0,02) y -2,3% (*P*<0,001), respectivamente.

45 Ejemplo 7. El tratamiento con VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 aumenta la expresión de proteína NPC1 y reduce la acumulación intracelular de colesterol en regiones del cerebro afectadas por la enfermedad.

Se eligieron la capa V de la corteza cerebral (LV) y la capa piramidal CA3 del hipocampo (CA3) como estructuras del cerebro ideales para evaluar la eficacia de la administración de VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1. Las neuronas piramidales en estas regiones son propensas a altos niveles de acumulación de colesterol no esterificado, pero no muestran ninguna evidencia de muerte neuronal es este modelo de ratón, excluyendo la pérdida celular como un factor de confusión en el análisis. Se realizó la administración retroorbitaria de VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 en ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> en el día 23, con inyecciones de control de PBS realizadas en los animales *Npc1*<sup>-/-</sup> y *Npc1*<sup>+/+</sup> correspondientes. La evaluación de la inmunohistoquímica del tejido del cerebro de *Npc1*<sup>+/+</sup> resultante a las 9 semanas de edad (figura 18a-f) mostró el patrón estereotípico de la expresión de proteína *Npc1* y la localización de colesterol. Se notificó la tinción de *Npc1* en neuronas positivas a NeuN a lo largo del prosencéfalo sin acumulaciones intracelulares principales de colesterol no esterificado observadas mediante la tinción con filipina, incluyendo las regiones neocorticales e hipocámpicas de interés. (neuronas de la L-V; *Npc1* = 12,04 mpi, filipina = 5,84 mpi, figura 18c, d) (neuronas de la CA3; *Npc1* = 10,63 mpi, filipina = 2,05 mpi, figura 18e, f). La mayoría de la señal de filipina en ratones *Npc1*<sup>+/+</sup> se encontró en estructuras ricas en mielina como el cuerpo calloso. Lo contrario fue cierto en los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> inyectados con PBS (figura 18g-l). No se detectó casi tinción específica con el anticuerpo de *Npc1*, y muchas de las neuronas positivas a NeuN a lo largo del prosencéfalo presentaron los altos niveles de acumulación de colesterol no esterificado típicos de la patología de la enfermedad de NPC de estadio tardío, incluyendo las neuronas de la LV (*Npc1* = 2,98 mpi, filipina = 28,9 mpi, figura 3i, j) y de la CA3 (*Npc1* = 1,54 mpi, filipina = 33,80 mpi, figura 3k, l).

El análisis de los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> tratados con VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 (figura 18m-r) reveló un fenotipo intermedio.

Aunque la acumulación de colesterol intracelular estaba extendida a lo largo de todo el cerebro, la intensidad de la filipina intracelular promedio era de 21,01 mpi en la LV (figura 18o, p) y de 21,33 mpi en la CA3 (figura 18q, r), significativamente menor que la observada en los ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* con control de PBS ( $P < 0,05$  y  $P < 0,01$ , respectivamente). Esto coincidió con una señal de NPC1 en neuronas de *NPC1<sup>-/-</sup>* tratadas con VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 de 9,76 mpi en la LV (figura 18o, p) y de 8,60 mpi en la CA3 (figura 18q, r). Aunque claramente por debajo de los niveles de las neuronas *Npc1<sup>+/+</sup>*, esto todavía representa un aumento significativo de proteína NPC1 en ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* tratados con VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 cuando se compara con los controles de vehículo de *Npc1<sup>-/-</sup>* ( $P < 0,01$  y  $P < 0,0001$  respectivamente, todas las cuantificaciones en la figura 18s-v).

#### 10 Ejemplo 8. Corrección bioquímica de neuronas de *Npc1<sup>-/-</sup>* tras la administración de genes.

Habiendo identificado que el VAA9<sub>mini</sub>-CaMKII-NPC1 transdujo regiones del cerebro afectadas por NPC1, indujo la producción de proteína NPC1 y redujo la patología del colesterol, se determinó si la expresión de NPC1 mediada por VAA era bioquímicamente funcional de una manera fisiológicamente típica en ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* tratados con VAA9 en el día 23. Una inspección minuciosa de la población neuronal de la LV en ratones tratados con VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 reveló un patrón de localización intracelular puntiforme y perinuclear para la proteína NPC1, típico de una distribución lisosómica. Además, las neuronas de la LV que carecían de acumulaciones de colesterol eran más fuertemente positivas a NPC1, mientras que las neuronas cercanas débilmente o no transducidas permanecían positivas a filipina (figura 19a, b).

El trazado de la expresión de NPC1 frente a la acumulación de colesterol de la población de neuronas de la LV analizada en ratones tratados con VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 contra los ratones *Npc1<sup>+/+</sup>* y *Npc1<sup>-/-</sup>* de control reveló que el 21% ( $\pm 5,71$  E.E.M.,  $n=4$ ) se habían corregido de manera bioquímica a niveles normales (figura 19c, d). El mismo fenómeno se observó en las neuronas de la CA3, en la que el 31% ( $\pm 1,58$  E.E.M.,  $n=4$ ) de esta población en ratones tratados con VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 era indistinguible de las neuronas sanas normales (figura 19e-h).

La comparación del porcentaje de neuronas transducidas de manera exitosa en los ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* tratados con VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-GFP (figura 19i, j) y el porcentaje de neuronas bioquímicamente corregidas en los ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* tratados con VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 (figura 19k, l) se realizó para evaluar si los niveles de corrección bioquímica se correspondían directamente con el patrón de transducción del constructo de VAA<sub>mini</sub>CaMKII-GFP. La penetrancia del AA9<sub>mini</sub>CaMKII-GFP era del 14,9% ( $\pm 0,60$  E.E.M.,  $n=3$ ) en neuronas de la LV, y del 27,7% ( $\pm 0,75$  E.E.M.,  $n=3$ ) en las neuronas de la CA3, no significativamente diferente a la del VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 (cuantificación en la figura 19m, n), indicando el nivel de corrección bioquímica observada en neuronas *Npc1<sup>-/-</sup>* que correspondían al patrón de transducción del constructo de VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-GFP.

#### 35 Ejemplo 9. Pérdida de neuronas de Purkinje retrasada en ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* tratados con VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1

Las mejoras significativas en la esperanza de vida y los criterios fisiológicos se acompañan habitualmente por la conservación células de Purkinje cerebelosas en NPC1. Tras la evaluación de la inmunohistoquímica de los números de células de Purkinje a las 9 semanas de edad en los grupos experimentales, se notificó un retraso significativo en la pérdida de anterior a posterior típica de estas neuronas tras el tratamiento con VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 (figura 20a-e). En los ratones de control *Npc1<sup>+/+</sup>*, los números de células de Purkinje permanecieron en niveles normales (31,01, 26,94, y 29,51 células/mm de pcl (células de Purkinje por mm de capa de células de Purkinje: superficie de contacto de la capa celular de gránulos) en los lobulillos VI, VII y IX respectivamente), pero se observó una pérdida de neuronas a gran escala en los ratones de control *Npc1<sup>-/-</sup>* (2,435, 3,523, y 9,469 células/mm de pcl en los lobulillos VI, VII y IX respectivamente). Mientras que la pérdida de células de Purkinje se había iniciado en los lobulillos anteriores I-V en ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* tratados con VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1, todavía estaban presentes significativamente más neuronas cuando se comparó con los ratones de control *Npc1<sup>-/-</sup>*, con 9,374 células/mm de pcl en el lobulillo VI ( $P < 0,05$ ), 9,716 células/mm de pcl en el lobulillo VII ( $P < 0,05$ ) y 17,22 células/mm de pcl en el lobulillo IX ( $P < 0,01$ ) (cuantificaciones en la figura 20f-h), sugiriendo un retraso mediado por la terapia génica con VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 en la muerte de células de Purkinje y disminución de la función motora.

#### 55 Ejemplo 10. El tratamiento con VAA9<sub>mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC1 mejora significativamente la supervivencia y aumenta el crecimiento en relación con el tratamiento con VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 (figura 21)

El vector de VAA9 que utilizó un promotor ubicuo se diseñó para determinar si la terapia génica con VAA usada para corregir tanto las neuronas así como otros tipos celulares en el cerebro y otros órganos puede mejorar por encima de la eficacia que se observó con la administración del gen VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1. Se sustituyó el promotor de miniCaMKII con un promotor truncado del EF1 $\alpha$  (227 pb). El tamaño final del vector de VAA incluyendo las ITR en el extremo 5' y 3', que flanqueaban el promotor del EF1 $\alpha$ , ADNc del NPC1 y una señal de poliadenilación, era de 4,7 kilobases.

Los ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* ( $n=8$ ) recibieron  $1 \times 10^{12}$  GC de VAA9<sub>mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC1 a los 24 días de vida mediante inyección retroorbitaria. En relación con los ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* ( $n=9$ ) tratados con  $1 \times 10^{12}$  GC de VAA9<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 entre los 20-25 días de vida mediante inyección retroorbitaria y los ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* no tratados ( $n=16$ ) con una supervivencia media de 97 y 69 días, respectivamente, los ratones *Npc1<sup>-/-</sup>* tratados con VAA9<sub>mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC1 ( $n=8$ ) tenían un

aumento significativo ( $P < 0,01$ ) en la supervivencia con una supervivencia media  $> 121$  días (figura 23). Con relación a los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> no tratados, ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> tratados con VAA9<sub>-mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC1 de la misma edad a las 8-9 semanas de vida presentaron mejoras fisiológicas que se correspondían con una mejora objetiva en la función motora, donde los ratones parecían que mantenían su fuerza y coordinación para caminar y explorar la jaula con signos reducidos de temblor.

Los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> tratados con VAA9<sub>-mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC1 alcanzaron su peso máximo medio en la semana 12, lo que fue significativamente más tarde ( $P = 0,02$ ) que los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> tratados con VAA9-CaMKII-NPC1 que alcanzaron su peso máximo medio en la semana 8 (figura 22a). El porcentaje de aumento de peso medio entre las 6 y 9 semanas para ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> tratados con VAA9<sub>-mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC1 era del 8,8% y era mayor que el porcentaje de cambio de peso medio para ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> tratados con VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1, que era del -2,3%, pero esta diferencia no era significativa (figura 22b).

#### Análisis

Los estudios se realizaron para someter a prueba la eficacia de la administración de genes mediada por VAA como tratamiento para la NPC1, una enfermedad neurológica mortal y progresiva. Se seleccionó VAA9 para la administración de genes porque ha demostrado que puede cruzar la barrera hematoencefálica y transducir neuronas y neuroglíocitos, se ha usado de manera exitosa en muchos otros modelos murinos de enfermedades neurológicas hereditarias, y se está sometiendo a prueba en ensayos clínicos humanos para tratar otras enfermedades neurológicas hereditarias. El promotor de CaMKII neuroespecífico se seleccionó en primer lugar debido a su pequeño tamaño y capacidad para expresarse en células de Purkinje, la muerte de esta clase de neuronas se piensa que conduce a la pérdida motora observada en la enfermedad de NPC1. Se administró VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 en el periodo neonatal y a las 3 semanas de vida para determinar si tratar los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> precozmente incrementaría la eficacia del tratamiento con VAA.

Los ratones y neonatos *Npc1*<sup>-/-</sup> tratados con VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 tuvieron una supervivencia aumentada significativa, superior actividad motora a las 9 semanas y pérdida de peso retrasada en relación con ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> no tratados y tratados con VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-GFP. No se observó diferencia significativa en la eficacia independientemente de la programación de la administración de VAA9. La administración retrasada de VAA9 refleja de manera más precisa la programación de la administración de VAA9 en un posible ensayo clínico en seres humanos ya que la enfermedad de NPC1 no se diagnostica normalmente en el periodo neonatal.

La inmunohistoquímica para NPC1/*Npc1* y la tinción con filipina confirmaron que un subconjunto de neuronas de los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> tratados con VAA9 expresaron NPC1 y mostraron una reducción correspondiente de tinción con filipina en relación con los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> no tratados a las 9 semanas. Estos resultados demuestran una correlación entre la expresión de NPC1 después de la administración de genes, una reducción en almacenamiento de colesterol, y una mejora del fenotipo de la enfermedad de NPC1. Sin embargo, se detectaron sustancialmente menos neuronas de Purkinje transducidas en el cerebelo, un área en la que la pérdida de neuronas de Purkinje iguala la progresión de la enfermedad de NPC1 en modelo de ratón. La baja transducción en el cerebelo puede explicarse porque la administración de gen VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 sólo retrasó la progresión de la enfermedad en el modelo murino de NPC1 y porque los ratones no alcanzaron una esperanza de vida normal o el mismo peso que los ratones de tipo natural. A pesar de la transducción de VAA9 más baja en el cerebelo, los ratones tratados con VAA9 tuvieron una mayor supervivencia de neuronas de Purkinje cerebelosas a las 9 semanas en relación con los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> no tratados.

Debido a que los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> tratados con VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC1 sólo alcanzaron un aumento modesto en la esperanza de vida, se volvió a modificar por ingeniería el vector para expresar el gen NPC1 usando un promotor ubicuo del EFla en un intento para mejorar la eficacia de la terapia génica que se observó inicialmente. Los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> tratados con el nuevo vector, VAA9<sub>-mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC1, muestran un aumento significativo en la esperanza de vida y crecimiento en relación con los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> tratados con VAA9<sub>-mini</sub>CaMKII-NPC. Ya que se utilizó el mismo serotipo de VAA9 para administrar ambos constructos de vectores, la única diferencia entre los dos vectores son los tipos celulares en los que se expresa NPC1. Este resultado sugiere que la corrección de células no neuronales en el cerebro tal como neuroglíocitos y/o tipos celulares fuera del sistema nervioso central por VAA9<sub>-mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC1 es responsable del efecto terapéutico aumentado que se observó. Se necesitarán más experimentos para determinar las diferencias subyacentes en la eficacia entre estos dos vectores de VAA y comprender estas diferencias podría conducir a una mejora adicional de la terapia génica con VAA para la enfermedad de NPC.

En la actualidad, los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> tratados con VAA9<sub>-mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC1 están vivos y parecen relativamente sanos, aunque sus pesos son menores que los de sus compañeros de camada de tipo natural. Se requerirá monitorización a largo plazo de estos ratones tratados con VAA9<sub>-mini</sub>EF1 $\alpha$ -NPC1 para determinar cuánto tiempo persistirá el beneficio terapéutico de la terapia génica con VAA, pero estos resultados son muy prometedores y puede no ser necesario un rediseño del vector adicional para justificar la promoción a ensayos clínicos. Sin embargo, el refinamiento adicional de la vía de administración, el uso del promotor y/o la combinación con otras intervenciones (tales como 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina o HDACi) puede mejorar posiblemente la eficacia de la terapia génica con

VAA como un tratamiento para la NPC. Estos estudios son los primeros en demostrar la eficacia preclínica de la terapia génica con VAA como un enfoque terapéutico para la enfermedad de NPC.

Materiales y métodos con respecto a los ejemplos 5-10:

5 Diseño y producción del vector de VAA. El vector de expresión, pENN.VAA.<sub>mini</sub>CaMKII0.4.eGFP.rBG (PL-C-PV1474) se obtuvo de University of Pennsylvania Vector Core. Este vector contiene elementos de control transcripcional del promotor de la proteína cinasa II (CaMKII) dependiente de calcio/calmodulina de ratón, sitios de clonación para la inserción de un ADN complementario, y la señal de poliA de β-globina de conejo. Las repeticiones terminales del serotipo 2 VAA flanquean el casete de expresión. El ADNc de eGFP se extrajo del plásmido pENN.VAA.<sub>mini</sub>CaMKII0.4.eGFP.rB y se reemplazó con el ADNc de NPC1 humano. Este vector recién creado se denominó VAA-<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1. Estos vectores de VAA se empaquetaron en una cápsida de VAA9, se purificaron mediante centrifugación con cloruro de cesio, y se valoraron mediante qPCR tal como se describió previamente. El promotor de <sub>mini</sub>CaMKII se retiró del vector de VAA-<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 y se reemplazó con un promotor del EF1α (<sub>mini</sub>EF1α) truncado. El promotor truncado del EF1α se clonó en un vector de expresión eGFP y se transfirió en células 293T para someter a prueba para determinar la actividad del promotor. El EF1α truncado expresó GFP en células 293T a niveles similares a los del promotor de longitud completa del EF1α. Los vectores de VAA2/9-<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 y VAA2/9-<sub>mini</sub>EF1α-NPC1 se produjeron mediante el Penn Vector Core en la universidad de Pensilvania con procedimientos publicados.

20 Animales. Todo el trabajo con animales se realizó según los protocolos de uso y cuidado animal aprobados por el NIH. Se criaron ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> heterocigotos (cepa Nctr-*Npc1*<sup>miN/J</sup> de BALB/c) para obtener compañeros de camada de control (*Npc1*<sup>+/+</sup>) y mutantes (*Npc1*<sup>-/-</sup>). Los ratones se pesaron semanalmente y los ratones mutantes se sacrificaron a las 9 semanas de edad, normalmente el estadio final de la enfermedad en la colonia tal como se determina mediante la pérdida de peso rápida y la pérdida grave de la función motora. Para la evaluación de la esperanza de vida en grupos de *Npc1*<sup>-/-</sup> tratados con VAA9-<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 y VAA9-<sub>mini</sub>CaMKII-GFP, el estadio final se determinó usando el mismo criterio.

30 Administración de VAA9. Crías neonatales *Npc1*<sup>-/-</sup> (1-3 días, n=6) recibieron una inyección retroorbitaria de 2x10<sup>11</sup>GC de VAA9-<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 en un volumen total de 10 μl. Los ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> (20-25 días) recibieron una inyección retroorbitaria de 1x10<sup>12</sup>GC de virus de VAA9-<sub>mini</sub>CaMKII-GFP (n=6) o virus de VAA9-<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1 (n=9) en un volumen total de 50 μl. Alternativamente, los *Npc1*<sup>-/-</sup> y *Npc1*<sup>+/+</sup> recibieron una inyección de placebo de 50 μl a los 23 días de edad.

35 Inmunohistoquímica. Se tomaron ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> tratados con VAA9-<sub>mini</sub>CaMKII-GFP (n=3), ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> tratados con VAA9-<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1h (n=4), ratones *Npc1*<sup>-/-</sup> de control (n=5) y ratones *Npc1*<sup>+/+</sup> de control (n=3) a las 9 semanas de edad para el análisis de la inmunohistoquímica. Se sacrificaron los ratones mediante asfixia con CO<sub>2</sub> y se perfundió de manera transcardiaca con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato. Los cerebros se fijaron posteriormente durante 24 h, luego se crioprotegieron en sacarosa al 30% hasta que los tejidos se hundieron. Luego los cerebros se seccionaron en un criostato de manera parasagital (25 μm) y se recogieron las secciones flotantes en solución salina tamponada con fosfato complementada con Triton-x100 (PBSt) al 0,25%. Se incubaron las secciones durante la noche a 4°C con o bien anticuerpo anti-calbindina de conejo (1:3000, Swant), anticuerpo anti-Npcl de conejo (1:2000) o anticuerpo anti-NeuN de ratón (1:1000, MILIPORE) en PBSt, y se detectaron los anticuerpos primarios detectados usando anticuerpo anti-IgG de conejo/ratón de cabra Dilight-488 o anticuerpo de anti-IgG de conejo Alexa-594 (1:1000 en PBSt, Vector Labs). Se realizó tinción con filipina (POLYSCIENCES INC.) a una concentración final de 50 μg/ml en PBSt. Se montaron las secciones y se cubrieron con cubreobjetos con medio de montaje ProLong Gold (Life Technologies).

50 Análisis de imágenes. Se tomaron imágenes del cerebelo completo o de la región hipocámpica/neocortical usando un microscopio Zeiss Axio Observer Z1 equipado con una etapa de escaneo automática, iluminación LED Colibri II y el software Zeiss ZEN usando una cámara de alta resolución AxioCam MRm y un objetivo de 20x. Cada canal de fluoróforo se pseudocoloreó en ZEN, se exportó como TIFF, y se analizó usando la distribución de FIJI de ImageJ, ajustando cada canal en brillo y contraste de una manera idéntica a través de todos los grupos experimentales.

55 Para el análisis de las neuronas de la CA3 hipocámpica y la capa V neocortical, el área de una neurona se delineó según el tamaño del soma determinado mediante tinción con NeuNing y la intensidad de píxeles media (mpi) de la filipina y la cepa de *Npc1* dentro de la célula registrada. Se eligió una de cada 5 neuronas al azar a lo largo del eje de la CA3 o la capa V para obtener una población neuronal representativa. Se contaron 20 células en cada región por sección, y se contaron 3 secciones por cerebro (60 células por n). Para evaluar el nivel de corrección bioquímica en la población neuronal tratada con VAA9-<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1, se establecieron límites de selección en el 2% inferior de las intensidades de filipina y *Npc1* de los grupos de control *Npc1*<sup>-/-</sup> y *Npc1*<sup>+/+</sup>, respectivamente. Las neuronas con niveles de almacenamiento de colesterol "menores que el nivel inicial de la enfermedad" junto con niveles "por encima de los niveles iniciales de tipo natural" de expresión de *Npc1* se consideraron bioquímicamente corregidos.

65 Para analizar la transducción del virus de VAA9-<sub>mini</sub>CaMKII-GFP, el número total de neuronas positivas a NeuN se

midió en un área fijada de la CA3 del hipocampo o capa V de la neocorteza, y el % de las células con doble marcado con GFP se registró (3 secciones contadas por cerebro, un mínimo de 72 células contadas en cada sección, un total de 1086 neuronas hipocámpicas y 2367 neuronas neocorticales medidas).

5 Se contaron las células de Purkinje midiendo el número de somas de Purkinje positivos a calbindina con árbol dendrítico o proyección axónica reconocibles que todavía permanecen dentro de un lobulillo cerebeloso. Los datos se expresaron como el número de células de Purkinje por mm de capa de células de Purkinje: superficie de contacto de la capa celular de granulos (pcl). El lobulillo completo se contó por sección, con 3 secciones contadas por cerebro.

10 Análisis estadístico. Los resultados se expresan como media  $\pm$ E.E.M. y se analizan para determinar la significancia estadística mediante ANOVA, en el que  $P < 0,05$  usando la prueba posterior de Tukey se consideró significativo. Se sometieron a prueba las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para determinar la significancia usando la prueba de Mantel-Cox de rangos logarítmicos, en la que se consideraron resultados significativos usando un umbral corregido de Bonferroni de  $P < 0,0083$  para tener en cuenta las comparaciones múltiples. Todos los datos estadísticos se calcularon usando el software Graphpad Prism.

Equivalentes

20 Los expertos en la técnica reconocerán, o pueden comprobar usando sólo experimentación corriente, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Se pretende que las siguientes reivindicaciones abarcan tales equivalentes.

#### Referencias

25 Referencia para VAA Anc80 : Zinn E, Pacouret S, Khaychuk V, Turunen HT, Carvalho LS, Andres-Mateos E, Shah S, Shelke R, Maurer AC, Plovie E, Xiao R, Vandenberghe LH. In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector. Cell Rep. 11 de agosto de 2015; 12(6):1056-68. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.019. Epub de 30 de julio de 2015. PubMed PMID: 26235624; PubMed Central PMCID: PMC4536165.

30 Referencia para VAA PHP.B: Deverman BE, Pravdo PL, Simpson BP, Kumar SR, Chan KY, Banerjee A, Wu WL, Yang B, Huber N, Pasca SP, Gradinaru V. Cre-dependent selection yields AVV variants for widespread gene transfer to the adult brain. Nat Biotechnol. febrero de 2016; 34(2):204-9. doi: 10.1038/nbt.3440. Epub de 1 febrero de 2016. PubMed PMID: 26829320.

40 Esta invención se realizó con apoyo gubernamental bajo los números de proyecto ZIA HG000068 13 y ZIA HG200318 13 por los Institutos Nacionales de la Salud, Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano. El gobierno tiene determinados derechos en la invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Constructo de ácido nucleico que comprende:
  - 5 (1) un vector viral; y
  - (2) una secuencia de gen *NPC1* bajo el control de un promotor del factor de elongación 1  $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ),  
 en el que opcionalmente el promotor del EF1 $\alpha$  comprende SEQ ID NO: 8.
- 10 2. Constructo de ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que el vector viral es un vector viral adeno-  
 asociado (VAA).
- 15 3. Constructo de ácido nucleico según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el constructo de ácido  
 nucleico comprende SEQ ID NO: 7.
- 20 4. Composición que comprende el constructo de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones  
 anteriores, y un portador viral farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento o la prevención  
 de una enfermedad o un trastorno por almacenamiento de colesterol en un sujeto,  
 en la que opcionalmente la enfermedad o el trastorno por almacenamiento de colesterol es enfermedad de  
 Niemann-Pick, tipo C.
- 25 5. Composición para el uso según la reivindicación 4, en la que el sujeto es
  - (a) un ratón, en la que opcionalmente el ratón es un ratón deficiente en *NPC1*, o
  - (b) un ser humano.
- 30 6. Composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en la que el constructo de ácido  
 nucleico se encapsida con una cápsida de VAA de serotipo 9.
- 35 7. Composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en la que la concentración del  
 constructo de ácido nucleico en la composición es al menos  $5 \times 10^{12}$  cg/ml.
- 40 8. Composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en la que el portador viral  
 farmacéuticamente aceptable es VAA, opcionalmente en la que el VAA está seleccionado del grupo que  
 consiste en VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAArh8, VAArh10, VAArh33, VAArh34,  
 VAA Anc80 o VAA PHP.B.
- 45 9. Composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en la que el portador viral  
 farmacéuticamente aceptable comprende una cápsida viral seleccionada del grupo que consiste en la  
 cápsida viral de VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAArh8, VAArh10, VAArh33,  
 VAArh34, VAA Anc80 o VAA PHP.B.
- 50 10. Composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un constructo de terapia génica que  
 comprende
  - (1) un vector viral; y
  - (2) una secuencia de gen *NPC1* bajo el control de un promotor del factor de elongación 1  $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ),  
 y un portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Niemann-  
 Pick, tipo C en un sujeto mediante terapia génica, en la que opcionalmente:
    - 55 (a) el promotor del EF1 $\alpha$  comprende SEQ ID NO: 8, y/o
    - (b) el sujeto es (i) un ratón, o (ii) un ser humano, y/o
    - 60 (c) la composición comprende el constructo de terapia génica a una concentración de  $5 \times 10^{12}$  cg/ml o más.
11. Composición para el uso según la reivindicación 10, en la que el vector viral es un vector viral adeno-  
 asociado (VAA).
- 65 12. Composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en la que el constructo de  
 terapia génica comprende SEQ ID NO: 7.



13. Composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en la que el constructo de terapia génica se encapsida con una cápsida de VAA de serotipo 9.
- 5 14. Composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en la que la secuencia del vector viral es VAA, opcionalmente en la que el VAA está seleccionado del grupo que consiste en VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAArh8, VAArh10, VAArh33, VAArh34, VAA Anc80 o VAA PHP.B.
- 10 15. Composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en la que el constructo de terapia génica comprende una cápsida viral seleccionada del grupo que consiste en una cápsida viral de VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAArh8, VAArh10, VAArh33, VAArh34, VAA Anc80 o VAA PHP.B.

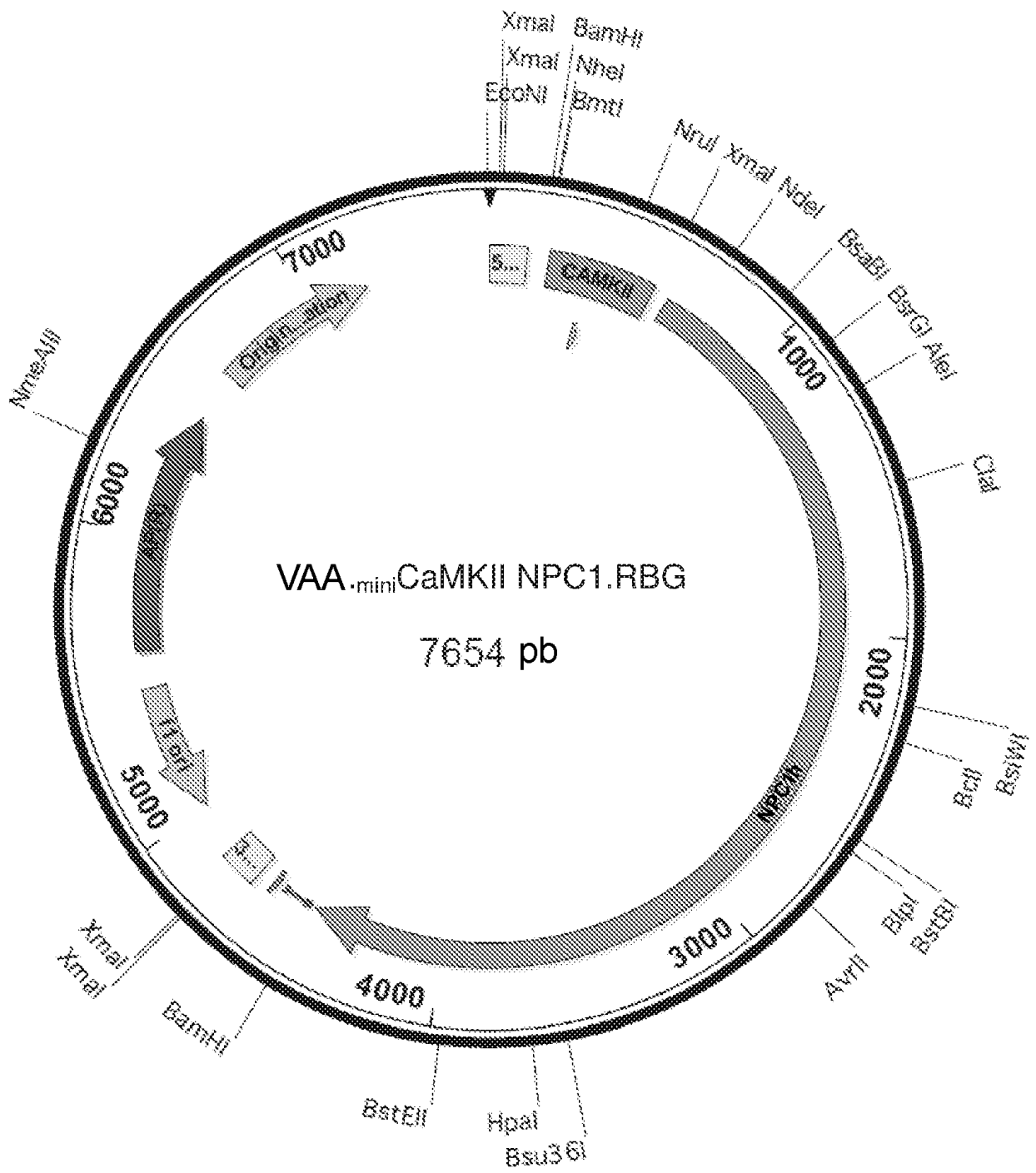


FIG. 1

ctgcgogctcgctogctcactgagggccgcccgggcaaaagcccgggcgtcgggcgaccccttgggtcgccc  
 ggccctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtgcccaactccatcactaggggttcccttgtagt  
 taatgattaaccggccatgctacttatctaccagggtaatggggatccctctagaactatagctagcat  
 gctaaccttgtggactaagtttgttcacatcccccttcccaacccccctcagtaacatccccctggggga  
 acaggggtccacttgtcctgggcccacacagtcctgcagttattgtgtatataaggccagggcaaaagag  
 gagcaggttttaaagtgaaggcagggcaggtgttggggagggcagttaccggggcaacgggaacagggc  
 gtttcggaggtgggtgccatggggacctggatgctgacgaaggctcgcgaggtgtgagcagccacag  
 tgcctgtcagaagccccaaagctcgtcagtcgaagccgggttctccgtttgcactcaggagcaggggca  
 ggcgagtgggccctagttctgggggcagctctagagccgatccccgggtaaatcggcaagcagccggc  
 gtcggcagccctgcgcgggccacagcatgacccgctcgcgggcctggcccttggccctcctcctgctgctac  
 tgtgtccagcgcaggtgttttcacagtcctgtgtttgggtatggagagtggtggaattgcatatggggac  
 aagaggtacaattgccaatattctggcccacaaaaaccattgccaaggatggatattgacttagtgca  
 ggaactctgtccaggattcttcttggcaatgtcagtcctctgttgtgatgttcggcagcttcagacac  
 taaaagacaacctgcagctgcctctacagtttctgtccagatgtccatcctgtttttataacctactg  
 aacctgttttgtgagctgacatgtagccctcgacagagtcagtttttgaatgttacagctactgaaga  
 ttatgttgatcctgttacaaccagacgaaaaacaaatgtgaaagagttacaataactcgtcggacaga  
 gttttgccaatgcaatgtacaatgcctgcccgggatgtggaggcccccctcaagtaatgacaaggccctg  
 ggactcctgtgtgggaaggacgctgacgcccgttaatgccaccaactggattgaatacatgttcaataa  
 ggacaatggacagggcaccttttaccatcactcctgtgttttcagattttccagtcocatgggatggagc  
 ccatgaacaatgccaccaaaaggctgtgacgagtcctgtggatgaggtcacagcaccatgtagctgccaa  
 gactgctctattgtctgtggccccaaagcccccagcccccacccctcctcctgctccctggacgatccttgg  
 ct.tggagcccatgtatgtcatcctatgtggatcacctacatggcgtttttggcttgtgttttttggagcat  
 tttttgcagtggtgtctacagaaaacgggtattttgtctccaggtacactcccacogatagcaatata  
 gctttttctgttaatgcaagtgacaaaggagaggcgtcctgctgtgacccctgtcagcgcagcatttga  
 gggctgcttgaggcggctgttcacacgctgggggtctttctgctcggaaaaccctggctgtgtcattt  
 tcttctcgtcggctcttcattactgctgttctgctcagggcctgggtgttctcgggtcacaccacatcca  
 gttgacctctggctcagccccagcagccagggctcgcctggaaaaagagtaactttgaccagcactttgg  
 gcctttctccggacggagcagctcatcctccgggcccctctcactgacaaaacacattttaccagccat  
 acccttccggagctgatgtaccctttggacctccgcttgacatacagatactgcaccaggttcttgac  
 ttacaaatagccatcgaaaacattactgcctcttatgacaatgagactgtgacacttcaagacatctg  
 ct.tggcccctctttcacogtataaacacgaactgcaccattttgagtggttaaaatacttccagaaca  
 gccattccgtgctggaccacaagaaaggggacgacttctttgtgtatgccgattaccacacgcacttt  
 ctgtaactgctacgggctcctgcctctctgaatgatacaagtttgcctccatgacccttgtctgggtac  
 gtttgggtggaccagtggtcccgctggcttgtgttgggaggctatgatgatcaaaaactacaataacgcca  
 ctgcccttgtgattaccttccctgtcaataattactataatgatcacagagaagctccagagggcccag  
 gcctgggaaaaagagttttatatttttgtgaaaaactacaagaatcccaatctgaccatttccctcac  
 tgcgtaacgaagtattgaagatgaaactaaatcgtgaaagtgacagtgatgtcttcaccggttgaatta  
 gctatgocatcatgtttctatatatttccctagcccttggggacatcaaaagctgtcgcagggctctg  
 gtggattcgaaggtctcactaggcatcggggcatcttgatcgtgctgagctcgggtggcttgcctctt  
 ggggtgtcttcagctacattgggttgccttgaacctcattgtgattgaagtcacccgttccctgggtgc  
 tggctgttggagtggaacaacatcttcattctgggtgcaggcctaccagagagatgaacgtcttcaaggg  
 gaaaccctggatcagcagctgggcagggctcctaggagaagtggctcccagtatgttccctgtcatcctt  
 ttctgagactgttagcatttttcttaggagcattgtccgtgatgccagccgtgcacacctctctctct  
 ttgogggatggcagctcttcattgactttctctgagattacctgttctgtgagctctcttgggggtta  
 gacattaaaagtcgaagagaaaaatcggctagacatcttttgcctgtgtcagaggtgctgaagatggaac  
 aagcgtccaggccctcagagagctgtttgtttcgccttcttcaaaaaactcctattctccacttctgctaa  
 aggactggatgagaccaattgtgatagcaatatttgggggtgtctctgtcattcagcatcgcagtcctg  
 aacaaagtagatatggattggatcagctctttcgatgccagatgactcctacatgggtggattattt  
 caaatccatcagtcagtaacctgcatgggggtccgctgtgtactttgtcctggaggaagggcacgact  
 acacttcttccaaggggacagaacatgggtgtgoggcggcagggctgcaacaatgattccctgggtgcag  
 cagatatttaacgcgggcagctggacaactataccogaataggcttccgccccctcgtcctggatcga  
 cgattatttgcactgggtgaagccacagctcgtcttgcctgtcagagtggaacaatcactgaccagttct  
 gcaatgcttcagtggttgaccctgcctgcgttccgtgcagggcctctgactccggaaggcaaacagagg

FIG. 2

cctcaggggggagacttcatgagatctctgccatggtcctttcggataaacctaaccccaagtgtgg  
caaaagggggacatgctgcctatagttctgcagttaacatcctccttggccatggcaccagggctggag  
ccacgtacttcatgacctaccacaccgtgctgcagacctctgctgactttattgacgctctgaagaaa  
gcccgaacttatagccagtaaatgtcacogaaaccatgggcattaacggcagtgccctaccgagtatttcc  
ttacagtggtgttttatgtctctacgaacagtaacctgaccatcattgacgacactatcttcaacctcg  
gtgtgtccctggggcgcgataatttctgggtgaccatggctcctcctgggctgtgagctctggctgtcagtc  
atcatgtgtgccaccatcgccatggctcttgggtcaacatgtttggagttatgtggctctggggcatcag  
tctgaacgctgtatccttgggtcaacctgggtgatgagctgtggcatctcctggagttctgcagccaca  
taaccagagcgttcacgggtgagcatgaaaggcagcccgctggagcgcgcggaagaggcacttgcccac  
atgggcagctccgtgttcagtggaatcacacttacaaaatttggagggattgtgggtgttggcttttgc  
caaatctcaaattttccagatattctacttcaggatgtatttggccatggctctactgggagccactc  
acggattaatatttctcctgtcttactcagttacatagggccatcagtaataaagccaaaagttgt  
gccactgaagagcgatacaaaaggaacagagcgcgaaocggcttctaaatttctagccctctgaggatcc  
gatctttttccctctgccaaaattatggggacatcatgaagcccttgagcatctgacttctggcta  
ataaaggaaatttattttcattgcaatagtgtgttggaaatttttgtgtctctcactcgggaagcaatt  
cgttgatctgaatttgcaccaccataataaccattaccctggtagataaagtacatggcgggttaat  
cattaactacaaggaaccctagtgtatggagttggccactcctctctgocgctcgcctcgtcactg  
aggcggggcagccaaaggctgcgccgacgcccgggtttgcccgggcggcctcagtgagcgcgagcgcg  
cgcagccttaattaacctaatcactggccgtcgttttacaacgctcgtgactgggaaaaacctggcgt  
tacccaacttaatgccttgcagcaacatccccctttgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgc  
ccgatcgccttcccaacagttgcccagcctgaatggcgaatgggacgcgcctctgagcggcgcatt  
agcgcggcgggtgtgggtgggtacgcgcagcgtgaccgctacacttgcagcgcctagcgcocgctcc  
ttctgctttctccttctccttctctgcacgcttgcgcggctttcccctcaagctctaaatcgggggc  
tccttttagggttccgatttagtgctttacggcacctcgaccocaaaaaacttgattaggggtgatgg  
tcacgtagtgggcatcgccctgatagacgggtttttgccttttgacgttggagtccacgttctttaa  
tagtggactcttgttccaaactggaacaacactcaacctatctcggctctattcttttgatttataag  
ggattttgcggatttccggcctattgggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaatttt  
aacaaaaatattaacgcttacaatttaggtggcacttttccgggaaatgtgcgcggaaaccctatttgt  
ttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaacctgataaatgcttcaata  
atattgaaaaaggaagagatagagtattcaacatttccgtgtcgccttattcccttttttgcggcat  
tttgccttctcgtttttgctcaccocagaaacgctgggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggt  
gcacgagtggggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgcocccgaaga  
acgttttccaatgatgagcaacttttaagttctgctatgtggcgcgggtattatcccgctattgacgcgcg  
ggcaagagcaactcggctgcgcgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtagctaccagtcaca  
gaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataa  
cactgcggcacaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaacgcttttttgcacaca  
tgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaaacgacgcg  
cgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgcttgcgcaactattaactggcgaactacttac  
ctagcttcccggaacaataatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgct  
cggcccttccggctggctgggtttatgtctgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgcggatc  
attgcagcactggggccagatggtaagccctcccgctatcgtagttatctacacgacggggagtcaggc  
aactatggatgaacgaaatagacagatcgcctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgt  
cagaccaagtttactcatatatacttttagattgattttaaacttcatttttaatttaaaggatctag  
gtgaagatcctttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttogttccactgagcgtc  
agaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgc  
aaacaaaaaaaccacgctaccagcgggtggtttgttggccggatcaagagctaccaactcttttccg  
aaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaaatactgttctctagtgtagccgtagttaggcca  
ccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctctgctaatectgttaccagtggtcgtc  
ccagtgggcgataagtcgtgtcttacccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcgg  
tcgggctgaacgggggggttcgtgcaacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagata  
cctacagcgtgagctatgagaaagcgcacagcttcccgaaaggagaaaaggcggacaggtatccggtaa  
ggggcagggctggaaacagggagagcgcacaggggagcttccagggggaacgcctggatctttatag  
cctgtcgggtttcgcacactctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggggcggagcct

FIG.2 (cont.)

ES 2 755 725 T3

atggaaaaacgcoagcaacgoggcctttttacgggttctctggccttttgctggccttttgctcacatgt  
tctttcctgogttatccccgattctgtggataaacogtattacogcctttgagtgagctgatacogct  
cgccgcagccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcggaggagcgggaagagcgcccaatacgc  
aacgcctctccccgcgcttggccgattcattaatgcagctggcagcagcaggtttcccgactggaaag  
cgggcagtgagcgcacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccccaggetttacaottt  
atgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatga  
ccatgattacgccagatttaattaaggccttaattagg

(SEQ ID NO: 1)

FIG. 2 (cont.)

ES 2 755 725 T3

ctgctgctcgcctcgcctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggctcgggagacctttggcgccc  
ggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggggagtgggccaaactccatcactaggggtcct  
(SEQ ID NO: 2)

FIG. 3

ES 2 755 725 T3

taacttgtggactaagtttgttcacatccccttctccaaccccctcagtacatcacccctgggggaaca  
gggtccacttgcctctggggcccacacagtcctgcagtattgtgtatataaggccagggcaaagaggag  
caggttttaagtgaaaggcaggcaggtgttggggaggcagttaccggggcaacgggaacagggcgtt  
tcggaggtgggttgcctatggggacctggatgctgaacgaaggctcgcgagget

(SEQ ID NO: 3)

FIG. 4

atgacogctcgcggcctggcccttggccctcctcctgctgctactgtgtccagcgcaggtgttttcaca  
gtcctgtgtttgggatggagagtgtggaattgcataatggggacaagaggtacaattggcaatattctg  
gcccacccaaaaccattgccaaaggatggatattgacttagtgaggaactctgtccaggattctctctt  
ggcaatgtcagctctctgttgtgatgttcggcagcttcagacactaaaagacaacctgocagctgcctct  
acagttctgtccagatgtccatcctgtttttataacctactgaacctgttttgtgagctgacatgta  
gcccctgcacagagttagttttgaaatgttacagctactgaagattatgttgatcctgttacaaccag  
acgaaaacaaatgtgaaagagttacaatactacgtcggacagagttttgccaatgcaatgtacaatgc  
ctgocgggatgtggaggcccccctcaagtaatgacaaggccctgggactcctgtgtgggaaggaogctg  
aogcctgtaatgccaccaactggattgaaatacatgttcaataaggacaatggacagggaccctttacc  
atcactcctgtgttttcagattttccagtcocatgggatggagcccatgaacaatgccacccaaaggctg  
tgacgagctctgtggatgaggtcacagcaccatgtagctgccaagactgctctattgtctgtggcccca  
agccccagccccaccctcctcctgctccctggacagatccttggcttggacgccatgtatgtcatcatg  
tggatcacctacatggcgtttttgcttgtgttttttggagcattttttgcaagtgtggtgctacagaaa  
acggatattttgtctccaggtacactcccatcgatagcaatataagctttttctgttaatgcaagtgaca  
aaggagagggcgtcctgctgtgaccctgtcagcgcagcattttgagggctgcttgaggcggctgttcaca  
cgtcgggggtctttctgcgtccgaaaacctggctgtgtcattttctctcctgctggtcttcattactgc  
gtgttcgtcaggcctgggtgtttgtccgggtcacaaccaatccagttgacctctggtcagccccagca  
gccaggctcgcctggaaaaagagtactttgaccagcactttgggocctttctccggacggagcagctc  
atcatccgggccccctctcactgacaaaacacattttaccagccataacctcogggagctgtagtacctt  
tggacctcctctgacatacagatactgacaccaggttcttgacttacaataagccatogaaaaacatta  
ctgocctcttatgacaatgagactgtgacacttcaagacatctgottggccccctctttcaccgtataac  
acgaaactgcaccattttgagtggttaaatfacttccagaacagccattccgtgctggaccacaagaa  
aggggacgacttctttgtgtatgocgattaccacaogcactttctgtaactgcgtacgggctcctgct  
ctctgaaatgatacaagtttgcctccatgacccttgtctgggtacgtttggtggaccagtggtcccggtg  
cttgtgttgggaggctatgatgatcaaaaactacaataacgccactgcccttgtgattacctccctgt  
caataattactataatgatacagagaagctccagaggggccaggcctgggaaaaagagtttattaatt  
ttgtgaaaaactacaagaatcccaatctgaccatttccctcactgctgaacgaagtattgaagatgaa  
ctaaatcgtgaaagtgcagctgatgtctccaccgttgaattagctatgccatcatgttctatataat  
ttccctagccttggggcacatcaaaaagctgtcgcagggcttctgggtgattcgaaggctcactaggca  
tcgcgggcatcttgatcgtgctgagctcgggtggccttgcctccttgggtgtcttcagctacattgggtg  
cccttgaccctcattgtgatgaaagtcaccccgctcctgggtgctggctgttggagtggaacaacatctt  
cattctgggtgcaggcctaccagagagatgaaactctcaaggggaaacctggatcagcagctgggca  
gggtcctaggagaagtggctcccagtatgttccctgtcatcctttcttgagactgtagcattttctta  
ggagcattgtccgtgatgccagccgtgcacaccttctctctcttgggggattggcagctctcattga  
ctttctctgcagattacctgtttcgtgagctctctgggggttagacattaaactcaagagaaaaatc  
ggctagacatcttttgcctgtgtcagaggtgctgaagatggaaacaagcgtccaggcctcagagagctgt  
ttgtttcgtctcttcaaaaaactcctattctccacttctgctaaaggactggatgagaccaattgtgat  
agcaatatttgtgggtgttctgtcattcagcatcgcagctcctgaacaaagttagatattggattggatc  
agtctcttctgatgccagatgactcctacatgggtggattatttcaaatccatcagtcagtaacctgcat  
gcgggtccgctgtgtactttgtcctggaggaagggcaogactacacttcttccaggggcagaacat  
ggtgtgcggcggcatgggctgcaacaatgattccctgggtgcagcagatatttaacogggcgcagctgg  
acaactatacccgaataggcttgcgccccctcgtcctggatcgacgattatttgcactgggtgaaagcca  
cagtcgtcttgcgtgcagtgagtggaacaatacactgaccagttctgcaatgcttcagtggttgacctgc  
ctgcttgcgtgcaggcctctgactccggaaaggcaaacagaggcctcaggggggagacttcatgagat  
tctgcccattgttctcttccggataaacctaacccccagtggtggcaagggggacatgctgctatagt  
tctgcagttaacatcctccttggccatggcaccagggtcggagccacgtacttcatgacctaccacac  
cgtgctgcagacctctgctgactttattgacgctctgaagaaaagcccgacttatagccagtaattgtca  
ccgaaaccatgggcattaaacggcagtgctaccagatatttcttacagtggtttttagtcttctac  
gaacagtaacctgaccatcattgacgacactatcttcaacctcgggtgtgtccctgggcgcgatatttct  
gggtgaccatggtcctcctgggctgtgagctctgggtctgcagtcacatgtgtgcccaccatcgccatgg  
tcttgggtcaacatgtttggagttatgtggctctggggcactcagctgcaacgctgtatccttgggtcaac

FIG. 5



ES 2 755 725 T3

ctggatgatgagctgtggcatctccgtggagttctgcagccacataaccagagcgttcacggtgagcat  
gaaaggcagccgcgtggagcggcgggaagaggcaacttgcccacatgggcagctccgtgttcagtggaa  
tcacacttacaaaatttggagggattgtgggtgttggcttttgccaaatctcaaattttccagatattc  
tacttcaggatgtat.tggccatggcttactgggagccaactcacggattaatatttctccctgtctt  
actcagttacatagggccatcagtaaataaagccaaaagttgtgccactgaagagcggatacaaaggaa  
cagagcgcgaacggcttctaaatttctag

(SEQ ID NO: 4)

FIG. 5 (cont.)

ES 2 755 725 T3

gatctttttccctctgccaaaaattatggggacatcatgaagccccttgagcatctgacttctggcta  
ataaaggaaattttttcattgcaatagtgtgttgggaattttttgtgtototcactcg

(SEQ ID NO: 5)

FIG. 6

ES 2 755 725 T3

aggaaccocctagtgatggagttggccactocctctctgogcgctcgctcgctcaactgaggccgggcca  
ccaaaggctgccccgacgccccgggctttgccccggggcctcagtgagcgagcgagcgcgag

(SEQ ID NO: 6)

FIG. 7

Supervivencia de ratones Npc -/- después del tratamiento con VAA2/9<sub>mini</sub> calmodulina-NPC o VAA2/9<sub>mini</sub> calmodulina-eGFP en comparación a sin tratamiento

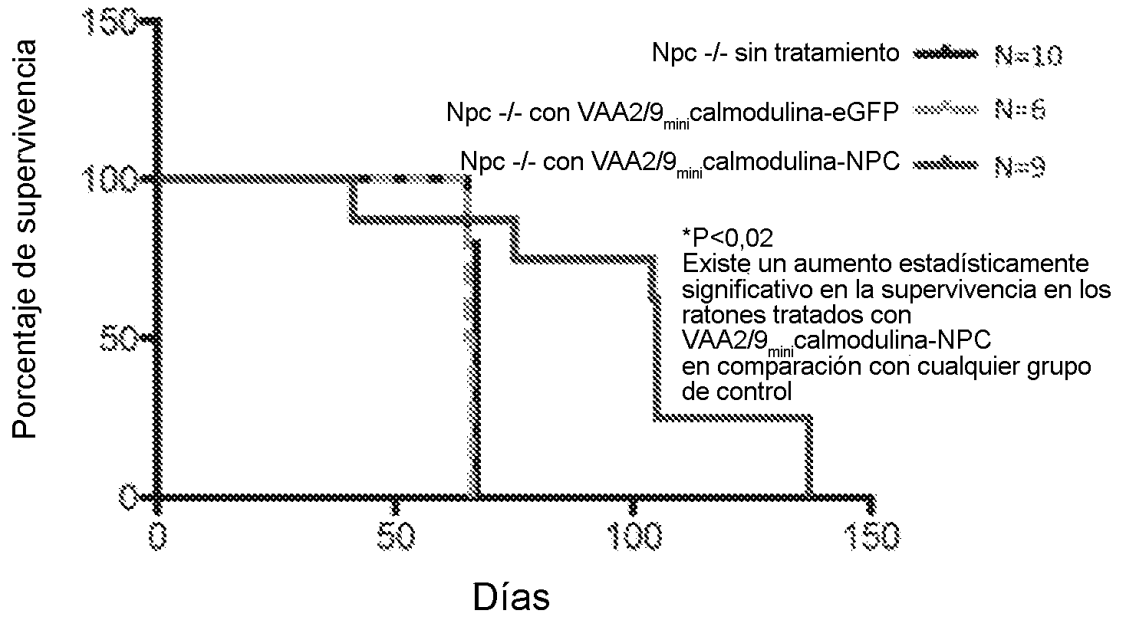


FIG. 8

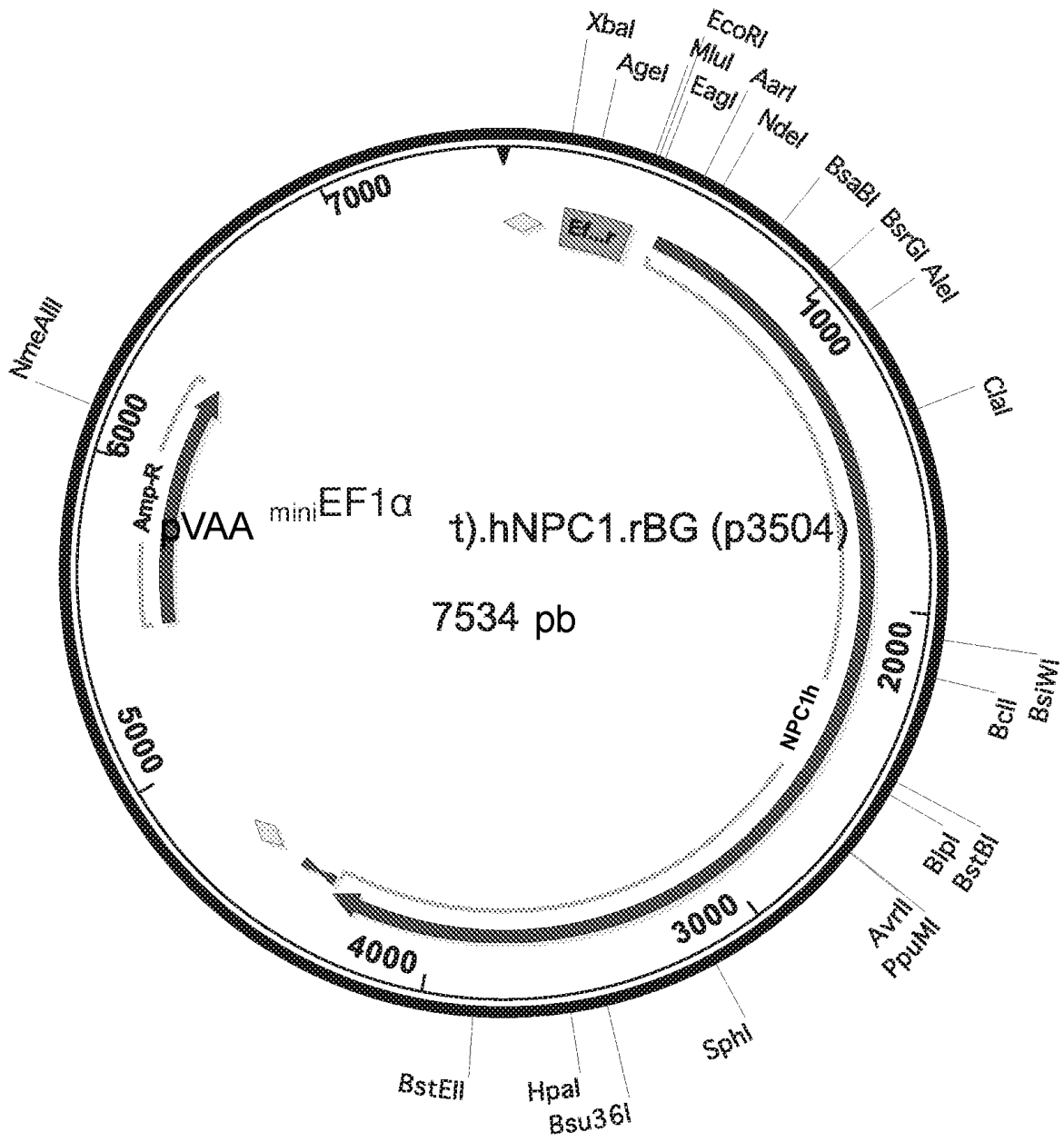


FIG. 9

ctgcgogctcgctogctcactgaggccgcccgggcaaaagcccgggcgtcgggogacotttgggtogccc  
 ggctcagtgagcagcgcagcgcagagagggagtgcccaactccatcactaggggttcottttagt  
 taatgattaaccggccatgctacttatctaccagggtaatggggatcctctagagctcgggtgccgt  
 cagtgggcagagcgcacatcgcccacagtcoccgagaagtggggggaggggtcggcaattgaaccgg  
 tgcttagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgctgtactggctccgctttttcccg  
 aggggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtgcocgtgaaacttttttcgcaacgggtttgoc  
 gccagaacacgcgtaagggcgaattccagcacactggcggccggttactagcctogagaattgtacaat  
 tcacgogggccgccaatgaccgctcgcggcctggcccttggcctcctcctgctgctactgtgtccagc  
 gcaggtgttttcacagtcctgtgtttgggtatggagagtggtggaattgcataatggggacaagaggtaca  
 attgogaatattctggcccacaaaaccattggccaaaggatggatagacttagtgacggaactcgt  
 ccaggatctctcttggcaatgtcagtcctcgttggatgttcggcagcttcagacactaaaagacaa  
 cctgcagctgcctctacagttctcgtccagatgtccatcctgtttttataaactactgaacctgtttt  
 gtgagctgacatgtagccctcgacagagtcagtttttgaatgttacagctactgaagattatgttgat  
 cctgttacaaccagacgaaaacaaatgtgaaagagttacaatactacgtcggacagagttttgocaa  
 tgcaatgtacaatgcctgcccgggatgtggaggcccccctcaagtaatgacaaggccctgggactcctgt  
 gtgggaaggagcgtgacgocctgtaatgccaccaactggattgaatacatgttcaataaggacaatgga  
 caggcacctttaccatcactcctgtgttttcagattttccagtcctgggatggagccatgaacaa  
 tgccaccaaaaggctgtgacgagtcctgtggatggaggtcacagcaccatgtagctgccaagactgctcta  
 ttgtctgtggcccaaggcccccagcccccactcctcctgctcctggagatccttggcctggagccc  
 atgtatgtcatcatgtggatcactacatggcgtttttgcttgggttttttggagcatttttgcagt  
 gtgggtgctacagaaaacggatattttgtctcagagtaactccatccatagcaatagctttttctg  
 ttaatgcaagtgacaaaaggagagggcgtcctcgtgaccctgtcagcgcagcatttgagggtcgttg  
 aggcggctgttcacacgctgggggtctttctcgtccgaaaccctggctgtgtcattttctctcgt  
 ggtcttcattactgctgttctcgtcaggcctgggtgtttgtccgggtcacaaccaatccagttgacctc  
 ggtcagccccagcagccaggctcgcctggaaaaagagtagctttgaccagcactttgggocctttctc  
 cggacggagcagctcatcatccgggocccctcactgacaaacacatttaccagccatacccttcggg  
 agctgatgtaccctttggacctccgcttgacatacagatactgcaccaggttcttgacttacaatag  
 ccatcgaaaacattactgcctcttatgacaatgagactgtgacacttcaagacatctgcttggccct  
 ctttcacgctataacacgaactgcaccattttgagtggttaaattacttccagaaacagccattcogt  
 gctggaccacaagaaaggggacgacttctttgtgtatgocgattaccacaogcactttctgactgcy  
 taogggctcctgcctctctgaatgatacaagtttgcctccatgacccctgtctgggtaogtttgggtgga  
 ccagtggtcccggtggcttgtgttgggagggctatgatgatcaaaaactacaataacgccactgcccctgt  
 gattaccttccctgtcaataattactataatgatcacagagaagctccagagggccaggcctgggaaa  
 aagagtttattaattttgtgaaaaactacaagaatcccaatctgaccatttccctcactgctgaacga  
 agtattgaagatgaactaaatcgtgaaagtgcagtgatgtctcaccggttgtaattagctatgccat  
 catgtttctatattttccctagccttggggacatcaaaaagctgtcgcaggtctctgggtggattcga  
 aggtctcactaggcatcgcgggcatcttgatcgtgctgagctcgggtggcttgcctcctgggtgtctc  
 agctacattgggttggccttgaccctcatttggattgaagtcacccgttccctgggtgctggctgttg  
 agtggaacaacatcttcattctgggtgcaggcctaccagagagatgaaogtcttcaaggggaaaccctgg  
 atcagcagctgggcagggctcctaggagaagtggtcctccagatgttccctgtcatcctttctgagact  
 gttagctttttcttaggagcattgtccgtgatgocagcogtgcacaccttctctctcttggggatt  
 ggcagtgctcattgactttctctgcagattacctggttctgtgagctctcttgggggttagacattaaac  
 gtcagagagaaaaatcggctagacatcttttgcctgtgtoagaggtgctgaaagatggaacaagcgtccag  
 gctcagagagctgtttgtttcgtctcttcaaaaactcctattctccacttctgctaaggactggat  
 gagaccaattgtgatagcaatatttgggggtgttctgtcattcagcatcgcagtcctgaacaaagttag  
 atattggattggatcagtcctcttccgatgccagatgaactcctacatgggtggattatttcaaatccatc  
 agtcagtacctgcatgcccgtccgocctgtgtactttgtcctggaggaagggcacgactacacttctc  
 caaggggcagaacatgggtgtgogggcgcagggctgcaacaatgattccctgggtgcagcagatattta  
 acgcccgcagctggacaactatacccgaataggcttcgccccctcgtcctggatcgacgattatttc  
 gactgggtgaagccacagtcgtcttgcctgcagtggaacaatcactgaccagttctgcaatgcttc  
 agtgggtgaccctgocctgcgttgcctgcaggcctctgactccggaaggcaaacagagggcctcaggggg  
 gagacttcatgagattcctgcccattgttcccttccgataaccctaaccccaagtggtggcaaggggga  
 catgctgcctatagttctgcagttaacatcctccttggccatggcaccagggtcggagccacgtactt

FIG. 10

ES 2 755 725 T3

catgacctaccacaccgtgctgcagacctctgctgactttattgacgctctgaagaaagcccactta  
tagccagtaaatgtcaccgaaaccatgggcattaacggcagtgccctaccgagtatttcccttacagtggtg  
ttttatgtctttctacgaacagtagctgaccatcattgacgacactatcttcaacctcgggtggtccct  
gggcgcgatattttctgggtgacatgggtcctcctgggctgtgagctctgggtctgcagtcacatgtgtg  
ccaccatcgccatgggtcttgggtcaacatggttggagttatgtggctctggggcatcagtcgaacgct  
gtatccttgggtcaacctgggtgatgagctgtggcatctcctgggagttctgcagccacataaccagagc  
gttcacgggtgagcatgaaaggcagcgcgctggagcgcgcggaagaggcacttgcccacatgggcagct  
cctgttccagtggaatcacacttacaaaatttgggaggattgtgggtgttggcttttgccaaatctcaa  
atthttccagatattctacttcaggatgtatttggccatgggtcttactgggagccactcacggattaat  
atthttccctgtcttactcagttacataggccatcagtaataaagccaaaagttgtgcccactgaag  
agcgatacaaaaggaacagagcgcgaacggccttctaaatthttctagtaataagctcgcgtgatcacgacc  
cgggcggcctcgaggacgggtgaaactacgctgaggatccgatctthttccctctgcccacaaatthtt  
ggggacatcatgaagccccttgagcatctgacttctggctaataaaggaaatthttttcattgcaat  
agtgtgttggaaatthtttgtgtctctcactcggaagcaattcgttgatctgaatttcgaccaccata  
ataccattaccctggtagataagtagcatggcgggttaatcattaactacaaggaacccttagtgat  
ggagttggccactccctctctgcgcgctcgcctcactgaggccgggcgaccacaaaggctgcgccgac  
gcccgggctttgcccggggcgcctcagtgagcgcgagcgcgcagccttaattaacctaatcactg  
gocgtcgtttttacaacgtcgtgactgggaaaaacctggcgttacccaaactaatcgccttgccagcaca  
tccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgccttcccacagttgcccga  
gcctgaatggcgaatgggacgcgcctctgtagcggcgcattaaagcgcggcgggtgtgggtggttacgcgc  
agcgtgaccgctacacttgccagcgccttagcgcocgcctcttctgctttcttcccttcccttctcgc  
cacgttcgcggctttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttagggttccgatthtagtgctt  
tacggcacctcgacccccaaaaacttgattagggtgatgggtccagtagtgggccatcgcctgatag  
acggtttttcgccccttgacgttggagtcacagttctthtaatagtggaactctgttccaaactggaac  
aacactcaacctatctcgggtctattcttttgattataagggattttgcccatttcggcctattgggt  
taaaaaatgagctgatttaacaaaaatthtaacgcgaatthtaacaaaaatthtaacgcttacaatthag  
gtggcacttttcggggaaatgtgcgoggaaccctatttgtttatthttctaaatacattcaaatatg  
tatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatthgaaaaaggaagagtatgagtat  
tcaacatthccgtgtcgccttattcccttthttgcccattttgccttccctgtthttgctcaccag  
aaacgctgggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggggttacatcgaactggat  
ctcaacagcggtaagatccttgagagttthtcgcccogaagaacgthttccaatgatgagcactthta  
agttctgctatgtggcgcgggtattatccogtattgacgcggggcaagagcaactcggctgcgcgatac  
actattctcagaatgacttgggtgagtagtaccagtcacagaaaagcatcttacgggatggcatgaca  
gtaagagaattatgacgtgctgccataaccatgagtgataacaactgcccgaacttacttctgacaac  
gatcggaggaccgaaggagctaacgctthtttgacacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatc  
gttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaaacgacgagcgtgacaccagatgcctgtagcaatg  
gcaacaacgcttgccgcaactatthaaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaatthataga  
ctggatggaggcggataaaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttcccggctggctgggtttattg  
ctgataaatctggagcgggtgagcgtgggtctcgcggatcattgcagcactggggccagatggtaag  
ccctcccgtatcgtagttatctacaacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagat  
cgtgagataggtgctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatalatacttt  
agattgattthaaaacttcatthtttaattthaaaaggatctagggtgaagatcctthtttgataatctcatg  
accacaaatcccttaacgtgagttthcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatc  
ttcttgagatcctthttttctgcgcgtaactctgctgcttgcaacacaaaaaacaccgctaccagcgg  
tggtttgthttgcgggatcaagagctaccaactctthttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcag  
ataccaaatactgttctctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgccc  
tacatacctcgcctctgctaatcctgttaccagtggtgctgcccagtgggcgataagtcgtgtcttaccg  
ggthggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacgggggggttcgtgcaca  
cagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgc  
cacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctcggaaacaggagagcgc  
cgagggagcttccagggggaacgcctggatctthtatagtcctgtcgggtthtcgcccactctgactt  
gagcgtcagatthttgtgatgctcgtcagggggggcggagcctatggaaaacgcaccagcaacgcggcctt

FIG. 10 (cont.)

ES 2 755 725 T3

tttaagggttcctggccttttgctggccttttgctcacatggttctttcctgcgttatcccctgattctg  
tggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagc  
gagtcagtgagcaggaagcggagagcggccaatacgcaaaccgctctccccgcgcgcttgggccgat  
tcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcgaacgcaattaatg  
tgagttagctcactcattagggcaccacaggctttacactttatgcttcgggctcgtatgttgtgtgga  
attgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattaccgacagatttaattaagg  
ccttaattagg (SEQ ID NO: 7)

FIG. 10 (cont.)



ES 2 755 725 T3

gcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttggggggagggggtcggcaattg  
aacccggtgcctagagaaggtggcgcgggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttt  
ttcccgaggggtgggggagaaaccgtatataaagtgcagtagtcgccgtgaaacgttctttttcgcaacggg  
tttgccgcagaaacacgcgtaag

(SEQ ID NO: 8)

FIG. 11

MTARGLALGLLLLLLCPAQVFSQSCVWYGECCGIAYGDKRYNCEYSGPPKPLPKDGYDLVQELCPGFFF  
GNVSLCCDVRQLQTLKDNLQLPLQLFLSRCPSCFYNLLNLFCELTCSPRQSQFLNVTATEDYVDPVTNQ  
TKTNVKELQYYVGQGFANAMYNACRDVEAPSSNDKALGLLGGKADACNATNWI EYMFNKDNGQAPFT  
ITPVFSDFPVHGMEPMNNATKGCDESVDEVTAPCSCQDCSIVCGPKPQPPPPAPWTILGLDAMYVIM  
WITYMAFLLVFFGAFFAVWCYRKRYFVSEYTPIDSNIAFSVNASDKGEASCCDPVSAAFEGCLRRFLT  
RWGSFCVRNPGCVIFFSLVFITACSSGLVFVRVTINPVDLWSAPSSQARLEKEYFDQHFQPFRRTEQL  
IIRAPLTDKHIYQPYPSGADVFFGPPLDIQILHQVLDLQIAIENITASYDNETVTLQDICALPLSPYN  
TNCTILSVLNYFNQNSHSLVDHKKGDDFFVYADYHTHFLYCVRAPASLNDTSLLDHDPCLGTFGGPVFPW  
LVLGGYDDQNYNNATALVITFPVNNYYNDTEKLQRAQAWKEEFINPVKNYKPNLTIISFTAERSIEDE  
LNRESDSDFVFTVVISYAIMFLYISLALGHIKSCRRLLVDSKVS LGIAGILIVLSSVACSLGVFSYIGL  
PLTLIVIEVIPFLVLAVGVDNIFILVQAYQRDERLQGETLDQQLGRVLGEVAPSMFLSSSFSETVAFFL  
GALSVMPAVHTFSLFAGLAVFIDFLLQITCFVSLGLD IKRQEKNRDLIFCCVRGAEDGTSVQASESC  
LFRFFKNSYSPLLLKDWMRPIVIAIFVGVLSFSIAVLNKVDIGLDQSLSMDDSYMVDYFKSISQYLH  
AGPPVYFVLEEGHDYTSKQNMVCGGMGCNNDSLVQQIFNAAQLDNYTRIGFAPSSWIDDYFDWVKP  
QSSCCRVDNITDQFCNASVVDPACVRCRPLTEPGKQRFQGGDFMRELPMF LSDNPNPKCGKGGHAAYS  
SAVNILLGHGTRVGATYFMTYHTVLQTSADFIDALKKARLIASNVETETMGINGSAYRVFPYSVFYVY  
EQYLTIIIDDTIFNLGVSLGAI FLVTMVLGCELWSAVIMCATIAMVLVNMFGVMWLWGISLNAVSLVN  
LVMSCGISVEFCSHITRAFTVSMKGSRVERAEEALAHMGSSVFSGITLTKFGGIVVLAFAKSQIFQIF  
YFRMYLAMVLLGATHGLIFLPVLLSYIGPSVKNKAKSCATEERYKGTERRERLNF

(SEQ ID NO: 9)

FIG. 12

ES 2 755 725 T3

gctcgggggtg ctgaaacagc ccggggaaagt agagccgcct ccgggggagcc caaccagccg  
 aacgcgcgcg gcgtcagcag ccttgccggg ccacagcatg accgctcgcg goctggccct  
 tggcctcctc ctgctgctac tgtgtccagc gcagggtgtt tcacagtcct gtgtttggta  
 tggagagtggt ggaattgcat atggggacaa gaggtacaat tgccaatatt ctggcccacc  
 aaaaccattg ccaaaggatg gatatgactt agtgcaggaa ctctgtccag gattcttctt  
 tggcaatgtc agtctctgtt gtgatgttcg gcagcttcag acactaaaag acaacctgca  
 gctgcctcta cagtttctgt ccagatgtcc atcctgtttt tataacctac tgaacctgtt  
 ttgtgagctg acatgtagcc ctogacagag tcagtttttg aatgtttacag ctactgaaga  
 ttacgttgat cctgtttacaa accagacgaa aacaaatgtg aaagagttac aatactacgt  
 cggacaggggt tttgccaatg caatgtacaa tgcctgcccg gatgtggagg cccctcaag  
 taatgacaag gccctgggac tctgtgtggg gaaggacgct gacgcctgta atgccaccaa  
 ctggattgaa tacatgttca ataaggacaa tggacaggca ccttttacc aactcctgt  
 gttttcagat tttccagtc atggyatgga gcccatgaac aatgccacca aaggctgtga  
 cgagtctgtg gatgagggtca cagcaccatg tagctgccaa gactgctcta ttgtctgtgg  
 ccccaagccc cagccccac ctctcctgc tccctggagc atccttggct tggacgccat  
 gtatgtcaco atgtggatca cctacatggc gtttttgett gtgttttttg gaggattttt  
 tgcagtgtgg tgctacagaa aacggatatt tgtctccgag tacaactcca togatagcaa  
 tatagctttt tctgttaatg caagtacaa aggagaggcg tctgtctgtg accctgtcag  
 cgcagcattt gagggtctgt tgaggcggct gttcacacgc tgggggtctt totgctcog  
 aaacctggc tgtgtcattt tcttctcgtt ggtcttcatt actgctgtt cgtcagccct  
 ggtgtttgtc cgggtcacaa ccaatccagt tgacctctgg tcagcccca gcagccaggc  
 tgcctggaa aaagagta ctgaccagca ctttgggct ttcttccgga cggagcagct  
 catcatccgg gccctctca ctgacaaaca ctttaccag ccataccctt cgggagctga  
 tgtacccttt ggacctccgc ttgacataca gatactgcac caggttcttg acttacaat  
 agccatogaa aacattactg cctcttatga caatgagact gtgacactt aagacatctg  
 cttggccct ctttaccgt ataacacgaa ctgcaccatt ttgagtgtgt taaattactt  
 ccagaacagc cattccgtgc tggaccacaa gaaaggggac gacttctttg tgtatgccga  
 ttaccacaag cactttctgt actgcgtacg ggctcctgcc tctctgaatg atacaagttt  
 gctccatgac ccttgtctgg gtactgtttg tggaccagtg ttcccgtggc ttgtgtggg  
 aggctatgat gatcaaaact acaataacgc cactgccct gtgattacct tccctgtcaa  
 taattactat aatgatacag agaagctcca gagggcccag gcctgggaaa aagagtttat  
 taattttgtg aaaaactaca agaatccaa tctgaccatt tcttccactg ctgaacgaag  
 tattgaagat gaactaaatc gtgaaagtga cagtgatgtc ttcaocgttg taattagcta  
 tgccatcatg tttctatata tttccctagc cttggggcac atcaaaagct gtcgcaggct  
 tctgggtggat tcgaaggct cactaggcat cgcgggcate ttgatcgtgc tgagctcgg  
 ggcttgcctc ttgggtgtct tcagctacat tgggttgccc ttgacctca ttgtgattga  
 agtcatcccg ttctcgtgc tggctgttgg agtggacaac atcttcatte tgggtcaggc  
 ctaccagaga gatgaacgtc ttcaagggga aacctggat cagcagctgg gcagggtcct  
 aggagaagtg gctcccagta tgttctgtc atccttttct gagactgtag catttttctt  
 aggagcattg tccgtgatgc cagccgtgca caccttctct ctctttgogg gattggcagt  
 cttcattgac tttcttctgc agattacctg tttcgtgagt ctcttgggg tagacattaa  
 acgtcaagag aaaaatoggc tagacatctt ttgctgtgtc agaggtgctg agatggaac  
 aagcgtccag goctoagaga gctgtttgtt tcgcttcttc aaaaactcct attctccact  
 tctgctaaag gactggatga gaccaattgt gatagcaata tttgtgggtg ttctgtcatt  
 cagcatcgca gtcctgaaca aagtagatat tggattggat cagtctcttt cgatgccaga  
 tgactcctac atgggtggatt atttcaaatc catcagtcag taactgcag cgggtccgcc  
 tgtgtacttt gtcctggagg aagggcacga ctacacttct tccaaggggc agaatattta  
 gtgoggcggc atgggctgca acaatgattc cctgggtgcag cagatattta acggcgcga  
 gctggacaac tataccgaa taggcttcgc cccctcgtcc tggatogaog attatttoga  
 ctgggtgaag ccacagtcgt cttgctgtcg agtggacaat atcactgacc agttctgcaa  
 tgcttcagtg gttgacctg cctgcgttcg ctgcaggcct ctgactccgg aaggcaaca  
 gaggcctcag gggggagact tcatgagatt cctgcccatg ttcctttcgg ataacctaa

FIG. 13

ES 2 755 725 T3

ccccaaagtgt ggc aaaagggg gacatgctgc ctatagttct gcagttaaca tcttcottgg  
ccatggcacc agggctcggag ccacgtaact catgacctac cacacogtgc tgcagacctc  
tgctgacttt attgacgctc tgaagaaagc ccgacttata gccagtaatg tcacogaaac  
catgggcaatt aaogggcagtg cctaccgagt atttccttac agtgtgtttt atgtcttcta  
cgaacagtac ctgaccatca ttgacgacac tatcttcaac ctcgggtgtgt cctcggggcgc  
gatattttctg gtgaccatgg tctcctcggg ctgtgagctc tggctctgcag tcatcatgtg  
tgccaccatc gccatggctt tggccaacat gtttggagtt atgtggctct ggggcatcag  
totgaacgct gtatccttgg tcaacctggg gatgagctgt ggcatctccg tggagttctg  
cagccacata accagagcgt tcacgggtgag catgaaaggc agccgcgtgg agccgcgcgga  
agaggcaact gccacatgg gcagctccgt gttcagtgga atcacactta caaaatttgg  
agggattgtg gtgttggtt ttgccaaatc tcaaattttc cagatattct acttcaggat  
gtatttggcc atggctctac tgggagccac tcacggatta atatttctcc ctgtcttact  
cagttacata gggccatcag taaataaagc caaaagttgt gccactgaag agcgatacaa  
aggaacagag cgcgaacggc ttctaaattt ctagccctct cgcagggcat cctgactgaa  
ctgtgtctaa gggctcggctg gtttaccact ggaocgggtgc tgcacogga aggccaagtt  
gaacaccgga tgggtgccaac catcggttgt ttggcagcag ctttgaacgt agccctgtg  
aactcaggaa tgcacagttg acttgggaag cagtattact agatctggag gcaaccacag  
gacactaac ttctccagc ctcttcagga aagaaacctc attctttggc aagcaggagg  
tgacactaga tggctgtgaa tgtgatccgc tcaactgacac totgtaaagg ccaatcaatg  
cactgtctgt ctctcctttt aggagtaagc catcccacaa gttctatacc atatttttag  
tgacagttga gtttgtagat acactttata acattttata gtttaagag ctttattaat  
gcaataaat aactttgtac acatttttat ataaaaaac agcaagtgat ttcagaatgt  
tgtaggcctc attagagctt ggtctccaaa aatctgtttg aaaaaagcaa catgttcttc  
acagtgttcc cctagaaagg aagagattta attgccagtt agatgtggca tgaaatgagg  
gacaaagaaa gcatctcgta ggtgtgtcta ctgggtttta acttattttt ctttaataaa  
atacattgtt ttcttaaaaa aaaaaaaaaa

(SEQ ID NO: 10)

FIG. 13 (cont.)

ES 2 755 725 T3

MRFLAATFLLLALSTAAQAEPVQFKDCGSVDGVIKEVNVSPCPTQPCQLSKGQSYSVNVTFSTNIQSK  
SSKAVVHGILMGVPVFPPIPEPDGCKSGINCPIQKDKTYSYLNKLEVKSEYPSIKLVVEWQLQDDKNQ  
SLFCWEIPVQIVSHL  
(SEQ ID NO: 11)

FIG. 14

ES 2 755 725 T3

```
acaggtegcc tgactgggct cctccccggg cccgccccga caggtttgto ttgtgaccgc  
gggcggecgc tgcttctttc ccgagcttgg aacttcgtta tccgcgatgc gtttcctggc  
agctacattc ctgctcctgg cgcgcagcac cgtgcccag gccgaacogg tgcagttcaa  
ggactgcggt totgtggatg gagttataaa ggaagtgaat gtgagcccat gccccacca  
acctgccag ctgagcaaag gacagcttta cagcgtcaat gtcaccttca ccagcaatat  
tcagtctaaa agcagcaagg ccgtgggtgca tggcatcctg atgggcgtcc cagttccctt  
tcccattcct gagootgatg gttgtaagag tgggaattaac tgccttatcc aaaaagacaa  
gacctatagc tacotgaata aactaccagt gaaaagcgaa tatccctcta taaaactggt  
ggtaggagtgg caacttoagg atgacaaaaa ccaaagtctc ttctgctggg aaatcccagt  
acagatcggt totcatctct aagtgcctca ttgagttcgg tgcctctggc caatgagtct  
gctgagactc ttgacagcac ctccagctct gctgcttcaa caacagtgac ttgctctcca  
atggtatcca gtgattcgtt gaagaggagg tgctctgtag cagaaaactga gctccgggtg  
gctggttctc agtggttgtc tcatgtctct tttctgtct taggtgggtt cattaatgc  
agcacttggg tagcagatgt ttaatttttt ttttaacaac attaaactgt ggootctttc  
tacacctgga aatttactct tgaataaata aaaactcgtt tgtcttgtca aaaaaaaaaa  
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

(SEQ ID NO: 12)

FIG. 15

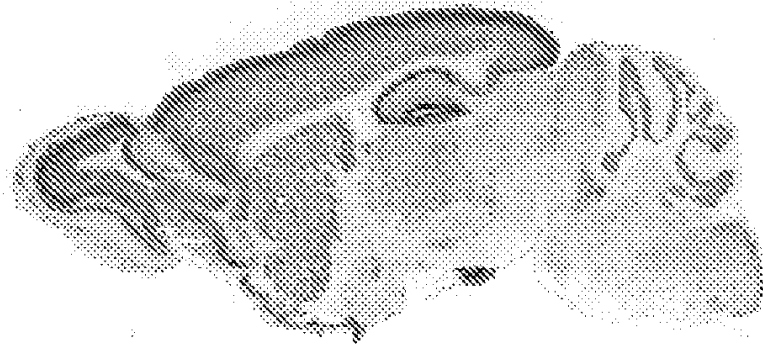


FIG. 16A

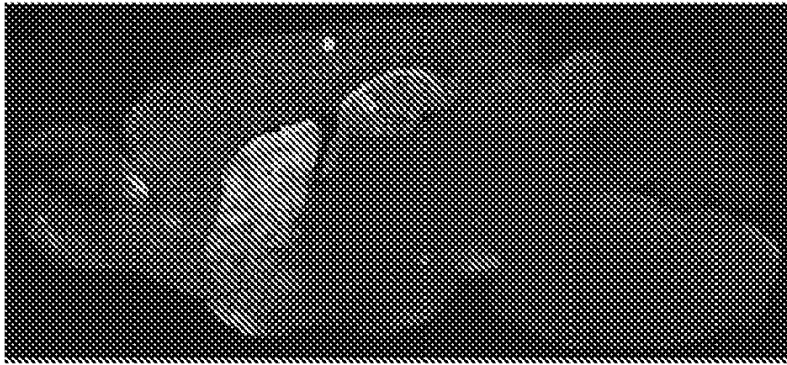


FIG. 16B

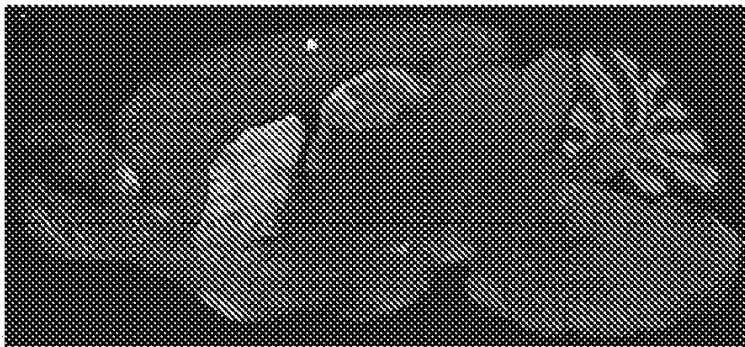


FIG. 16C

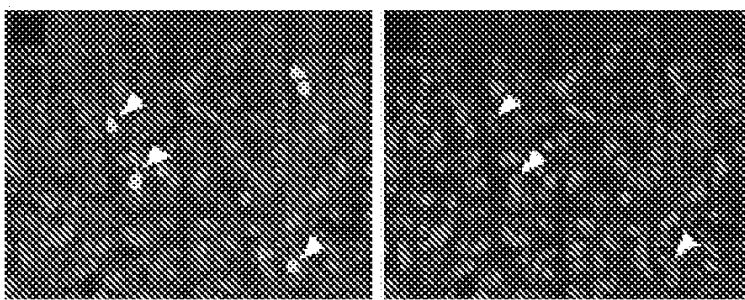


FIG. 16D y 16E

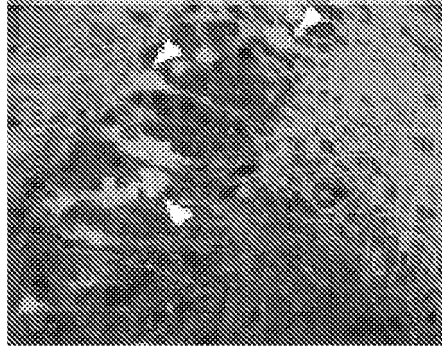


FIG. 16F

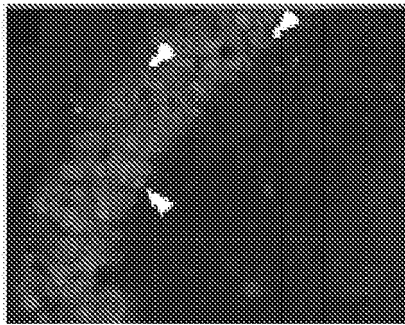


FIG. 16G



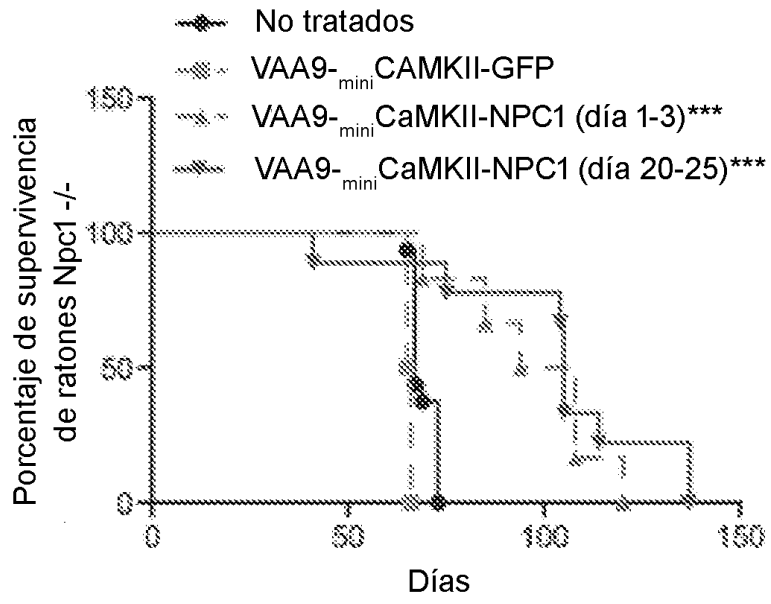


FIG. 17A

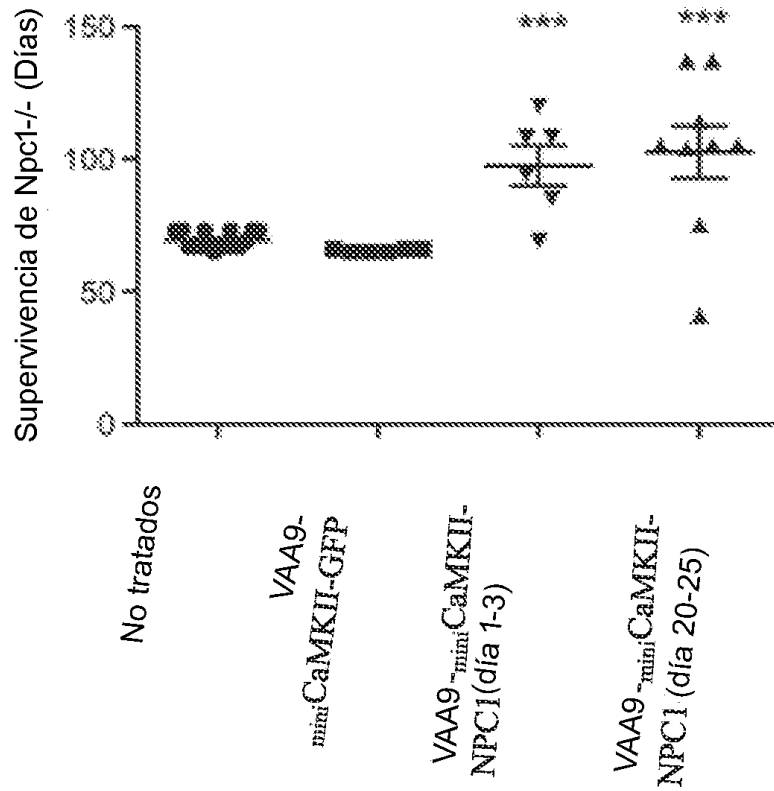


FIG. 17B

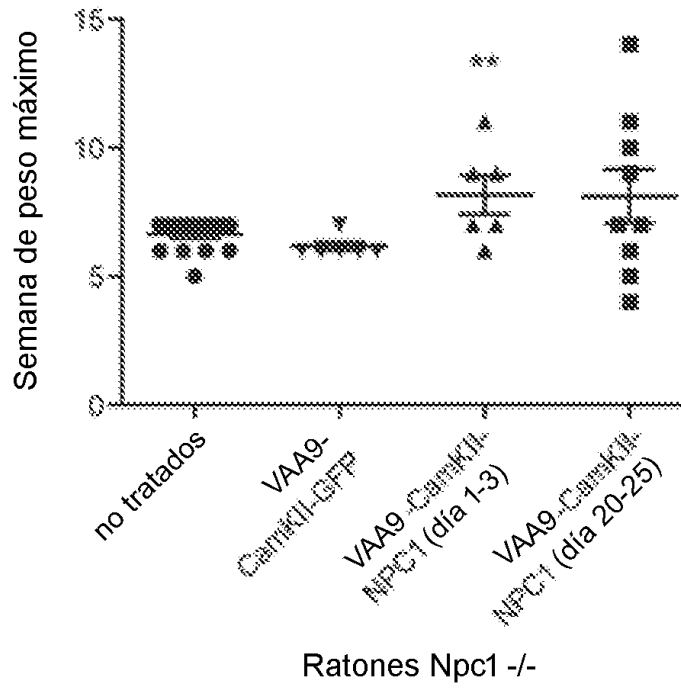


FIG. 17C

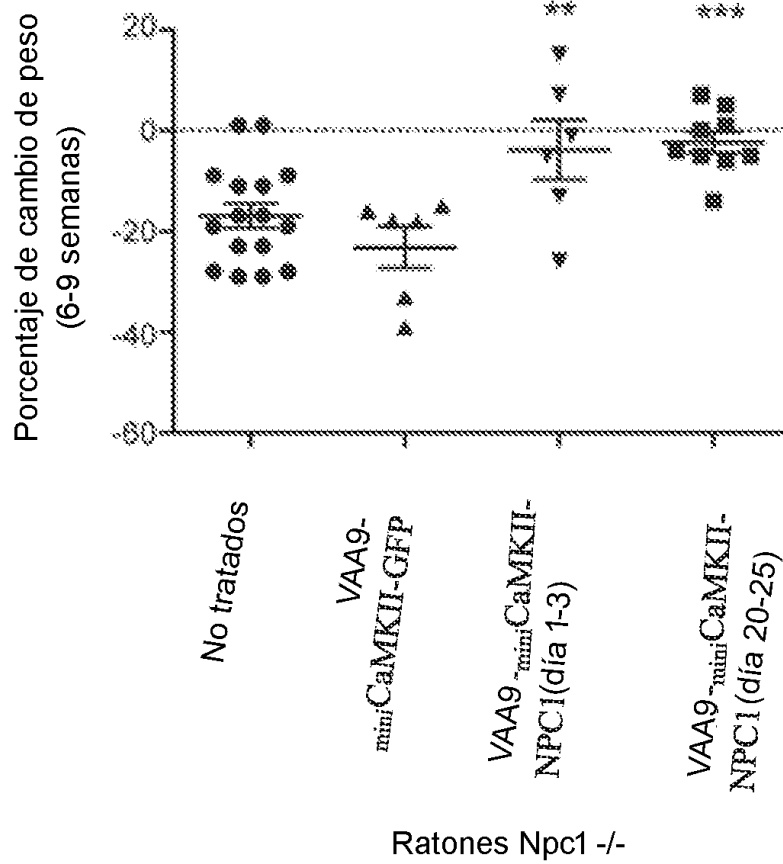


FIG. 17D

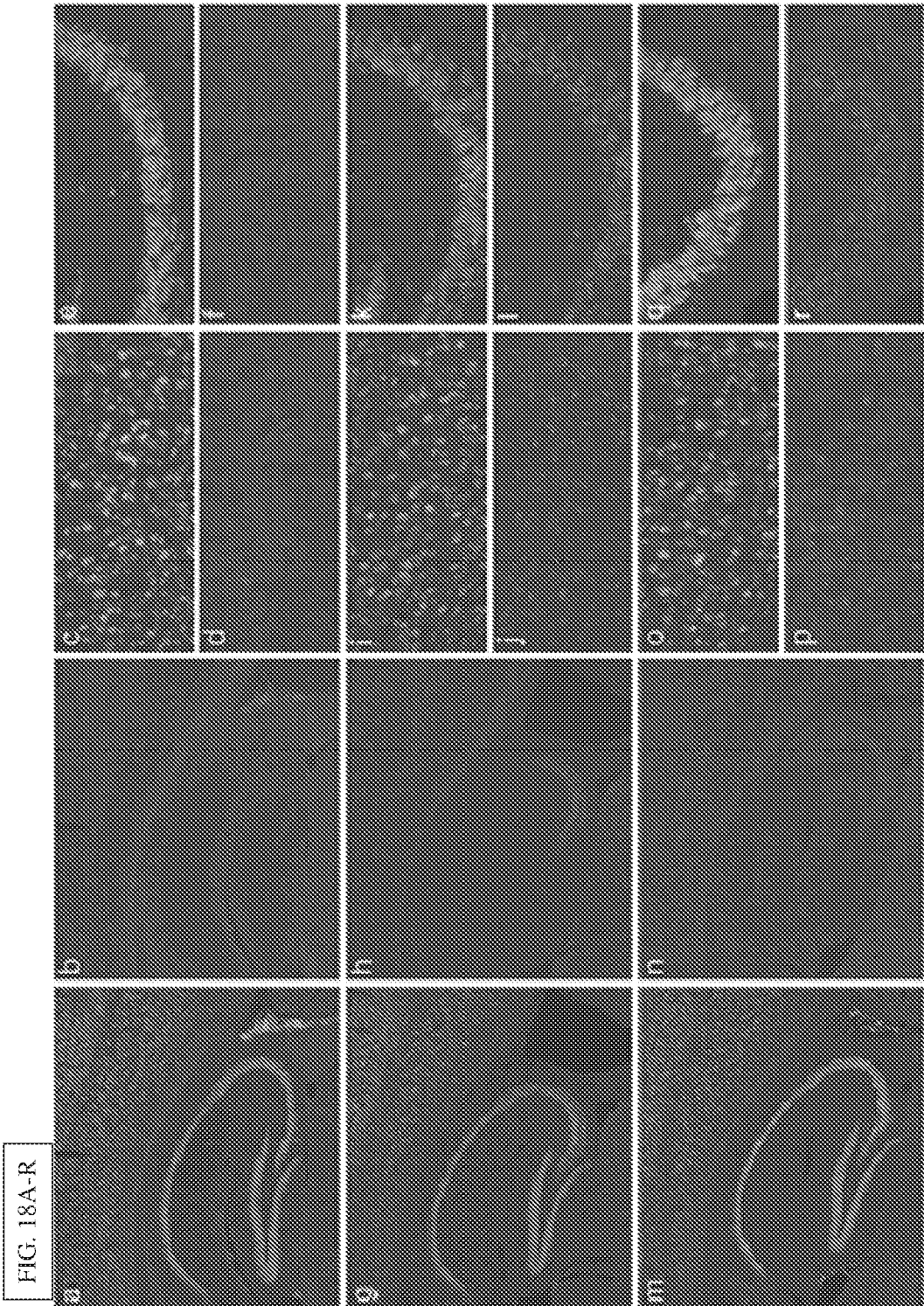


FIG. 18A-R

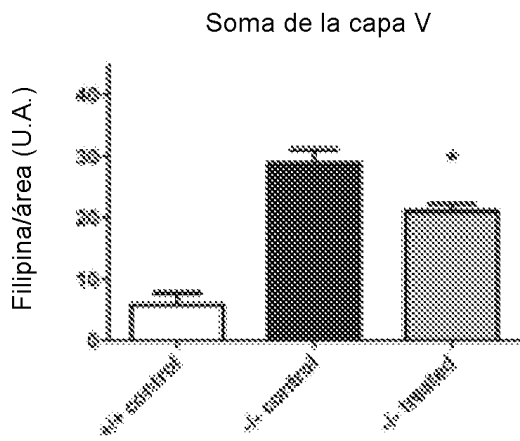


FIG. 18S

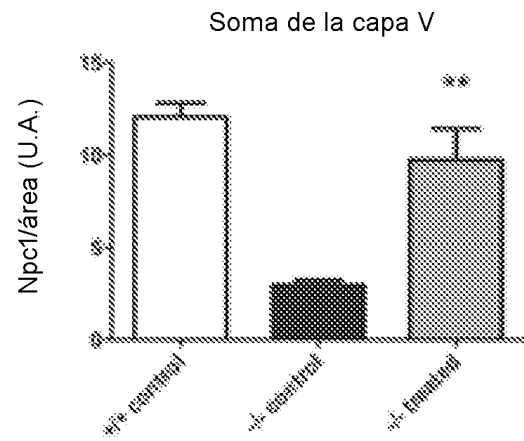


FIG. 18T

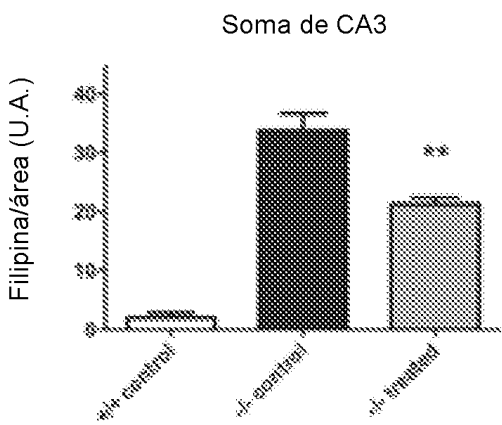


FIG. 18U

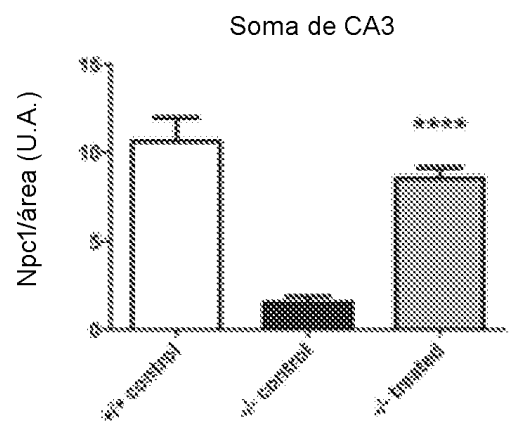


FIG. 18V

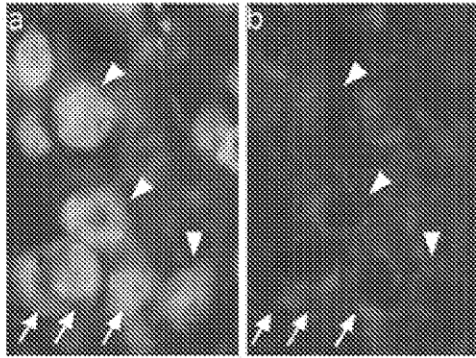


FIG. 19A-B

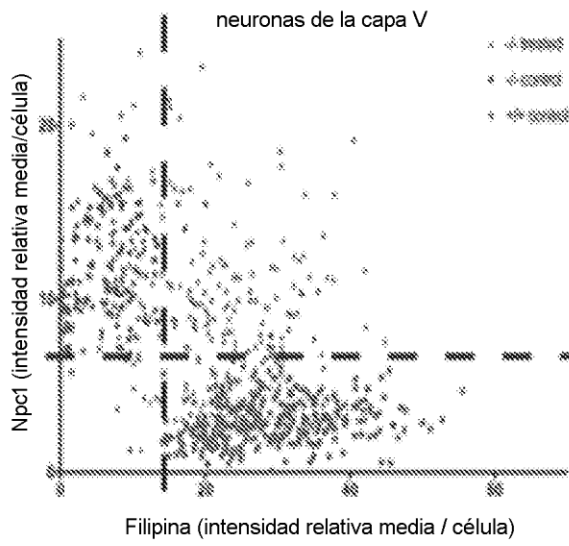


FIG. 19 C

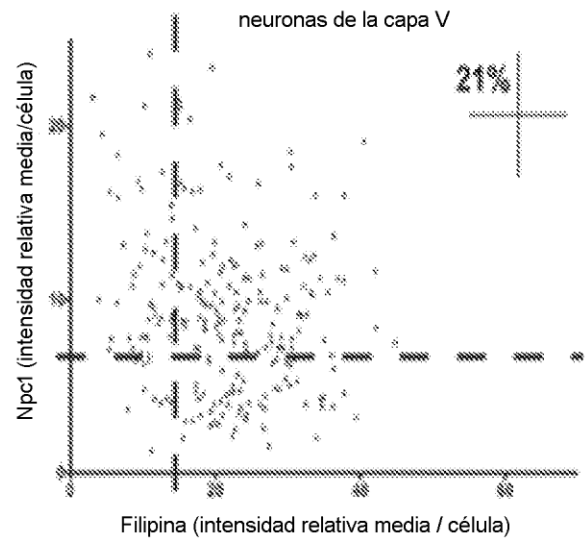


FIG. 19D

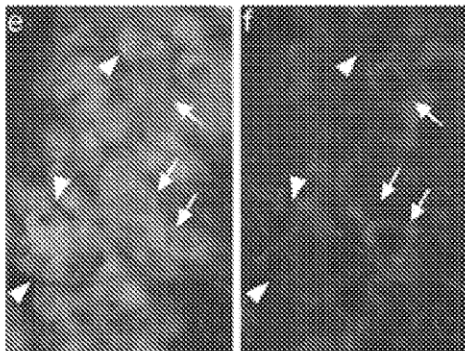


FIG. 19 E-F

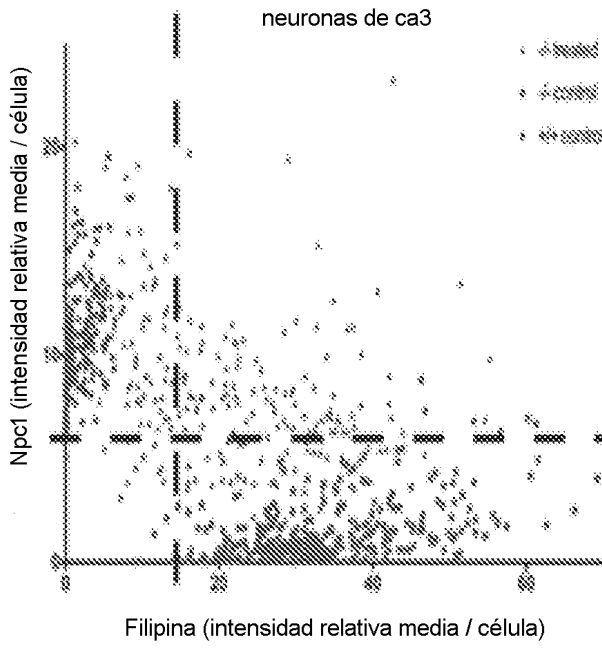


FIG. 19G

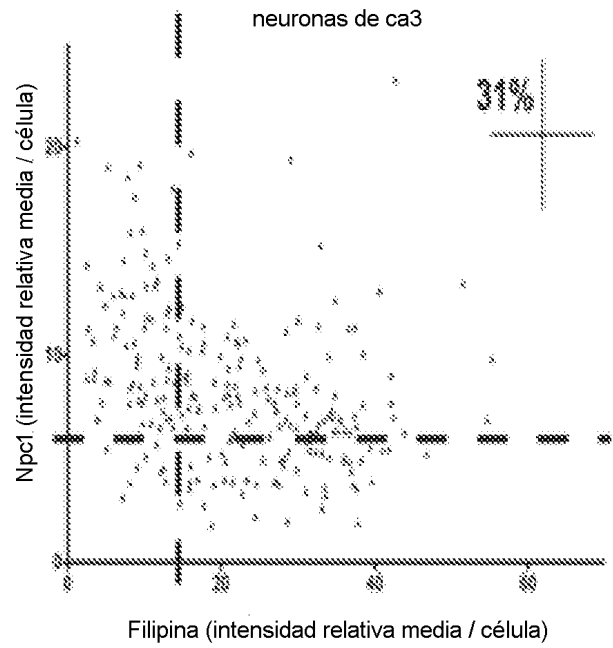


FIG. 19H

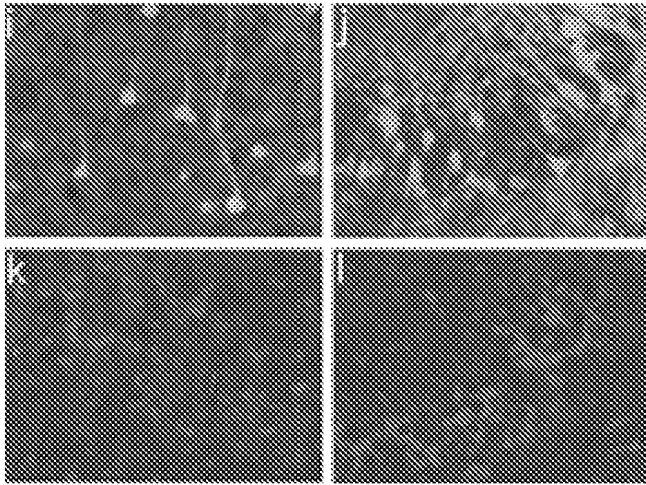


FIG. 19 I-L

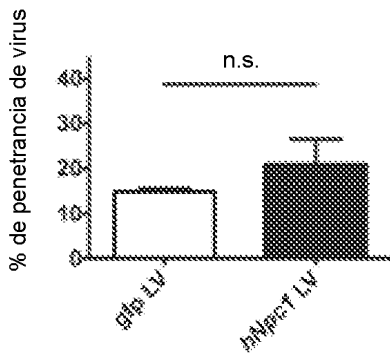


FIG. 19 M

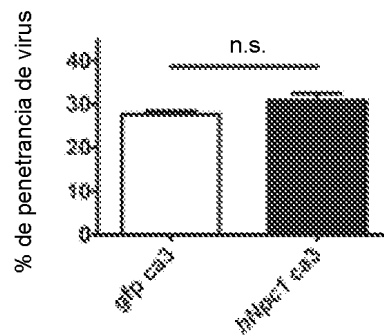


FIG. 19N

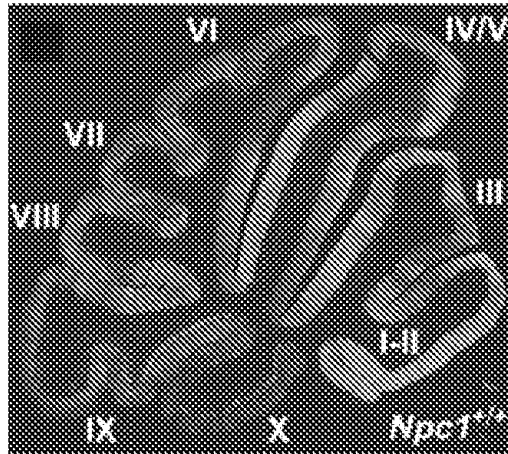


FIG. 20 A

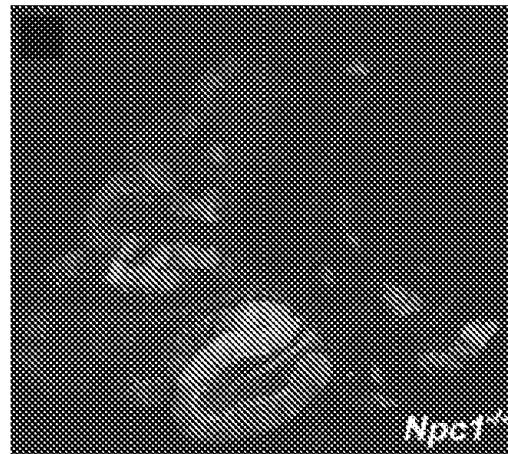


FIG. 20B



FIG. 20C

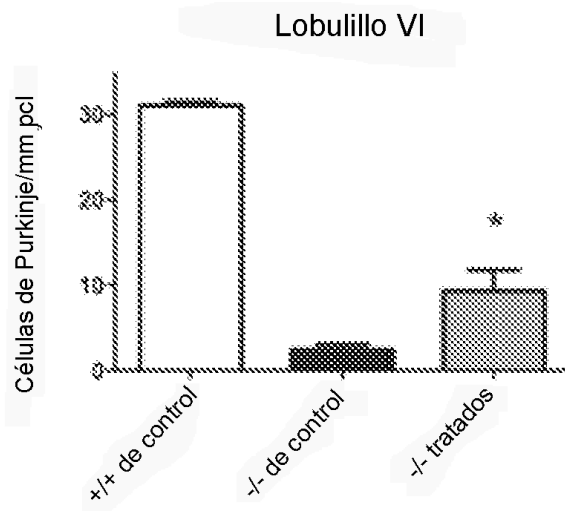


FIG. 20D

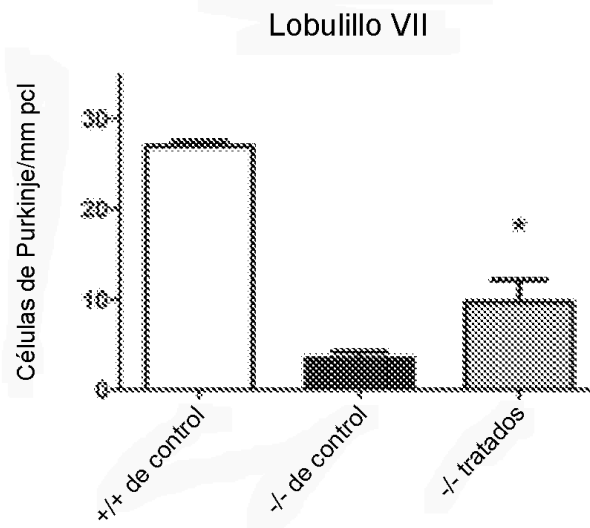


FIG. 20E

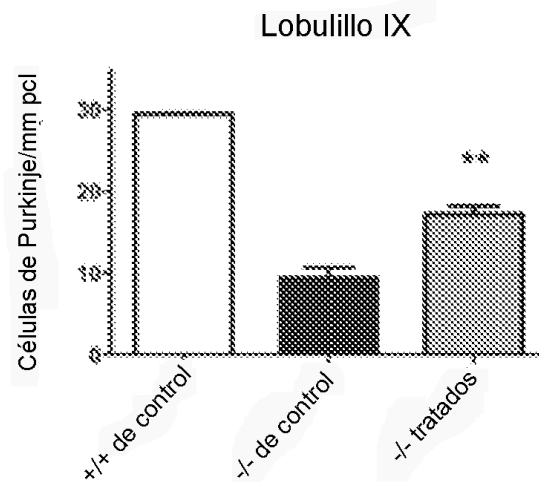
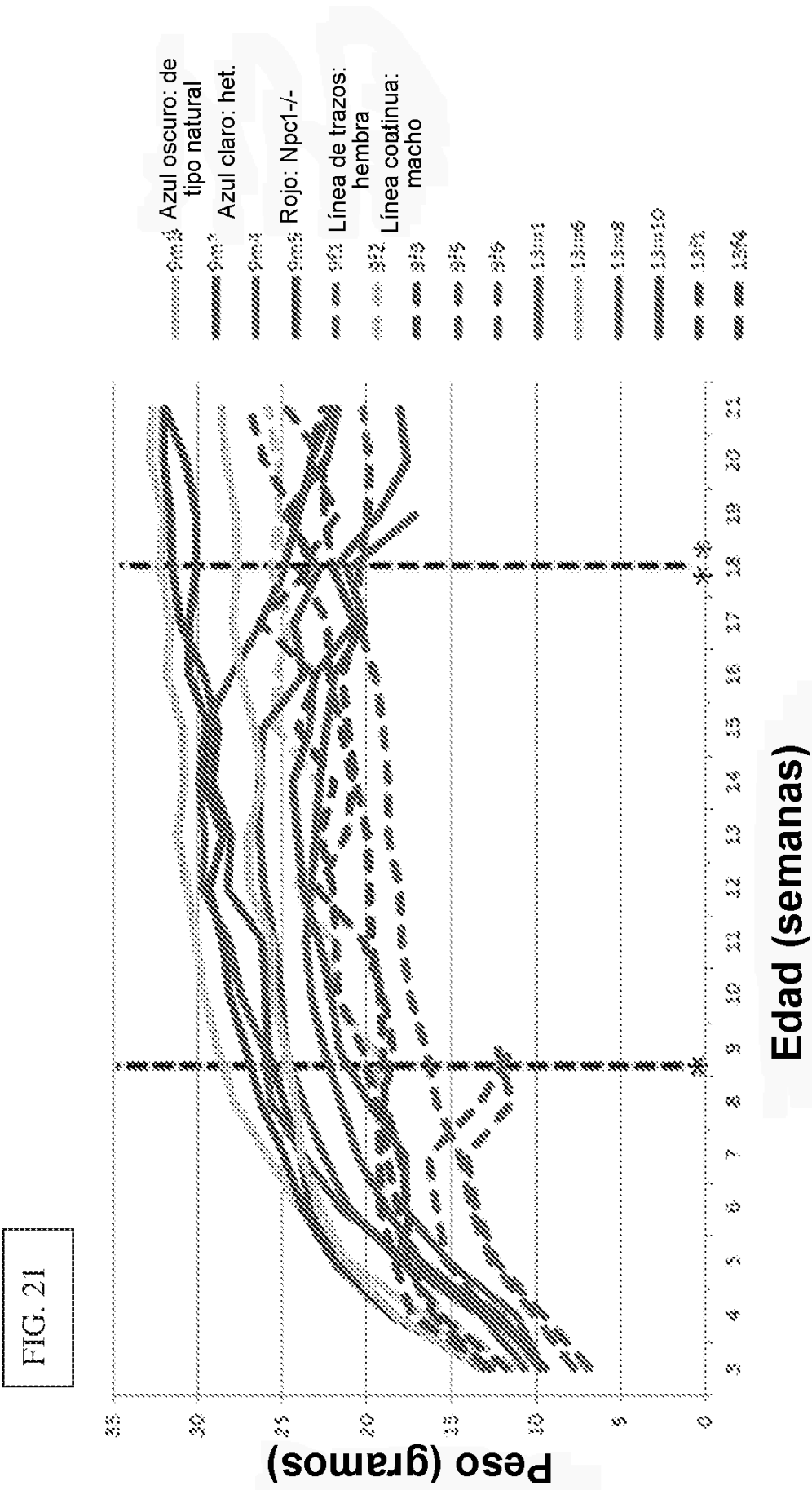


FIG. 20F





\* Edad a la que mueren ~ 50% de los ratones  $Npc1^{-/-}$  no tratados

\*\* Edad a la que mueren ~ 100% de los ratones  $Npc1^{-/-}$  tratados con VAA9-<sub>mini</sub>CaMKII-NPC1

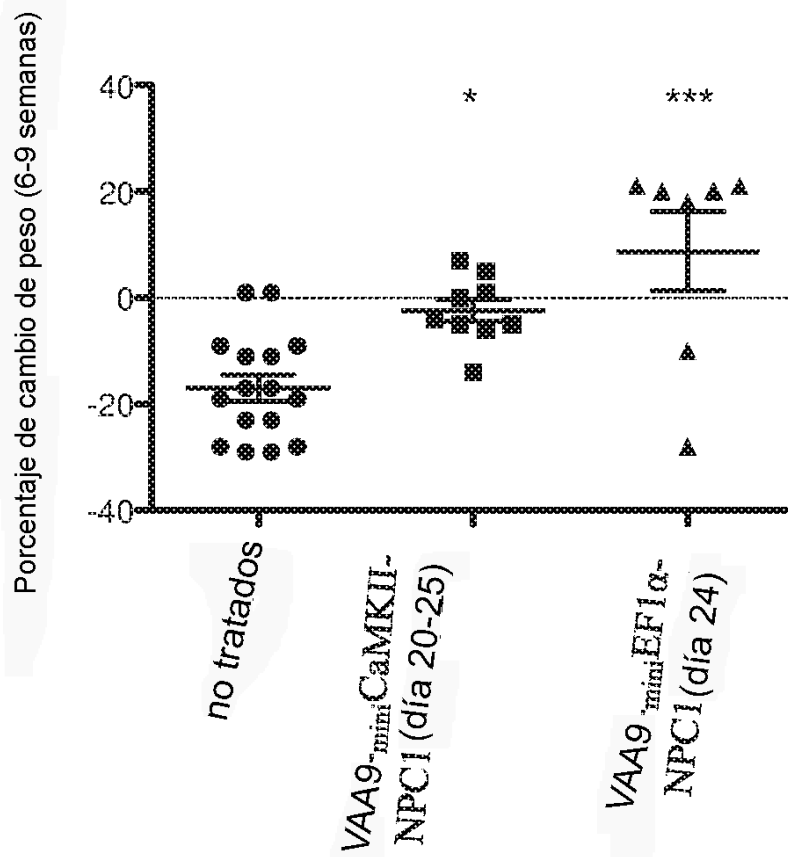


FIG. 22A

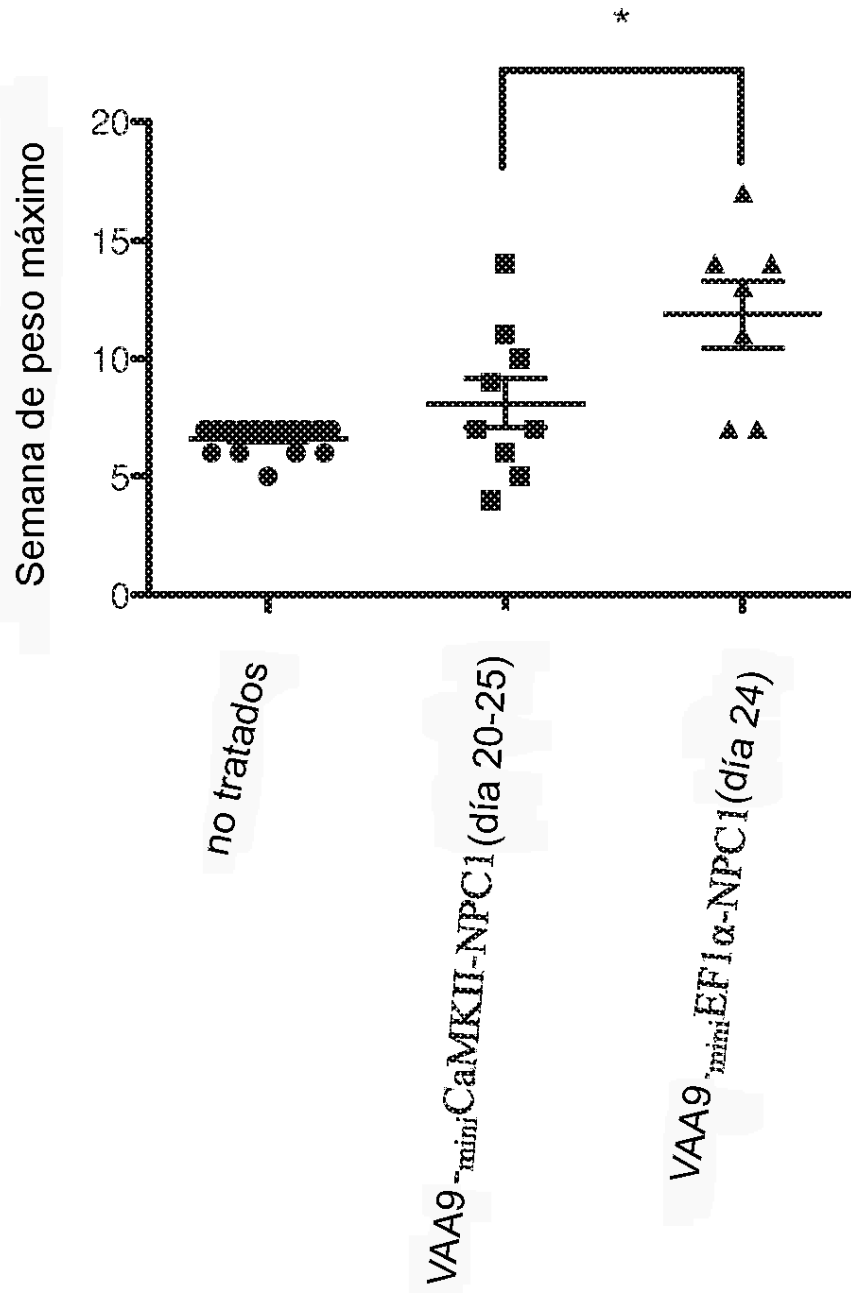


FIG. 22B

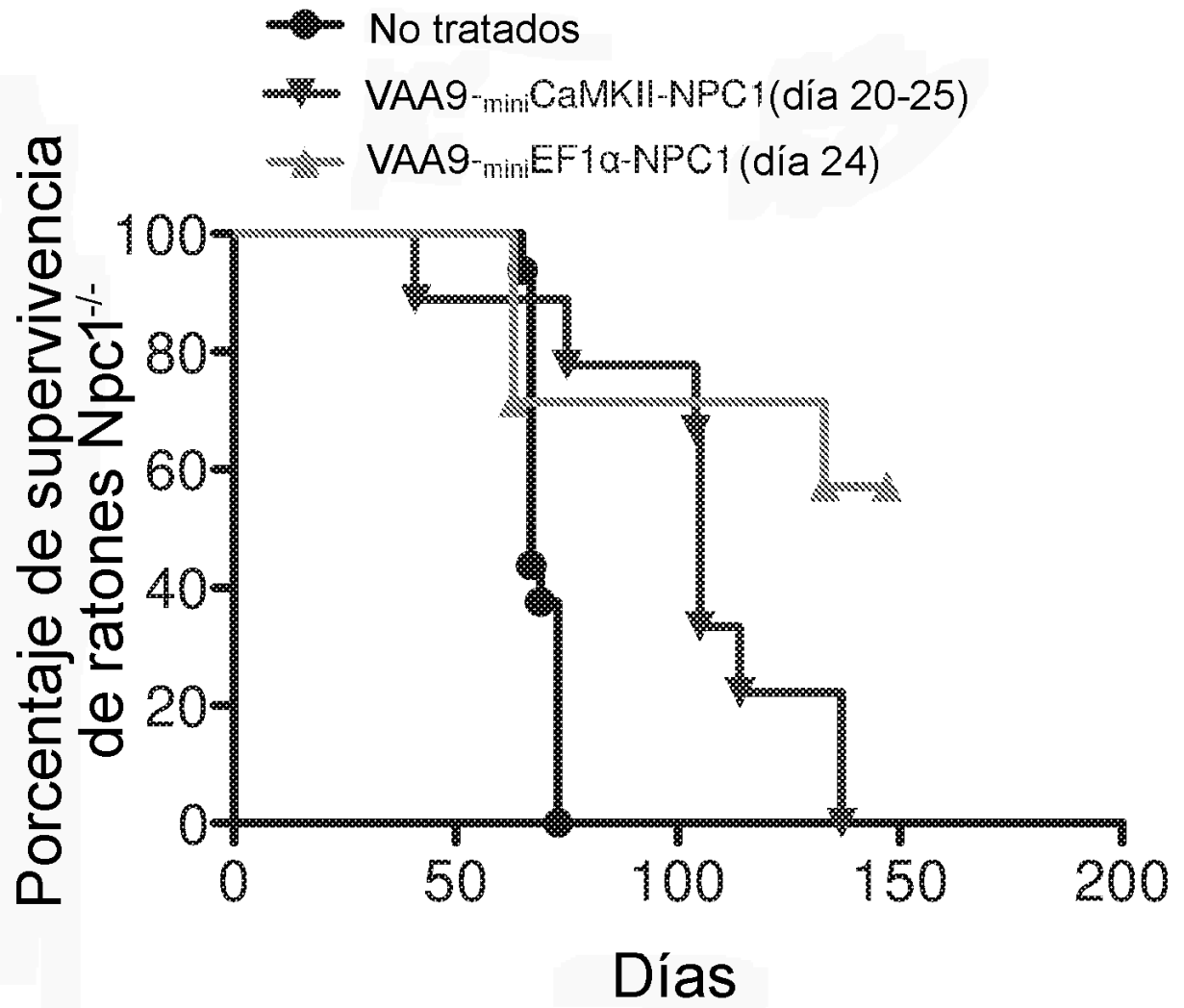


FIG. 23