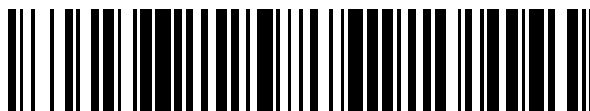


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 078**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/861** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2013 PCT/US2013/031725**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13172964**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013 E 13790429 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 2850195**

54 Título: **Métodos y composiciones para tratar depósitos amiloides**

30 Prioridad:

**18.05.2012 US 201261648801 P**

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

**08.10.2020**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION  
(50.0%)  
2660 University Capitol Center  
Iowa City, IA 52242, US y  
THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**DAVIDSON, BEVERLY, L. y  
HYMAN, BRADLEY, T.**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

ES 2 786 078 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

Métodos y composiciones para tratar depósitos amiloides

**ANTECEDENTES**

5 [0001] La transferencia de genes es actualmente reconocida como una herramienta poderosa para el análisis de eventos biológicos y procesos de enfermedades a nivel celular y molecular. Más recientemente, la aplicación de terapia génica para el tratamiento enfermedades humanas, heredadas (por ejemplo, deficiencia de ADA) o adquiridas (por ejemplo, cáncer o enfermedad infecciosa), ha recibido una atención considerable. Con el advenimiento de las técnicas de transferencia génica mejoradas y la identificación de una biblioteca en expansión continua de enfermedades relacionadas con genes defectuosos, la terapia génica ha evolucionado rápidamente de una teoría del tratamiento a una realidad práctica.

15 [0002] Tradicionalmente la terapia génica ha sido definida como un procedimiento en el cual se introduce un gen exógeno en las células de un paciente con el objetivo de corregir un error genético de nacimiento. Más recientemente, la terapia génica ha sido definida de una manera más amplia como la corrección de un fenotipo de enfermedad mediante la introducción de nueva información genética en el organismo afectado. En la terapia génica *in vivo*, se introduce un gen transferido en las células de un organismo receptor *in situ* es decir, dentro del receptor. La terapia génica *in vivo* ha sido estudiada en modelos animales. Se ha reportado la factibilidad de la transferencia génica directa *in situ* en órganos y tejidos tales como músculo, células madre hematopoyéticas, la pared arterial, el sistema nervioso, y los pulmones. También se ha informado que la inyección directa de ADN en el músculo esquelético, músculo cardíaco y la inyección de complejos de ADN-lípidos en la vasculatura generan un nivel de expresión detectable del o los productos genéticos insertados *in vivo*.

25 [0003] El tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central (SNC), por ejemplo, las enfermedades genéticas del cerebro tales como la enfermedad de Alzheimer, sigue siendo un problema no solucionado. Un problema importante con el tratamiento de enfermedades del cerebro es que cuando se administran proteínas terapéuticas de manera intravenosa no atraviesan la barrera hematoencefálica, o cuando se administran de manera directa al cerebro, no se distribuyen por completo. Por lo tanto, es necesario desarrollar terapias para tratar la enfermedad de Alzheimer.

30 [0004] En Dodart y col., PNAS, vol. 102, no. 4 (2005), páginas 1211-1216 se describe la administración génica de apolipoproteína E humana al cerebro mediante el uso de un en un modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer. También se describe que la apoE2 reduce la carga de A $\beta$  cerebral en el modelo de ratón en comparación a apoE3 y apoE4.

**RESUMEN**

35 [0005] La presente invención se relaciona con una partícula de rAAV2 que comprende una proteína de la cápside de AAV2 y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para una proteína protectora isoforma  $\epsilon$ 2 de ApoE insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV2, para usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un mamífero, en donde la partícula de rAAV se administra a una célula endotelial proveyendo de esta manera el ácido nucleico a la célula endotelial, en donde la célula endotelial secreta la proteína ApoE  $\epsilon$ 2 para tratar la enfermedad, y en donde el mamífero es un mamífero no roedor.

40 [0006] La presente invención además se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una partícula de rAAV2 que comprende una proteína de la cápside de AAV2 y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para una proteína protectora isoforma  $\epsilon$ 2 de ApoE insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV2, para usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un mamífero, en donde la partícula de rAAV2 se administra a una célula endotelial proveyendo de esta manera el ácido nucleico a la célula endotelial, en donde la célula endotelial secreta la proteína ApoE  $\epsilon$ 2 para tratar la enfermedad, y en donde el mamífero es un mamífero no roedor.

45 [0007] En determinadas formas de realización, se describe un método para tratar la enfermedad de Alzheimer en un mamífero que comprende administrar al líquido cefalorraquídeo (LCR) del mamífero una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAV y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para una proteína isoforma protectora de ApoE insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV de una manera eficaz para infectar una célula endotelial en el mamífero no roedor, en donde la célula endotelial secreta la ApoE para tratar la enfermedad. Como se usa en la presente, el término "isoforma protectora de ApoE" se usa para distinguir las isoformas de ApoE que disminuyen el riesgo de enfermedad de Alzheimer en un al menos 5%, tal como 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o más.

- 5 [0008] En determinadas formas de realización, se describe un método para administrar a isoforma protectora de ApoE al sistema nervioso central de un mamífero no roedor, que comprende administrar al líquido cefalorraquídeo (LCR) del mamífero no roedor una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAV y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para la isoforma protectora de ApoE insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV de una manera eficaz para infectar células endoteliales en el mamífero no roedor de manera que las células endoteliales secreten la ApoE al LCR del mamífero. En determinadas formas de realización, la partícula de rAAV es una partícula de rAAV2 que infecta la célula endotelial de un individuo no roedor con un índice mayor que 20% el índice de infectividad de AAV4, tal como con un índice mayor que 50% o 100%, 1000% o 2000% mayor que el índice de infectividad de AAV4.
- 10 [0009] En determinadas formas de realización, se describe un método para tratar una enfermedad en un mamífero no roedor que comprende administrar a las células endoteliales del mamífero una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAV y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para una proteína isoforma protectora de ApoE insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, proveyendo de esta manera el ácido nucleico a la célula endotelial, en donde la célula endotelial secreta la proteína ApoE para tratar la enfermedad. Se describe un método para administrar un ácido nucleico a una célula endotelial en un mamífero que comprende administrar al mamífero una partícula de AAV que comprende el ácido nucleico insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, proveyendo de esta manera el ácido nucleico a una célula endotelial en el mamífero.
- 15 [0010] En determinadas formas de realización, se describe un método para administrar un ácido nucleico que codifica para una isoforma protectora de ApoE a una célula endotelial de un mamífero que comprende administrar a la célula endotelial una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAV y un vector que comprende el ácido nucleico insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, proveyendo de esta manera el ácido nucleico a la célula endotelial.
- 20 [0011] En determinadas formas de realización, se describe un método para administrar un ácido nucleico que codifica para una isoforma protectora de ApoE a un mamífero que comprende administrar a una célula endotelial del mamífero una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAV y un vector que comprende el ácido nucleico insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, y regresar la célula endotelial al mamífero, proveyendo de esta manera el ácido nucleico al mamífero.
- 25 [0012] En determinadas formas de realización, se describe un método para administrar un ácido nucleico que codifica para una isoforma protectora de ApoE a una célula endotelial en un mamífero que comprende administrar al mamífero una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAV y un vector que comprende el ácido nucleico insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, proveyendo de esta manera el ácido nucleico a una célula endotelial en el mamífero.
- 30 [0013] En determinadas formas de realización, se describe un método para transfectar una célula endotelial al cerebro de mamífero que comprende administrar al líquido cefalorraquídeo (LCR) del mamífero una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAV y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para una isoforma protectora de ApoE insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV de una manera eficaz para infectar células endoteliales en el mamífero de manera que las células endoteliales secreten el agente al LCR del mamífero.
- 35 [0014] En determinadas formas de realización, el mamífero es un mamífero no roedor. En determinadas formas de realización, el mamífero no roedor es un primate, caballo, oveja, cabra, cerdo, o perro. En determinadas formas de realización, el primate es un humano.
- 40 [0015] En determinadas formas de realización, la isoforma protectora de ApoE tiene al menos aproximadamente 80% de homología con ApoE  $\epsilon$ 2. En determinadas formas de realización, la isoforma protectora de ApoE tiene un 100% de homología con ApoE  $\epsilon$ 2.
- 45 [0016] En determinadas formas de realización, la partícula de AAV es una partícula de rAAV4. En determinadas formas de realización, la partícula de AAV es una partícula de rAAV2. En determinadas formas de realización, la cápside de rAAV2 tiene al menos 80% de homología con la proteína de la cápside de AAV2 VP1, VP2 y/o VP3. En determinadas formas de realización, la cápside de rAAV2 tiene 100% de homología con VP1, VP2, y/o VP3 de la cápside de AAV2.
- 50 [0017] En determinadas formas de realización, se describe una partícula de rAAV que contiene un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para una isoforma protectora de ApoE insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV para usar en la transfección de células endoteliales en un mamífero para producir un resultado terapéutico.

[0018] En determinadas formas de realización, se describe el uso de una partícula de rAAV que contiene un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para una isoforma protectora de ApoE insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV para la elaboración de un medicamento útil para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer en un animal, tal como un humano.

5 [0019] Se describe una célula como se describe precedentemente para usar en el tratamiento médico o diagnóstico.

[0020] Se describe un uso de la célula como se describe precedentemente para preparar un medicamento útil para tratar la enfermedad de Alzheimer en un mamífero.

10 [0021] En determinadas formas de realización, se describe un kit que comprende un compuesto de partícula de rAAV que contiene un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para una isoforma protectora de ApoE insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, un recipiente, y un prospecto o etiqueta que indica la administración de la partícula de AAV al LCR para tratar la enfermedad de Alzheimer en un animal.

### **DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS**

[0022] **Figuras 1A -1B.** La inyección intravascular de AAV4-ApoE genera una expresión estable de huAPOE y una detección sostenida de la proteína huApoE recombinante en el cerebro.

15 **Figura 2.** La sobreexpresión de cada isoforma de ApoE afecta de manera diferencial a la progresión de amiloidosis.

**Figura 3.** Los tamaños de las placas amiloides varían de acuerdo con cada isoforma de ApoE.

**Figuras 4A-4B.** La evaluación luego de la muerte de la carga amiloide confirma los efectos de ApoE2 y ApoE4 sobre la deposición amiloide.

20 **Figuras 5A-5D.** Cada isoforma afecta de manera diferencial a la densidad sináptica alrededor de los depósitos amiloides.

La **Figura 6A** es un alineamiento de las proteínas AAV2 (SEQ ID NO:1) y AAV4 (SEQ ID NO:2) y la **Figura 6B** es un alineamiento de los nucleótidos AAV2 (SEQ ID NO:3) y AAV4 (SEQ ID NO:4) en base a la secuencia de AAV2 (NC\_001401) y AAV4 (NC\_001829).

En la **Figura 7** se muestra la actividad elevada de TPP1 en diferentes regiones del cerebro.

25 En la **Figura 8** se muestran los resultados del rendimiento en laberinto en T de perros control y tratados. Los círculos claros son de perros afectados; los cuadrados oscuros son de perros normales, y los círculos oscuros son de un perro TPP-/- tratado con AAV2-CLN2.

30 **Figuras 9A -9B. Validación de la estrategia de transferencia génica de APOE mediante inyección intraventricular de un AAV serotipo 4.** El marcaje inmunohistológico de GFP o ApoE reveló la presencia de GFP o la proteína ApoE humana en el epéndimo y en el plexo coroides. (A) Uso de un ensayo de ELISA específico de especie para cuantificar las concentraciones de proteína ApoE humana recombinante en los homogenatos de cerebro de ratones inyectados. (B) Evaluación del porcentaje de proteína ApoE humana en comparación con apoE endógena por ratón. Se calculó la relación de ApoE humana y apoE endógena murina para cada animal. Con el uso del anticuerpo 3H1 específico anti-ApoE humana, se podría detectar la presencia de la proteína recombinante  
35 alrededor de algunos depósitos amiloides en donde tiende a acumularse, en el parénquima cortical de ratones inyectados APP/PS1. Detección de ApoE mediante transferencia Western en la muestra de ISF de ratones KO para apoE inyectados con un vector AAV4-APOE4. Se usó el anticuerpo muy sensible (pero no específico de especie) anticuerpo de cabra anti-apoE de Millipore (AB947) como anticuerpo de detección. Se usó albúmina como control. n=4-6 animales por grupo. \*p<0,05.

40 **Figuras 10A -10D. Los niveles de péptidos A $\beta$  y la densidad depósitos amiloides están modulados por la sobreexpresión de diferentes alelos de APOE.** (A) Análisis de la densidad de depósitos amiloides en la corteza (panel izquierdo) e hipocampo (panel derecho) de ratones transgénicos inyectados. Se puede observar una tendencia similar entre ambas áreas del cerebro, pero los datos sólo alcanzan una significancia estadística en la corteza. (B) Determinación mediante ELISA de las concentraciones de los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> en la fracción de ácido fórmico (FA). (C) Cuantificación mediante ELISA de los niveles de péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> en la fracción soluble de TBS 5 meses después de la inyección intraventricular de cada AAV. (D) Cuantificación de los niveles en plasma de los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub>, 5 meses después de la inyección intraventricular de ratones APP/PS1 con los vectores AAV-GFP y AAV-APOE2/3/4. n= 4-7 animales por grupo. \*p<0,05.

45

**Figuras 11A -11B. La sobreexpresión de cada variante de APOE modula de manera diferencial la progresión de amiloidosis *in vivo*.**

Se obtuvieron imágenes de dos fotones *in vivo* de la deposición amiloide en ratones APP/PS1 a una semana (T0), un mes (T1) y dos meses (T2) después de la inyección intracerebroventricular con los vectores AAV-GFP, -APOE2, -3 o -4. Se realizó una inyección intravenosa de Texas red dextrano (70.000 Da) antes de obtener las imágenes de manera de poder seguir los mismos campos observados en el tiempo. En un período de dos meses de tiempo, se pudieron detectar unas pocas placas amiloides nuevas, mientras que los depósitos ocasionales visibles inicialmente no fueron más detectados después de uno o dos meses. (A) Evaluación de la densidad cortical volumétrica de depósitos amiloides en un período de dos meses de tiempo después de la inyección intraventricular de un AAV-GFP, -APOE2, -APOE3 o APOE4 en ratones APP/PS1 de 7 meses de edad. Se obtuvieron imágenes de seis a ocho campos de observación de manera longitudinal para cada animal y se calculó la densidad de placas por volumen de corteza y se informó respecto al valor inicial para cada animal en basal (T0). Se observó una progresión total de 0,23 de la densidad de depósitos amiloides en el tiempo (T2/T1,  $p < 0,011$ ). Además, la ApoE2 reduce significativamente la densidad relativa a GFP en un 0,66 (se=0,21,  $p = 0,002$ ), en relación a ApoE3 en un 0,67 (se=0,17,  $p < 0,0001$ ) y en relación a ApoE4 en un 0,74 (se=0,17,  $p < 0,0001$ ). (B) El ajuste de regresión lineal de la progresión de amiloidosis durante los 2 meses después de la transferencia génica en ratones APP/PS1 muestra que sólo el AAV-APOE4 induce una pendiente positiva significativa durante este periodo de tiempo.  $n = 4-6$  animales por grupo. \* $p < 0,05$ .

**Figura 12. Evolución del tamaño de los depósitos amiloides a uno y dos meses después de la infusión con ApoE2, -3 y -4.**

Los gráficos de dispersión que representa la relación de los tamaños de placa entre T1 y T0 mostraron que ApoE4 se asoció con crecimiento de placa aumentado con ApoE2 y ApoE3 después de un mes. Este efecto no se sostiene después de 2 meses.  $n > 50$  placas medidas por grupo en 3 a 4 animales. \* $p < 0,05$ .

**Figuras 13A -13C. Los cambios neuropatológicos asociados con los depósitos amiloides son afectados de manera diferencial por cada variante de APOE.**

Se prepararon imágenes de secciones de tomografía matricial con inmunotinción para PSD95 (elemento postsináptico) y depósitos amiloides en ratones APP/PS1 2 meses después de la inyección intraventricular de AAV-GFP, -APOE2, -APOE3 y -APOE4. Los depósitos amiloides se marcaron usando el anticuerpo NAB61 que previamente había mostrado preferiblemente las especies oligoméricas A $\beta$  tóxicas (A) Se observó una pérdida significativamente mayor del marcador sinapsina-1 en la cercanía de las placas amiloides cuando se expresaron APOE3 y APOE4 en comparación con GFP o APOE2. (B) Se observó un efecto similar cuando se cuantificaron los elementos postsinápticos, de manera que la densidad de PSD95 alrededor de los depósitos disminuyó 2 meses después de una inyección intraventricular de AAV4-APOE4. Como parámetro adicional del cambio neuropatológico, se evaluó el número de distrofias neuríticas por placa amiloide en el cerebro de ratones APP/PS1 inyectados, después de la inmunotinción ThioS y el marcador axonal SMI312. (C) se observó un desplazamiento significativo hacia mayor número de distrofias cuando los ratones fueron infundidos con ApoE4 en comparación con los grupos ApoE3 y ApoE2, sugiriendo de esta manera que ApoE4 podría tener efectos deletéreos más allá de la formación de placas amiloides y podría modular el potencial neurotóxico de agregados amiloides oligoméricos más pequeños.  $n = 4-6$  animales por grupo. \* $p < 0,05$ .

**Figura 14. Se observan cambios más tempranos en el contenido de especies oligoméricas de A $\beta$  en el ISF después de la inyección intracerebroventricular de AAV4-APOE2, -3, -4 en ratones Tg2576.**

La cuantificación del contenido de oA $\beta$  en ISF usando el ensayo de ELISA 82E1/82E1 muestra que hay una concentración mayor de especies oligoméricas de amiloide  $\beta$  después de la inyección de AAV4-APOE4 en comparación con AAV4-APOE2 y -GFP, mientras que los ratones inyectados con AAV4-APOE3 alcanzaron un nivel intermedio.  $n = 3-6$  animales por grupo. \* $p < 0,05$ .

**Figura 15A -15B. Detección de ARNm y proteína de APOE de humano y endógenos murinos después de la inyección intraventricular de un AAV4 en ratones APP/PS1.**

(A) Gráfico de barras que representan las cantidades de proteína apoE endógena murina en los cerebros de ratones inyectados. (B) Comparación de los niveles de proteína ApoE a 2 y 5 meses después de la inyección intracerebroventricular de AAV4 en ratones APP/PS1 (se combinaron las muestras de todos los ratones inyectados con ApoE de 2 y 5 meses, sin discriminar la variante de APOE).  $n = 4-6$  animales por grupo. \* $p < 0,05$ .

**Figuras 16A -16B. Los efectos de A $\beta$  están asociados con cada isoforma de ApoE después de una exposición corta (2 meses).**

Se prepararon imágenes de deposición amiloide en ratones APP/PS1 2 meses después de la inyección. Se utilizó inmunotinción con el anticuerpo Bam10 y ThioS para teñir todos los depósitos amiloides o placas de núcleo denso respectivamente. (A) El análisis estereológico de la densidad de depósitos amiloides en la corteza reveló que la sobreexpresión de APOE4 llevó a un número aumentado de placas tan pronto como a los 2 meses después de la inyección, mientras que no se pudo observar diferencia entre los otros grupos experimentales. (B) La relación entre la tinción con Bam10 y ThioS, por otra parte, permaneció sin cambios para todos los grupos diferentes. (C) Determinación de las concentraciones de los péptidos A $\beta_{40}$  (paneles izquierdos) y A $\beta_{42}$  (paneles de derechos) en los extractos de ácido fórmico insolubles después de una exposición corta con las diferentes variantes de ApoE.  $n = 3-5$  animales por grupo. \* $p < 0,05$ .

**Figuras 17A -17B. Cambios en las especies A $\beta$  solubles e insolubles detectados después de 3 meses de la inyección en ratones Tg2576.** (A) La cuantificación mediante ELISA del contenido de ISF en A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> (B) muestra que hay una tendencia hacia mayor concentración de péptidos amiloides  $\beta$  solubles después de la inyección de AAV4-APOE4 en comparación con AAV4-APOE2, -APOE3 y -GFP. (B) Tal como se observó previamente en ratones APP/PS1, se observó el mayor efecto con ApoE4, que produce cantidades significativamente mayores de A $\beta$ <sub>42</sub> en la fracción de ácido fórmico de ratones Tg2576. n= 3-5 animales por grupo. \*p<0,05.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

[0023] La presente invención se relaciona con una partícula de rAAV2 que comprende una proteína de la cápside de AAV2 y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para una proteína protectora isoforma  $\epsilon$ 2 de ApoE insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV2, para usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un mamífero, en donde la partícula de rAAV se administra a una célula endotelial proveyendo de esta manera el ácido nucleico a la célula endotelial, en donde la célula endotelial secreta la proteína ApoE  $\epsilon$ 2 para tratar la enfermedad, y en donde el mamífero es un mamífero no roedor.

[0024] La presente invención además se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una partícula de rAAV2 que comprende una proteína de la cápside de AAV2 y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para una proteína protectora isoforma  $\epsilon$ 2 de ApoE insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV2, para usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un mamífero, en donde la partícula de rAAV2 se administra a una célula endotelial proveyendo de esta manera el ácido nucleico a la célula endotelial, en donde la célula endotelial secreta la proteína ApoE  $\epsilon$ 2 para tratar la enfermedad, y en donde el mamífero es un mamífero no roedor.

[0025] Existen diferentes isoformas de apolipoproteína E humana (ApoE), la presencia de algunas de estas isoformas en el cerebro aumenta el riesgo de enfermedad de Alzheimer (AD), mientras que la presencia de otras isoformas disminuye el riesgo de AD. La presencia de la isoforma  $\epsilon$ 4 de ApoE es un factor de riesgo genético fuerte para la AD esporádica de inicio tardío. (Casellano y col., *Sci Transl Med*, 3(89):89ra57 (29 June 2011).) El alelo  $\epsilon$ 4 de ApoE aumenta fuertemente el riesgo de AD y disminuye la edad de aparición. Por otra parte, la presencia del alelo  $\epsilon$ 2 de ApoE parece disminuir el riesgo de AD. Se sugiere que las isoformas de ApoE humana afectan de manera diferencial a la depuración o síntesis de amiloide- $\beta$  (A $\beta$ ) *in vivo*.

[0026] El virus adenoasociado (AAV) es un virus no patogénico pequeño de la familia parvoviridae. El AAV es diferente de los otros miembros de esta familia por su dependencia de un virus colaborador para la replicación. En ausencia de un virus colaborador, el AAV puede integrarse de una manera específica de locus en el brazo q del cromosoma 19. El genoma de aproximadamente 5 kb del AAV consiste en un segmento de ADN de hebra simple de polaridad positiva o negativa. Los extremos del genoma son repeticiones terminales invertidas cortas que se pueden plegar en estructuras tipo horquilla y servir como el origen de replicación de ADN viral. Físicamente, el virión parvovirus no tiene envoltura y su cápside icosaédrica tiene aproximadamente 20 nm de diámetro.

[0027] Hasta la actualidad se han identificado ocho AAV serológicamente diferentes y se han aislado cinco de humanos o primates y son referidos como tipos 1 a 5 de AAV. Govindasamy y col., "Structurally Mapping the Diverse Phenotype of Adeno-Associated Virus Serotype 4." *J. Vir.*, 80 (23):11556-11570 (2006). El genoma de AAV2 tiene 4680 nucleótidos de longitud y contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF). El ORF izquierdo codifica para las proteínas Rep no estructurales, Rep 40, Rep 52, Rep 68 y Rep 78, las cuales están involucradas en la regulación de la replicación y transcripción además de la producción de genomas de progenie de hebra simple. Además, dos de las proteínas Rep han sido asociadas con la integración preferencial de los genomas de AAV en una región del brazo q del cromosoma 19 de humano. También se ha mostrado que Rep68/78 posee actividad de unión a NTP así como actividades de ADN y ARN helicasa. Las proteínas Rep poseen una señal de localización nuclear, así como varios sitios potenciales de fosforilación. La mutación de uno de estos sitios quinasa resulta en la pérdida de la actividad de replicación.

[0028] Los extremos del genoma son repeticiones terminales invertidas cortas (ITR) que tienen el potencial de plegarse en estructuras en horquilla con forma de T que sirven como el origen de la replicación de ADN viral. Se han descrito dos elementos en la región ITR que son centrales para la función de la ITR, un motivo repetitivo GAGC y el sitio de resolución terminal (trs). Se ha mostrado que el motivo repetitivo se une a Rep cuando la ITR está en una conformación lineal o en horquilla. Esta unión sirve para posicionar a Rep68/78 para la escisión en el trs que ocurre de una manera específica de sitio y hebra. Además de su rol en la replicación, estos dos elementos parecen ser importantes para la integración viral. En el locus de integración del cromosoma 19 existe contenido un sitio de unión a Rep con un trs adyacente. Se ha mostrado que estos elementos son funcionales y necesarios para la integración específica de locus.

[0029] El virión AAV2 es una partícula sin envoltura, icosaédrica de aproximadamente 25 nm de diámetro, que consiste en tres proteínas relacionadas referidas como VP1, VP2 y VP3. El ORF derecho codifica para las proteínas de la cápside VP1, VP2, y VP3. Estas proteínas se encuentran en una relación de 1:1:10 respectivamente y todas

derivan del ORF derecho. Las proteínas de la cápside difieren entre sí por el uso de corte y empalme alternativo y un codón de inicio no habitual. El análisis de eliminación ha mostrado que la eliminación o alteración de VP1 que se traduce de un mensajero con corte y empalme alternativo genera un rendimiento reducido de partículas infecciosas. Las mutaciones en la región codificantes de VP3 generan la falla en la producción de cualquier ADN de progenie de hebra simple o partículas infecciosas. Una partícula AAV2 es una partícula viral que comprende una proteína de cápside de AAV2. Un polipéptido de la cápside de AAV2 puede codificar para el polipéptido completo de VP1, VP2 y VP3. La partícula puede ser una partícula que comprende a AAV2 y otras proteínas de la cápside de AAV (es decir, una proteína quimérica, tal como AAV4 y AAV2). Las variaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside de AAV2 están contempladas en la presente, con la condición de que la partícula viral resultante que comprende la cápside de AAV2 permanezca antigénica e inmunológicamente diferente de AAV4, tal como puede determinarse de manera rutinaria mediante métodos estándares. Específicamente, por ejemplo, se puede usar ELISA y transferencias Western para determinar si una partícula viral es antigénica o inmunológicamente diferente de AAV4. Además, la partícula viral de AAV2 preferiblemente retiene el tropismo de tejido diferente de AAV4.

[0030] Una partícula AAV2 es una partícula viral que comprende una proteína de la cápside de AAV2. Un polipéptido de la cápside de AAV2 que codifica para los polipéptidos completos VP1, VP2, y VP3 puede tener en general al menos aproximadamente 63% de homología (o identidad) con el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos descritos en la SEQ ID NO:1 (proteína de la cápside de AAV2). La proteína la cápside puede tener aproximadamente 70% de homología, aproximadamente 75% de homología, 80% de homología, 85% de homología, 90% de homología, 95% de homología, 98% de homología, 99% de homología, o incluso 100% de homología con la proteína descrita en la SEQ ID NO:1. La proteína de la cápside puede tener aproximadamente 70% de identidad, aproximadamente 75% de identidad, 80% de identidad, 85% de identidad, 90% de identidad, 95% de identidad, 98% de identidad, 99% de identidad, o incluso 100% de identidad con la proteína descrita en SEQ ID NO:1. La partícula puede ser una partícula que comprende la proteína de la cápside de AAV4 y AAV2, es decir, una proteína quimérica. Las variaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside de AAV2 están contempladas en la presente, con la condición de que la partícula viral resultante que comprende la cápside de AAV2 permanezca antigénica o inmunológicamente diferente de AAV4, tal como puede determinarse de manera rutinaria mediante métodos estándares. Específicamente, por ejemplo, se puede usar ELISA y transferencias Western para determinar si una partícula viral es antigénica o inmunológicamente diferente de AAV4. Además, la partícula viral AAV2 preferiblemente retiene su tropismo de tejido diferente de AAV4, tal como se ejemplifica en los ejemplos en la presente, aunque una partícula quimérica de AAV2 que comprende al menos una proteína de recubrimiento de AAV2 puede tener un tropismo de tejido diferente del de una partícula AAV2 que consiste sólo en proteínas de recubrimiento de AAV2.

[0031] Tal como se indica en las **Figuras 6A y 6B**, la secuencia de la cápside de AAV2 y la secuencia de la cápside de AAV4 tienen aproximadamente una homología del 60%. En determinadas formas de realización, la cápside de AAV2 comprende (o consiste en) una secuencia que tiene al menos 65% de homología con la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO:1.

[0032] En determinadas formas de realización, se describe una partícula AAV2 que contiene, es decir, que encapsida, un vector que comprende un par de repeticiones terminales invertidas de AAV2. La secuencia nucleotídica de las ITR de AAV2 es conocida en la materia. Además, la partícula puede ser una partícula que comprende la proteína de la cápside de AAV4 y AAV2, es decir, una proteína quimérica. Además, la partícula puede ser una partícula que encapsida un vector que comprende un par de repeticiones terminales invertidas de AAV de otros AAV (por ejemplo, AAV1-AAV8). El vector encapsidado en la partícula además puede comprender un ácido nucleico exógeno insertado entre las repeticiones terminales invertidas.

[0033] Las siguientes características de AAV lo han hecho un vector atractivo para la transferencia génica. Se ha mostrado *in vitro* que los vectores AAV se integran de manera estable en el genoma celular; poseen un rango amplio de huéspedes; transducen a células en división y no división *in vitro* e *in vivo* y mantienen niveles elevados de expresión de los genes transducidos. Las partículas virales son estables al calor, resistentes a solventes, detergentes, cambios en el pH, temperatura, y pueden ser concentrados en gradientes de CsCl. La integración del provirus AAV no se asocia con ningún efecto negativo a largo plazo sobre el crecimiento o diferenciación celular. Se ha mostrado que las ITR son el único elemento requerido para la replicación, empaquetamiento e integración y pueden contener algunas actividades de promotor.

[0034] Se describen métodos para administrar partículas de AAV, vectores de AAV recombinantes y viriones de AAV recombinantes. Por ejemplo, una partícula AAV2 es una partícula viral que comprende una proteína de la cápside de AAV2, o una partícula AAV4 es una partícula viral que comprende una proteína de la cápside de AAV4. Un vector AAV2 recombinante es una construcción de ácido nucleico que comprende al menos un ácido nucleico único de AAV2. Un virión AAV2 recombinante es una partícula que contiene un vector de AAV2 recombinante. Para ser considerada dentro del término "ITR de AAV2" la secuencia nucleotídica debe retener una o ambas características descritas en la presente que distinguen a la ITR de AAV2 de la ITR de AAV4: (1) tres (en lugar de cuatro como en AAV4) repeticiones "GAGC" y (2) en el sitio de unión de Rep ITR AAV2 el cuarto nucleótido en las dos primeras repeticiones "GAGC" es una C en lugar de una T.

[0035] El promotor puede ser cualquier promotor deseado, seleccionado por consideraciones conocidas, tal como el nivel de expresión de un ácido nucleico ligado funcionalmente al promotor y el tipo de célula en el cual se usará el vector. Los promotores pueden ser un promotor exógeno o uno endógeno. Los promotores pueden incluir, por ejemplo, promotores fuertes conocidos tales como SV40 o el promotor inducible de metalotioneína, o un promotor de AAV, tal como un promotor p5 de AAV. Los ejemplos adicionales de promotores incluyen promotores derivados de los genes de actina, genes de inmunoglobulina, citomegalovirus (CMV), adenovirus, virus de papiloma bovino, promotores adenovirales, tales como el promotor tardío principal adenoviral, un promotor de estrés térmico inducible, virus sincicial respiratorio, virus de sarcoma de Rous (RSV), etc. Específicamente, el promotor puede ser el promotor p5 de AAV2 o promotor p5 de AAV4. Además, se pueden determinar fácilmente fragmentos más pequeños del promotor p5 que retienen la actividad de promotor mediante procedimientos estándares que incluyen, por ejemplo, construir una serie de eliminaciones en el promotor p5, vincular la eliminación a un gen reportero y determinar si el gen reportero se expresa, es decir, se transcribe y/o se traduce.

[0036] El AAV también puede comprender un ácido nucleico exógeno (heterólogo) vinculado funcionalmente al promotor. Por "ácido nucleico heterólogo" se comprende que se puede insertar cualquier ácido nucleico heterólogo o exógeno en el vector para transferirlo a una célula, tejido u organismo. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, el ácido nucleico heterólogo codifica para una isoforma protectora de ApoE. Por "vinculado funcionalmente" se refiere a que el promotor puede promover la expresión del ácido nucleico heterólogo, tal como se conoce en la materia, en una orientación apropiada del promotor en relación con el ácido nucleico heterólogo. Además, el ácido nucleico heterólogo preferiblemente tiene todas las secuencias apropiadas para la expresión del ácido nucleico, como se conoce en la materia, para codificar de manera funcional, es decir, permitir que se exprese el ácido nucleico. El ácido nucleico puede incluir, por ejemplo, secuencias de control de la expresión, tal como un potenciador, y sitios de procesamiento de información necesarios, tal como sitios de unión a ribosoma, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras de la transcripción. El ácido nucleico puede codificar para más de un producto génico, limitado solo por el tamaño del ácido nucleico que se puede empaquetar.

[0037] Una partícula AAV2 es una partícula viral que comprende una proteína de la cápside de AAV2. Las variaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside de AAV2 están contempladas en la presente, con la condición de que la partícula viral resultante que comprende la cápside de AAV2 permanezca antigénica e inmunológicamente diferente de AAV4, tal como puede determinarse de manera rutinaria mediante métodos estándares. Específicamente, por ejemplo, se puede usar ELISA y transferencias Western para determinar si una partícula viral es antigénica o inmunológicamente diferente de otros serotipos de AAV.

[0038] AAV4 es un miembro único de la familia de AAV. En la Patente de los EE.UU. No. 6.468.524 se provee una descripción de AAV4. Los datos de hibridización de ADN indicaron un nivel similar de homología para AAV1-4. Sin embargo, a diferencia de los otros AAV, solo se identificó un ORF correspondiente a las proteínas de la cápside en AAV4 y no se detectó ningún ORF para las proteínas Rep. Se describe un vector que comprende el virus AAV4 así como también partículas virales de AAV4. Si bien AAV4 es similar a AAV2, en la presente se observa que los dos virus son física y genéticamente diferentes. Estas diferencias le confieren algunas ventajas únicas a AAV4 que lo hacen más adecuado como vector para terapia génica. Por ejemplo, el genoma de AAV4 de tipo salvaje es más grande que el de AAV2, permitiendo una encapsidación eficaz de un genoma recombinante más grande. Además, las partículas de AAV4 de tipo salvaje tienen una densidad de flotación mayor que las partículas de AAV2 y por lo tanto se separan más fácilmente del virus colaborador contaminante y de las partículas de AAV vacías que las partículas basadas en AAV2. Además, a diferencia de AAV1, 2 y 3, el AAV4 tiene la capacidad de hemoaglutinar eritrocitos de humano, de cobayo y de oveja.

[0039] En determinadas formas de realización, se describe un vector que comprende el virus AAV5 o un vector que comprende subpartes del virus, así como también partículas virales de AAV5. En la Patente de los EE.UU. No. 6.855.314 se provee una descripción de AAV5. Si bien el AAV5 es similar a AAV2, se encuentra en la presente que los dos virus son física y genéticamente diferentes. Estas diferencias le confieren algunas propiedades y ventajas únicas a AAV5 que lo hacen más adecuado como vector para terapia génica. Por ejemplo, una de las características limitantes del uso de un AAV2 como un vector para terapia génica es la producción de cantidades grandes de virus. Mediante el uso de técnicas de elaboración estándares, se elabora el AAV5 en un nivel entre 10 y 50 veces mayor en comparación con AAV2. Debido a su sitio TRS y proteínas Rep, el AAV5 también debería tener un locus de integración diferente en comparación con AAV2.

[0040] Además, la proteína de la cápside de AAV5, nuevamente de manera sorprendente, es diferente de la proteína de la cápside de AAV2 y exhibe diferente tropismo de tejido, haciendo adecuadas de esta manera a las partículas que contienen la cápside de AAV5 para transducir tipos de células para los cuales el AAV2 no es adecuado o menos adecuado. Se ha observado que AAV2 y AAV5 son serológicamente diferentes y, por lo tanto, en una aplicación de terapia génica, el AAV5 y los vectores derivados de AAV5, podrían permitir la transducción de un paciente que ya posean anticuerpos neutralizantes para AAV2 como resultado de la defensa inmunológica natural o de exposición previa a vectores de AAV2. Otra ventaja de AAV5 es que AAV5 no puede ser rescatado por otros serotipos. Solo AAV5 puede rescatar el genoma integrado de AAV5 y provocar la replicación, evitando de esta manera la replicación no intencionada de AAV5 producida por otros serotipos de AAV.



[0041] El término "polipéptido" como se usa en la presente se refiere a un polímero de aminoácidos e incluye proteínas de longitud completa y fragmentos de las mismas. Por lo tanto, "proteína", "polipéptido", y "péptido" habitualmente se usan como sinónimos en la presente. Las sustituciones se pueden seleccionar de acuerdo con parámetros conocidos para que sean neutras. Tal como la apreciarán aquellos con experiencia en la materia, la divulgación también incluye aquellos polipéptidos que tienen leves variaciones en las secuencias de aminoácidos u otras propiedades. Dichas variaciones pueden surgir de manera natural como variaciones alélicas (por ejemplo, debido a polimorfismo genético) o pueden ser realizadas por la intervención humana (por ejemplo, por mutagénesis de secuencias de ADN clonadas), tal como mutaciones puntuales inducidas, de eliminación, de inserción y de sustitución. En general se prefieren cambios menores en la secuencia de aminoácidos, tales como reemplazos conservativos de aminoácidos, eliminaciones o inserciones internas pequeñas, y adiciones o eliminaciones en los extremos de las moléculas. Estas modificaciones pueden generar cambios en la secuencia de aminoácidos, proveer mutaciones silentes, modificar un sitio de restricción, o proveer otras mutaciones específicas.

[0042] El método presente provee un método para administrar un ácido nucleico a una célula que comprende administrar a la célula una partícula de AAV que contiene un vector que comprende el ácido nucleico insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, proveyendo de esta manera el ácido nucleico a la célula. La administración a la célula se puede realizar mediante diferentes medios, que incluye simplemente poner en contacto la partícula, opcionalmente contenida en un líquido deseado tal como un medio de cultivo de tejido, o una solución salina amortiguada, con las células. Se puede dejar que la partícula permanezca en contacto con las células durante cualquier duración de tiempo deseada, y típicamente se administra la partícula y se deja que permanezca indefinidamente. Para dichos métodos *in vitro*, el virus se puede administrar a la célula mediante métodos estándares de transducción viral, tal como se conoce en la materia y como se ejemplifica en la presente. Los títulos de virus a administrar pueden variar, en particular dependiendo del tipo de célula, pero típicamente serán del usado para la transducción de AAV en general. Además, pueden utilizarse los títulos usados para transducir las células particulares en los presentes ejemplos. Las células pueden incluir cualquier célula deseada en humanos, así como también otros mamíferos grandes (no roedores), tales como primates, caballo, oveja, cabra, cerdo y perro.

[0043] Más específicamente, se describe un método para administrar un ácido nucleico a una célula endodimaria, que comprende administrar a la célula endodimaria una partícula de AAV que contiene un vector que comprende el ácido nucleico insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, proveyendo de esta manera el ácido nucleico a la célula endodimaria.

[0044] También se describe un método para administrar un ácido nucleico a un sujeto que comprende administrar a una célula del sujeto una partícula de AAV que comprende el ácido nucleico insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, y regresar la célula al sujeto, administrando de esta manera el ácido nucleico al sujeto. En determinadas formas de realización, las ITR de AAV pueden ser ITR de AAV2. Para dicha administración *ex vivo*, las células se aíslan de un sujeto mediante medios estándares de acuerdo con el tipo de célula y se colocan en un medio de cultivo apropiado, nuevamente de acuerdo con el tipo celular. Las partículas virales se ponen luego en contacto con las células como se describió precedentemente, y se deja que el virus transfecte a las células. Las células se pueden trasplantar nuevamente al cuerpo del sujeto, otra vez mediante medios estándares según el tipo de célula y tejido. Si se desea, antes del trasplante, se puede estudiar el grado de trasplante por el virus de las células, mediante métodos de detección conocidos y como se describe en la presente.

[0045] Además se describe un método para administrar un ácido nucleico a una célula en un sujeto que comprende administrar al sujeto una partícula de AAV que comprende el ácido nucleico insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, proveyendo de esta manera el ácido nucleico a una célula en el sujeto. La administración puede ser una administración *ex vivo* directamente a una célula extraída de un sujeto, tal como cualquiera de las células descritas precedentemente, seguido por el reemplazo de la célula nuevamente en el sujeto, o la administración puede ser una administración *in vivo* a una célula en el sujeto. Para la administración *ex vivo*, las células se aíslan de un sujeto mediante medios estándares de acuerdo con el tipo de célula y se colocan en un medio de cultivo apropiado, nuevamente de acuerdo con el tipo de célula. Luego se ponen en contacto las partículas virales con las células como se describió precedentemente, y se permite que el virus transfecte a las células. Luego se trasplantan las células nuevamente al cuerpo del sujeto, nuevamente mediante medios estándares para el tipo de célula y tejido. Si se desea, antes del trasplante, se puede estudiar el grado de transfección de las células por el virus, mediante medios de detección conocidos y tal como se describe en la presente.

[0046] Además se describe un método para administrar un ácido nucleico a una célula endodimaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto una partícula de AAV que comprende el ácido nucleico insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, proveyendo de esta manera el ácido nucleico a una célula endodimaria en el sujeto.

[0047] En determinadas formas de realización, la secuencia de aminoácidos dirigida al endotelio vascular del cerebro está dirigida al endotelio vascular del cerebro en un sujeto que tiene una enfermedad, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer.

[0048] En determinadas formas de realización, la secuencia de aminoácidos dirigida al endotelio vascular del cerebro está dirigida al endotelio vascular del cerebro en un sujeto que no tiene la enfermedad de Alzheimer.

5 [0049] En determinadas formas de realización, el vector viral comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un agente terapéutico. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico es una isoforma protectora de ApoE.

[0050] Ciertas formas de realización de la presente divulgación proveen una célula que comprende un vector viral como se describe en la presente.

10 [0051] En determinadas formas de realización, la célula es una célula de mamífero de un mamífero no roedor. En determinadas formas de realización, la célula es una célula de primate. En determinadas formas de realización, la célula es una célula de humano. En determinadas formas de realización, la célula es una célula no humana. En determinadas formas de realización, la célula está *in vitro*. En determinadas formas de realización, la célula está *in vivo*. En determinadas formas de realización, la célula es una célula endimaria.

[0052] Ciertas formas de realización de la presente divulgación proveen un método para tratar una enfermedad en un mamífero que comprende administrar un vector viral o la célula como se describe en la presente al mamífero.

15 [0053] En determinadas formas de realización, el mamífero es humano.

[0054] Ciertas formas de realización de la presente divulgación proveen un método para administrar un agente al sistema nervioso central de un sujeto, que comprende administrar al LCR un vector viral descrito en la presente de manera que las células endimarias transducidas expresen el agente terapéutico y provean el agente al sistema nervioso central del sujeto. En determinadas formas de realización, el vector viral transduce las células endimarias.

20

[0055] Ciertas formas de realización de la presente divulgación proveen un vector viral o célula como se describe en la presente para usar en tratamientos médicos.

25 [0056] Ciertas formas de realización de la presente divulgación proveen un uso de un vector viral o célula como se describe en la presente para preparar un medicamento útil para tratar una enfermedad, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, en un mamífero.

[0057] El vector puede comprender además una proteína isoforma protectora de ApoE. Como se usa en la presente, el término "proteína secretada" incluye cualquier proteína secretada, secretada de manera natural o modificada para contener una secuencia señal de manera que pueda ser secretada.

30 [0058] Un ácido nucleico está "ligado en forma operativa" cuando el mismo está colocado en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. En general, "ligado en forma operativa" significa que las secuencias de ADN que se conectan son contiguas. Sin embargo, los potenciadores no tienen la obligación de ser contiguos. La conexión se logra por ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional. Además, se pueden conectar juntas múltiples copias del ácido nucleico que codifica para la enzima en el vector de expresión. Dichos múltiples ácidos nucleicos pueden estar separados por conectores.

35

[0059] La presente divulgación también provee una célula de mamífero que contiene un vector descrito en la presente. La célula puede ser humana y puede ser de cerebro. El tipo celular puede ser una población de células madre o progenitoras.

40 [0060] La presente divulgación provee un método para tratar una enfermedad tal como una enfermedad genética o cáncer en un mamífero mediante la administración de un polinucleótido, polipéptido, vector de expresión, o célula descrita en la presente. La enfermedad genética puede ser una enfermedad neurodegenerativa, tal como la enfermedad de Alzheimer.

45 [0061] Determinados aspectos de la divulgación se relacionan con polinucleótidos, polipéptidos, vectores, y células genéticamente manipuladas (modificadas *in vivo*), y con el uso de los mismos. En particular, la divulgación se relaciona con un método para terapia génica o proteica que es capaz de administrar en forma sistémica una dosis terapéuticamente eficaz del agente terapéutico.

50 [0062] De acuerdo con un aspecto, se provee un sistema de expresión celular para expresar un agente terapéutico en un mamífero receptor. El sistema de expresión (también denominado en la presente "célula genéticamente manipulada") comprende una célula y un vector de expresión para expresar el agente terapéutico. Los vectores de expresión incluyen, a título enunciativo no taxativo, virus, plásmidos, y otros vehículos para administrar material

genético heterólogo a las células. En consecuencia, el término "vector de expresión" como se usa en la presente se refiere a un vehículo para administrar material genético heterólogo a una célula. En particular, el vector de expresión es un vector recombinante adenoviral, de virus adenoasociado, o lentiviral o retroviral.

5 [0063] El vector de expresión además incluye un promotor para controlar la transcripción del gen heterólogo. El promotor puede ser un promotor inducible (descrito más adelante). El sistema de expresión es adecuado para la administración al mamífero receptor. El sistema de expresión puede comprender una pluralidad de células genéticamente manipuladas no inmortalizadas, en donde cada célula contiene al menos un gen recombinante que codifica para al menos un agente terapéutico.

10 [0064] El sistema de expresión celular puede formarse *in vivo*. De acuerdo con aún otro aspecto, se provee un método para tratar un mamífero receptor *in vivo*. El método incluye introducir un vector de expresión para expresar un producto de gen heterólogo en una célula del paciente *in situ*, tal como por administración intravenosa. Para formar el sistema de expresión *in vivo*, se introduce un vector de expresión para expresar el agente terapéutico *in vivo* dentro del mamífero receptor *i.v.*, en donde el vector migra a través de la vasculatura hasta el cerebro.

15 [0065] De acuerdo con aún otro aspecto, se provee un método para tratar un mamífero receptor *in vivo*. El método incluye introducir la proteína diana dentro del paciente *in vivo*.

[0066] El vector de expresión para expresar el gen heterólogo puede incluir un promotor inducible para controlar la transcripción del producto del gen heterólogo. En consecuencia, la administración del agente terapéutico *in situ* es controlada por la exposición de la célula *in situ* a condiciones que inducen la transcripción del gen heterólogo.

20 [0067] El mamífero receptor puede tener una condición que es susceptible a la terapia de reemplazo génico. Como se usa en la presente, "terapia de reemplazo génico" se refiere a la administración al receptor de un material genético exógeno que codifica para un agente terapéutico y la subsiguiente expresión del material genético administrado *in situ*. Por lo tanto, la expresión "condición susceptible de tratamiento con terapia de reemplazo génico" abarca condiciones tales como enfermedades genéticas (es decir, una condición de enfermedad que es atribuible a uno o más defectos génicos), patologías adquiridas (es decir, una condición patológica que no es atribuible a un defecto innato), cánceres y procesos profilácticos (es decir, prevención de una enfermedad o de una condición médica indeseada). En consecuencia, como se usa en la presente, el término "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente o material que tiene un efecto beneficioso sobre el mamífero receptor. Por lo tanto, "agente terapéutico" abarca a moléculas tanto terapéuticas como profilácticas que tienen componentes de ácido nucleico o proteína.

30 [0068] De acuerdo con una forma de realización, el mamífero receptor tiene una enfermedad genética y el material genético exógeno comprende un gen heterólogo que codifica para un agente terapéutico para tratar la enfermedad. En aún otra forma de realización, el mamífero receptor tiene una patología adquirida y el material genético exógeno comprende un gen heterólogo que codifica para un agente terapéutico para tratar la patología. De acuerdo con otra forma de realización, el paciente tiene un cáncer y el material genético exógeno comprende un gen heterólogo que codifica para un agente antineoplásico. En aún otra forma de realización el paciente tiene una condición médica indeseada y el material genético exógeno comprende un gen heterólogo que codifica para un agente terapéutico para tratar la condición.

40 [0069] Como se usa en la presente, el término "una isoforma protectora de ApoE" incluye variantes o fragmentos biológicamente activos o inactivos de este polipéptido. Una "variante" de uno de los polipéptidos es un polipéptido que no es completamente idéntico a una proteína nativa. Dicha proteína variante se puede obtener por alteración de la secuencia de aminoácidos mediante inserción, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de la proteína se modifica, por ejemplo, por sustitución, para crear un polipéptido que tiene sustancialmente las mismas características, o mejores características, en comparación con el polipéptido nativo. La sustitución puede ser una sustitución conservativa. Una "sustitución conservativa" es una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Una sustitución conservativa sería una sustitución por un aminoácido que produce el menor cambio posible en la carga del aminoácido o el tamaño de la cadena lateral del aminoácido (como alternativa, en el tamaño, carga o tipo de grupo químico dentro de la cadena lateral) de manera que el péptido global mantiene su conformación espacial, pero tiene una actividad biológica alterada. Por ejemplo, cambios conservativos comunes podrían ser Asp a Glu, Asn o Gln; His a Lys, Arg o Phe; Asn a Gln, Asp o Glu y Ser a Cys, Thr o Gly. La alanina se usa comúnmente para sustituir a otros aminoácidos. Los 20 aminoácidos esenciales se pueden agrupar de la siguiente manera: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina con cadenas laterales no polares; glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina con cadenas laterales polares sin carga; aspartato y glutamato con cadenas laterales ácidas; y lisina, arginina, e histidina con cadenas laterales básicas.

55 [0070] Los cambios de aminoácido se consiguen mediante el cambio de los codones de la correspondiente secuencia de ácido nucleico. Se sabe que dichos polipéptidos se pueden obtener en base a la sustitución de ciertos aminoácidos por otros aminoácidos en la estructura del polipéptido con el objetivo de modificar o mejorar la actividad

biológica. Por ejemplo, a través de la sustitución de aminoácidos alternativos, se pueden conferir a un polipéptido cambios conformacionales pequeños que resultan en una mayor actividad. Como alternativa, se pueden usar sustituciones de aminoácidos en ciertos polipéptidos para proveer residuos que luego pueden conectarse a otras moléculas para proveer conjugados de péptido-molécula que mantienen suficientes propiedades del polipéptido inicial para ser útil para otros propósitos.

[0071] Se puede usar el índice hidropático de los aminoácidos para conferir una función biológica interactiva a un polipéptido, en donde se encuentra que ciertos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tienen índices hidropáticos similares incluso manteniendo una actividad biológica similar. Como alternativa, la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse en base a la hidrofiliidad, en particular cuando la función biológica deseada del polipéptido a generar es para usarse en formas de realización inmunológicas. La mayor hidrofiliidad promedio local de una "proteína", la cual está gobernada por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad. En consecuencia, ha de notarse que se pueden hacer sustituciones en base a la hidrofiliidad asignada a cada aminoácido.

[0072] Cuando se usa el índice de hidrofiliidad o bien el índice de hidropaticidad, el cual asigna valores a cada aminoácido, es preferible realizar las sustituciones de aminoácidos cuando estos valores son  $\pm 2$ , en donde  $\pm 1$  es particularmente preferido, y en donde los valores con  $\pm 0,5$  son las sustituciones más preferidas.

[0073] La proteína variante tiene al menos 50%, al menos aproximadamente 80%, o incluso al menos aproximadamente 90%, pero menos de 100% de homología o identidad de secuencia de aminoácidos contiguos con la secuencia de aminoácidos de una correspondiente proteína nativa.

[0074] La secuencia de aminoácidos del polipéptido variante corresponde esencialmente con la secuencia de aminoácidos del polipéptido nativo. Como se usa en la presente "corresponde esencialmente con" se refiere a una secuencia polipeptídica que inducirá una respuesta biológica sustancialmente igual que la respuesta generada por la proteína nativa. Dicha respuesta puede ser de al menos 60% del nivel generado por la proteína nativa, e incluso puede ser de al menos 80% del nivel generado por la proteína nativa.

[0075] Una variante puede incluir residuos de aminoácido no presentes en la correspondiente proteína nativa o eliminaciones relativas a la correspondiente proteína nativa. Una variante también puede ser un "fragmento" truncado en comparación con la correspondiente proteína nativa, es decir, solo una parte de una proteína de longitud completa. Las proteínas variantes también incluyen péptidos que tienen al menos un D-aminoácido.

[0076] La proteína variante se puede expresar a partir de una secuencia de ADN aislada que codifica para la proteína variante. "Recombinante" se define como un péptido o ácido nucleico producido mediante los procesos de ingeniería genética. Ha de notarse, como es bien sabido en la materia, que debido a la redundancia del código genético se pueden intercambiar fácilmente nucleótidos individuales de un códon y aun así obtener una secuencia de aminoácidos idéntica. Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se usan como sinónimos en la presente.

[0077] La presente divulgación provee métodos para tratar una enfermedad en un mamífero mediante la administración de un vector de expresión a una célula o paciente. Para los métodos de terapia génica, un experto en la materia de la biología molecular y la terapia génica sería capaz de determinar sin experimentación excesiva las dosificaciones y rutas de administración apropiadas del vector de expresión usado en los nuevos métodos de la presente divulgación.

[0078] De acuerdo con una forma de realización, las células se transforman o se modifican genéticamente o de alguna otra manera *in vivo*. Las células del mamífero receptor se transforman (es decir, transducen o transfectan) *in vivo* con un vector que contiene material genético exógeno para expresar un gen heterólogo (por ejemplo, recombinante) que codifica para un agente terapéutico y el agente terapéutico se administra *in situ*.

[0079] Como se usa en la presente, "material genético exógeno" se refiere a un ácido nucleico o un oligonucleótido, ya sea natural o sintético, que no se halla en forma natural en las células; o si el mismo se halla en forma natural en las células, no es transcrito o expresado en niveles biológicamente significativos por las células. Por lo tanto, "material genético exógeno" incluye, por ejemplo, un ácido nucleico de origen no natural que se puede transcribir a ARN antisentido, así como también un "gen heterólogo" (es decir, un gen que codifica para una proteína que no se expresa o que se expresa a niveles biológicamente no significativos en una célula de origen natural del mismo tipo).

[0080] En ciertas formas de realización, el mamífero receptor tiene una condición que es susceptible a terapia de reemplazo génico. Como se usa en la presente, "terapia de reemplazo génico" se refiere a la administración al receptor de material genético exógeno que codifica para un agente terapéutico y la subsiguiente expresión del material genético administrado *in situ*. Por lo tanto, la expresión "condición susceptible de tratamiento con terapia de reemplazo génico" abarca condiciones tales como enfermedades genéticas (es decir, una condición de enfermedad que es atribuible a uno o más defectos génicos), patologías adquiridas (es decir, una condición patológica que no es

atribuible a un defecto innato), cánceres y procesos profilácticos (es decir, prevención de una enfermedad o de una condición médica indeseada). En consecuencia, como se usa en la presente, el término "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente o material que tiene un efecto beneficioso sobre el mamífero receptor. Por lo tanto, "agente terapéutico" abarca a moléculas tanto terapéuticas como profilácticas que tienen componentes de ácido nucleico (por ejemplo, ARN antisentido) y/o proteicos.

[0081] Como alternativa, la condición susceptible de tratamiento con terapia de reemplazo génico es un proceso profiláctico, es decir, un proceso para prevenir la enfermedad o una condición médica indeseada. Por lo tanto, la presente divulgación abarca un sistema de expresión celular para administrar un agente terapéutico que tiene una función profiláctica (es decir, un agente profiláctico) al mamífero receptor.

10 [0082] En resumen, el término "agente terapéutico" incluye, a título enunciativo no taxativo, agentes asociados con las condiciones enumeradas anteriormente, así como también sus equivalentes funcionales. Como se usa en la presente, el término "equivalente funcional" se refiere a una molécula (por ejemplo, un péptido o proteína) que tiene el mismo efecto beneficioso, o uno mejor, sobre el mamífero receptor en comparación con el agente terapéutico del que se considera un equivalente funcional.

15 [0083] Los agentes terapéuticos y condiciones antes divulgadas susceptibles al tratamiento por terapia de reemplazo génico son meramente ilustrativas y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación. La selección de un agente terapéutico adecuado para tratar una condición conocida se considera dentro del alcance de los expertos en la materia sin experimentación excesiva.

#### Vectores AAV

20 [0084] En una forma de realización, un vector viral de la divulgación es un vector AAV. Un vector "AAV" se refiere a un virus adenoasociado, y se puede usar para referirse al virus de tipo salvaje de origen natural en sí mismo o a los derivados del mismo. El término cubre a todos los subtipos, serotipos y pseudotipos, y tanto a formas de origen natural como recombinantes, excepto cuando se requiera lo contrario. Como se usa en la presente, el término "serotipo" se refiere a un AAV que se identifica y se distingue de otros AAV en base a la reactividad de la proteína de la cápside mediante antisueros definidos, por ejemplo, existen ocho serotipos conocidos de AAV de primates, AAV-1 a AAV-8. Por ejemplo, el serotipo AAV2 se usa para referirse a un AAV que contiene proteínas de cápside codificadas por el gen cap del AAV2 y un genoma que contiene secuencias 5' y 3' ITR del mismo serotipo de AAV2. Como se usa en la presente, por ejemplo, el término rAAV puede usarse para referirse a un AAV que tiene tanto proteínas de cápside como 5'-3' ITR del mismo serotipo o puede referirse a un AAV que tiene proteínas de cápside de un serotipo y 5'-3' ITR de un serotipo diferente de AAV, por ejemplo, cápside de AAV de serotipo 2 e ITR de AAV de serotipo 5. Para cada ejemplo ilustrado en la presente, la descripción del diseño y producción del vector describe el serotipo de la cápside y las secuencias de 5'-3' ITR. La abreviatura "rAAV" se refiere a un virus adenoasociado recombinante, también denominado vector AAV recombinante (o "vector rAAV").

35 [0085] Un "virus AAV" o "partícula viral de AAV" se refiere a una partícula viral compuesta por al menos una proteína de la cápside de AAV (preferiblemente por todas las proteínas de cápside de un de tipo salvaje) y un polinucleótido encapsidado. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido distinto al genoma de AAV de tipo salvaje tal como un transgén a administrar a una célula de mamífero), el mismo típicamente se denomina "rAAV".

40 [0086] En una forma de realización, los vectores de expresión de AAV se construyen usando técnicas conocidas para proveer al menos componentes conectados en forma operativa en la dirección de la transcripción, elementos de control que incluyen una región de inicio de la transcripción, el ADN de interés y una región de terminación de la transcripción. Los elementos de control se seleccionan para que sean funcionales de una célula de mamífero. La construcción resultante que contiene los componentes conectados en forma operativa está flanqueada (5' y 3') con secuencias funcionales de ITR de AAV.

45 [0087] Las "repeticiones terminales invertidas de virus adenoasociado" o "ITR de AAV" son regiones reconocidas en el arte que se hallan en cada extremo del genoma del AAV que funcionan juntas en cis como orígenes de replicación del ADN y como señales de empaquetamiento para el virus. Las ITR de AAV, junto con la región codificante de rep de AAV, proveen la escisión y rescate eficaz, y la integración de una secuencia nucleotídica interpuesta entre dos ITR flanqueantes en el genoma de una célula de mamífero.

50 [0088] Las secuencias nucleotídicas de las regiones de ITR de AAV son conocidas. Como se usa en la presente, una "ITR de AAV" no necesita ser la secuencia nucleotídica de tipo salvaje representada, sino que puede estar alterada, por ejemplo, mediante la inserción, eliminación o sustitución de nucleótidos. Además, la ITR de AAV puede derivar de cualquiera de los varios serotipos de AAV, incluyendo a título enunciativo no taxativo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV7, etc. Además, las 5' y 3' ITR que flanquean a una secuencia nucleotídica seleccionada en un vector AAV no necesariamente deben ser idénticas o derivadas del mismo aislado o serotipo de AAV, siempre y

cuando funcionan de la manera pretendida, es decir, permitiendo la escisión y rescate de la secuencia de interés de un genoma de célula huésped o vector, y permitiendo la integración de la secuencia heteróloga en el genoma de la célula del receptor cuando los productos de los génicos de Rep de AAV están presentes en la célula.

5 [0089] En una forma de realización, la ITR de AAV puede derivar de cualquiera de los varios serotipos de AAV, incluyendo a título enunciativo no taxativo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV7, etc. Además, las 5' y 3' ITR que flanquean a una secuencia nucleotídica seleccionada en un vector de expresión AAV no necesariamente deben ser idénticas o derivadas del mismo aislado o serotipo de AAV, siempre y cuando funcionen de la manera pretendida, es decir, permitiendo la escisión y rescate de la secuencia de interés de un genoma de célula huésped o vector, y permitiendo la integración de la secuencia heteróloga en el genoma de la célula del receptor cuando los productos de los génicos de Rep de AAV están presentes en la célula.

[0090] En una forma de realización, las cápsides de AAV pueden derivar de AAV2. Las moléculas de ADN adecuadas para usar en los vectores AAV tendrán menos de aproximadamente 5 kilobases (kb), menos de aproximadamente 4,5 kb, menos de aproximadamente 4kb, menos de aproximadamente 3,5 kb, menos de aproximadamente 3 kb, menos de aproximadamente 2,5 kb de tamaño y son conocidas en la materia.

15 [0091] En una forma de realización, la secuencia nucleotídica seleccionada se liga en forma operativa a los elementos de control para dirigir la transcripción o expresión de la misma en el sujeto *in vivo*. Dichos elementos de control pueden comprender secuencias de control que normalmente están asociadas con el gen seleccionado. Como alternativa, se pueden emplear secuencias de control heterólogas. Las secuencias de control heterólogas útiles en general incluyen aquellas que derivan de secuencias que codifican para genes de mamífero o virales. Los ejemplos incluyen, a título enunciativo no taxativo, el promotor temprano de SV40, el promotor de LTR del virus de tumor mamario de ratón; el promotor tardío mayor de adenovirus (Ad MLP); un promotor de virus herpes simple (HSV), un promotor de citomegalovirus (CMV) tal como la región promotora temprana inmediata de CMV (CMVIE), un promotor de virus de sarcoma de Rous (RSV), los promotores de pol II, los promotores de pol III, promotores sintéticos, promotores híbridos, y similares. Además, en la presente también se pueden usar secuencias derivadas de genes no virales, tales como el gen de metalotioneína murina. Dichas secuencias promotoras están comercialmente disponibles, por ejemplo, en Stratagene (San Diego, Calif.).

30 [0092] En una forma de realización, tendrán un uso particular los promotores heterólogos y otros elementos de control, tales como promotores inducibles y específicos de SNC, potenciadores y similares. Los ejemplos de promotores heterólogos incluyen al promotor de CMV. Los ejemplos de promotores específicos de SNC incluyen aquellos aislados de los genes de la proteína básica de mielina (MBP), la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), y la enolasa específica de neuronas (NSE). Los ejemplos de promotores inducibles incluyen elementos de respuesta a ADN para ecdisona, tetraciclina, hipoxia y aufina.

35 [0093] En una forma de realización, el vector de expresión AAV que porta la molécula de ADN de interés rodeada por las ITR de AAV, puede construirse por inserción directa de la o las secuencias seleccionadas en un genoma de AAV al que se le han extraído los marcos abiertos de lectura ("ORF") mayores de AAV. También se pueden eliminar otras partes del genoma de AAV, siempre y cuando siga estando presente una parte suficiente de las ITR para permitir las funciones de replicación y empaquetamiento. Dichas construcciones pueden diseñarse usando técnicas bien conocidas en la materia.

40 [0094] Como alternativa, los ITR de AAV pueden extraerse del genoma viral o de un vector AAV que contiene el mismo, y fusionarse en los extremos 5' y 3' de una construcción seleccionada de ácido nucleico que esté presente en otro vector, usando técnicas de ligación estándar. Por ejemplo, las ligaciones pueden llevarse a cabo en Tris-Cl 20 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 10 mM, 33 µg/ml de BSA, NaCl 10 mM-50 mM, y ATP 40 µM, entre 0,01 y 0,02 (Weiss) unidades de T4 ADN ligasa a 0°C (para la ligación de "extremos pegajosos") o bien ATP 1 mM, entre 0,3 y 0,6 (Weiss) unidades de T4 ADN ligasa a 14°C (para la ligación de "extremos romos"). Las ligaciones de "extremos pegajosos" intermoleculares usualmente se llevan a cabo a una concentración entre 30 y 100 µg/ml de ADN total (entre 5 y 100 nM de concentración).

Vectores AAV que contienen ITR.

50 [0095] Además, se pueden producir genes quiméricos en forma sintética para incluir secuencias de ITR de AAV dispuestas en los extremos 5' y 3' de una o más secuencias de ácido nucleico seleccionadas. Se pueden usar los codones preferidos para la expresión de la secuencia génica en las células de SNC de mamíferos. La secuencia quimérica completa se ensambla a partir de los oligonucleótidos solapados preparados mediante métodos estándares.

55 [0096] Con el objetivo de producir los viriones de rAAV, se introduce un vector de expresión AAV en una célula huésped adecuada usando técnicas conocidas, tales como la transfección. En general, en el arte se conocen varias técnicas de transfección. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold

Spring Harbor Laboratories, Nueva York. Los métodos de transfección particularmente adecuados incluyen coprecipitación con fosfato de calcio, microinyección directa en células cultivadas, electroporación, transferencia génica mediada por liposomas, transducción mediada por lípidos, y administración de ácidos nucleicos usando microproyectiles de alta velocidad.

5 [0097] En una forma de realización, las células huéspedes adecuadas para producir viriones de rAAV incluyen microorganismos, células de levadura, células de insecto y células de mamífero, que se pueden usar, o se pueden haber usado, como receptoras de una molécula de ADN heterólogo. El término incluye la progenie de la célula original que se ha transfectado. Por lo tanto, una "célula huésped" como se usa en la presente en general se refiere a una célula que se ha transfectado con una secuencia de ADN exógeno. Se pueden usar, por ejemplo, las células  
10 de la línea celular humana estable 293 (de fácil disponibilidad, por ejemplo, de American Type Culture Collection bajo el Número de Acceso ATCC CRL1573) en la práctica de la presente divulgación. Particularmente, la línea celular humana 293 es una línea celular de riñón de embrión humano que se ha transformado con fragmentos de ADN del adenovirus tipo 5, y expresa los genes adenovirales E1a y E1b. La línea celular 293 se transfecta con facilidad y provee una plataforma particularmente conveniente en donde se pueden producir los viriones de rAAV.

15 [0098] La "región codificante de rep de AAV" designa a la región del genoma de AAV reconocida en el arte que codifica para las proteínas de replicación Rep 78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40. Se ha demostrado que estos productos de expresión de Rep poseen muchas funciones, incluyendo el reconocimiento, unión y corte de una hebra en el origen de replicación de ADN del AAV, actividad de ADN helicasa y modulación de la transcripción a partir de los promotores del AAV (u otros heterólogos). Los productos de expresión de Rep son colectivamente necesarios para  
20 replicar el genoma del AAV. Los homólogos adecuados de la región codificante de rep del AAV incluyen el gen rep de herpesvirus humano 6 (HHV-6), que también se sabe que media la replicación del ADN del AAV2.

[0099] La "región codificante de cap de AAV" designa a la región del genoma de AAV reconocida en el arte que codifica para las proteínas de cápside VP1, VP2, y VP3, o homólogos funcionales de las mismas. Estos productos de expresión de Cap proveen las funciones de empaquetamiento que colectivamente se requieren para empaquetar  
25 el genoma viral.

[0100] En una forma de realización, se introducen funciones colaboradoras de AAV en la célula huésped mediante la transfección de la célula huésped con una construcción de colaboración de AAV ya sea antes o bien en forma concurrente con la transfección del vector AAV de expresión. Las construcciones de colaboración de AAV se usan por lo tanto para proveer una expresión al menos transitoria de los genes rep y/o cap de AAV para complementar las  
30 funciones faltantes de AAV que son necesarias para la infección productiva de AAV. Las construcciones de colaboración de AAV carecen de ITR de AAV y no se pueden replicar ni empaquetar por sí mismas. Estas construcciones pueden estar en la forma de un plásmido, fago, transposón, cósmido, virus o virión. Se han descrito varias construcciones de colaboración de AAV, tales como los plásmidos comúnmente usados pAAV/Ad y pIM29+45 que codifican para productos de expresión de Rep y Cap. Se han descrito varios otros vectores que codifican para  
35 productos de expresión de Rep y/o Cap.

[0101] Los métodos para administrar los vectores virales incluyen inyectar el AAV en el LCR. En general, los viriones de rAAV se pueden introducir en las células del SNC usando técnicas de transducción *in vivo* o *in vitro*. Si se transduce *in vitro*, la célula receptora deseada será extraída del sujeto, transducida con los viriones de rAAV y reintroducida en el sujeto. Como alternativa, se pueden usar células singeneicas o xenogeneicas en donde dichas  
40 células no generarán una respuesta inmunológica inapropiada en el sujeto.

[0102] Se han descrito los métodos adecuados para la administración e introducción de las células transducidas en un sujeto. Por ejemplo, se pueden transducir las células *in vitro* mediante los pasos de combinar viriones recombinantes de AAV con células del SNC, por ejemplo, en medios apropiados, y seleccionando las células que portan el ADN de interés usando técnicas convencionales tales como transferencias Southern y/o PCR, o mediante  
45 el uso de marcadores de selección. Las células transducidas pueden formularse luego en composiciones farmacéuticas, descritas más completamente más adelante, y la composición se puede introducir en el sujeto mediante diversas técnicas tales como por injerto, e inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal.

[0103] En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas comprenderán material genético suficiente para producir una cantidad terapéuticamente eficaz del ácido nucleico de interés, es decir, una cantidad suficiente para reducir o disminuir los síntomas del estado de enfermedad en cuestión o una cantidad suficiente para conferir el beneficio deseado. Las composiciones farmacéuticas también contendrán un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos excipientes incluyen cualquier agente farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición, y que se pueden administrar sin exceso de  
50 toxicidad. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, a título enunciativo no taxativo, sorbitol, Tween80, y líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Se pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables en la presente, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares.

Además, puede haber presentes en dichos vehículos sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias amortiguadoras del pH y similares. Una discusión exhaustiva de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

5 [0104] Tal como es evidente para los expertos en la materia en vista de los contenidos de esta memoria descriptiva, la cantidad eficaz de vector viral que se debe agregar se puede determinar en forma empírica. La administración puede efectuarse en una dosis, en forma continua o intermitente a lo largo del curso del tratamiento. Los métodos para determinar los medios y dosificaciones de administración más eficaces son bien conocidos para los expertos en la materia y variarán de acuerdo con el vector viral, la composición de la terapia, las células diana y el sujeto bajo tratamiento. Se pueden realizar administraciones individuales y múltiples con el nivel y patrón de dosis seleccionado por el médico a cargo.

10 [0105] Ha de comprenderse que se puede expresar más de un transgén mediante el vector viral administrado. Como alternativa, también se pueden administrar al SNC vectores separados, en donde cada uno expresa uno o más transgenes diferentes, como se describe en la presente. Además, también se espera que los vectores virales administrados mediante los métodos de la presente divulgación se combinen con otras composiciones y terapias adecuadas.

#### Métodos para Introducir Material Genético en las Células

15 [0106] El material genético exógeno (por ejemplo, un ADNc que codifica para una o más proteínas terapéuticas) se introduce en la célula *ex vivo* o *in vivo* mediante métodos de transferencia génica, tales como transfección o transducción, para proveer una célula genéticamente manipulada. Existen diversos vectores de expresión (es decir, vehículos para facilitar la administración del material genético exógeno en una célula diana) que son conocidos para los expertos en la materia.

20 [0107] Como se usa en la presente, "transfección de células" se refiere a la adquisición por parte de una célula de nuevo material genético mediante la incorporación de ADN agregado. Por lo tanto, la transfección se refiere a la inserción de ácido nucleico a una célula usando métodos químicos o físicos. Los expertos en la materia conocen varias técnicas de transfección que incluyen: coprecipitación de fosfato de calcio con ADN; DEAE-dextrano; electroporación; transfección mediada por liposomas catiónicos; y bombardeo de micropartículas facilitado con partículas de tungsteno. La coprecipitación de ADN con fosfato de estroncio es otro posible método de transfección.

25 [0108] Por el contrario, la "transducción de células" se refiere al proceso de transferir ácido nucleico a una célula usando un virus a ADN o ARN. Un virus a ARN (es decir, un retrovirus) para transferir un ácido nucleico a una célula se refiere en la presente a una transducción con retrovirus quimérico. El material genético exógeno contenido dentro del retrovirus se incorpora al genoma de la célula transducida. Una célula que se ha transducido con un virus a ADN quimérico (por ejemplo, un adenovirus que porta un ADNc que codifica para un agente terapéutico), no tendrá el material genético exógeno incorporado en su genoma, pero será capaz de expresar el material genético exógeno que está mantenido en forma extracromosómica dentro de la célula.

30 [0109] Típicamente, el material genético exógeno incluye el gen heterólogo (habitualmente en la forma de un ADNc que comprende los exones que codifican para la proteína terapéutica) junto con un promotor para el control de la transcripción del nuevo gen. El promotor característicamente tiene una secuencia nucleotídica específica necesaria para iniciar la transcripción. Opcionalmente, el material genético exógeno además incluye secuencias adicionales (es decir, potenciadores) que se requieren para obtener la actividad de transcripción del gen deseado. Para el propósito de esta discusión un "potenciador" es simplemente cualquier secuencia de ADN no traducida que funcione en forma contigua a la secuencia codificante (en *cis*) para cambiar el nivel basal de transcripción dictado por el promotor. El material genético exógeno se puede introducir en el genoma de la célula inmediatamente corriente abajo del promotor, de manera tal que el promotor y la secuencia codificante estén ligadas en forma operativa de manera de permitir la transcripción de la secuencia codificante. Un vector de expresión retroviral puede incluir un elemento promotor exógeno para controlar la transcripción del gen exógeno insertado. Dichos promotores exógenos incluyen promotores tanto constitutivos como inducibles.

35 [0110] Los promotores constitutivos de origen natural controlan la expresión de funciones celulares esenciales. Como resultado, un gen bajo el control de un promotor constitutivo se expresa bajo todas las condiciones de cultivo celular. Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen los promotores para los siguientes genes que codifican para ciertas funciones constitutivas o "housekeeping": hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), dihidrofolato reductasa (DHFR), adenosina desaminasa, fosfoglicerol quinasa (PGK), piruvato quinasa, fosfoglicerol mutasa, el promotor de actina, y otros promotores constitutivos conocidos para los expertos en la materia. Además, muchos promotores virales funcionan en forma constitutiva en células eucariotas. Estos incluyen: los promotores tempranos y tardíos de SV40; las repeticiones terminales largas (LTR) del Virus de la Leucemia de Moloney y otros retrovirus; y el promotor de timidina quinasa del Virus Herpes Simple, entre muchos otros. En consecuencia, se puede usar cualquiera de los promotores constitutivos señalados anteriormente para controlar la transcripción de un inserto de gen heterólogo.



[0111] Los genes que están bajo el control de promotores inducibles se expresan solamente, o en un mayor grado, en presencia de un agente inductor, (por ejemplo, la transcripción bajo el control del promotor de metalotioneína se incrementa mucho en presencia de ciertos iones metálicos). Los promotores inducibles incluyen elementos de respuesta (RE) que estimulan la transcripción cuando se unen los factores inductores. Por ejemplo, existen RE para factores séricos, hormonas esteroides, ácido retinoico y AMP cíclico. Pueden seleccionarse promotores que contienen un RE particular con el objetivo de obtener una respuesta inducible y en algunos casos, el RE en sí mismo puede unirse a un promotor diferente, confiriendo así la capacidad de inducción del gen recombinante. Por lo tanto, mediante la selección del promotor apropiado (constitutivo versus inducible; fuerte versus débil), es posible controlar tanto la existencia como el nivel de expresión de un agente terapéutico en la célula genéticamente manipulada. Si el gen que codifica para el agente terapéutico está bajo el control de un promotor inducible, la administración del agente terapéutico *in situ* es disparada por la exposición de la célula genéticamente manipulada *in situ* a las condiciones que permiten la transcripción del agente terapéutico, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal de los inductores específicos de los promotores inducibles que controlan la transcripción del agente. Por ejemplo, la expresión *in situ* por parte de las células genéticamente manipuladas de un agente terapéutico codificado por un gen bajo el control del promotor de metalotioneína aumenta por el contacto de las células genéticamente manipuladas con una solución que contiene los iones metálicos apropiados (es decir, inductores) *in situ*.

[0112] En consecuencia, la cantidad de agente terapéutico que se administra *in situ* está regulada por el control de factores tales como: (1) la naturaleza del promotor usado para dirigir la transcripción del gen insertado, (es decir, si el promotor es constitutivo o inducible, fuerte o débil); (2) el número de copias del gen exógeno que se inserta en la célula; (3) el número de células transducidas/transfectadas que se administran (por ejemplo, implantan) al paciente; (4) el tamaño del implante (por ejemplo, sistema de expresión injertado o encapsulado); (5) el número de implantes; (6) el periodo de tiempo que las células transducidas/transfectadas o los implantes se dejan en su lugar; y (7) la tasa de producción del agente terapéutico por parte de la célula genéticamente manipulada. La selección y optimización de estos factores para la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico particular se considera dentro del alcance de los expertos en la materia sin experimentación excesiva, teniendo en cuenta los factores antes señalados y el perfil clínico del paciente.

[0113] Además de al menos un promotor y al menos un ácido nucleico heterólogo que codifica para el agente terapéutico, el vector de expresión puede incluir un gen de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina, para facilitar la selección de las células que se han transfectado o transducido con el vector de expresión. Como alternativa, las células se transfectan con dos o más vectores de expresión, al menos un vector que contiene el o los genes que codifican para el o los agentes terapéuticos, en donde el otro vector contiene un gen de selección. La selección adecuada de un promotor, un potenciador, un gen de selección y/o secuencia señal (descrita más adelante) se considera dentro del alcance de los expertos en la materia sin una experimentación excesiva.

[0114] El agente terapéutico puede estar direccionado para administrarse a una localización extracelular, intracelular o de membrana. Si fuese deseable que el producto génico se secrete desde las células, el vector de expresión se diseña para incluir una secuencia "señal" de secreción apropiada para secretar el producto génico terapéutico desde la célula al medio extracelular. En caso de que sea deseable que el producto génico sea retenido dentro de la célula, esta secuencia señal de secreción se omite. De una manera similar, el vector de expresión puede construirse para incluir secuencias señal de "retención" para anclar el agente terapéutico dentro de la membrana plasmática celular. Por ejemplo, todas las proteínas de membrana tienen regiones transmembrana hidrofóbicas que detienen la translocación de la proteína en la membrana y que no permiten que la proteína se secrete. La construcción de un vector de expresión que incluya secuencias señal para direccionar un producto génico a una localización particular se considera dentro del alcance de los expertos en la materia sin la necesidad de una experimentación excesiva.

### **Ejemplo 1**

#### **Cambios en la Progresión de la Deposición Amiloide**

[0115] En este Ejemplo se estudiaron los cambios en la producción de la deposición amiloide en ratones app/ps después de la sobreexpresión de diferentes isoformas de ApoE a través de inyección intraventricular de un virus adenoasociado de serotipo 4 (AAV4).

[0116] El alelo épsilon 4 de ApoE (ApoE  $\epsilon$ 4) es el primer factor genético de riesgo para la enfermedad de Alzheimer (AD), mientras que la herencia del raro alelo épsilon 2 de ApoE (ApoE  $\epsilon$ 2) reduce este riesgo a aproximadamente la mitad. Sin embargo, a pesar del descubrimiento de estas fuertes claves genéticas, hace casi 17 años, los mecanismos mediante los cuales ApoE confiere riesgo siguen siendo desconocidos.

[0117] Con el objetivo de descifrar cómo influyen las diferentes isoformas de ApoE (ApoE  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 y  $\epsilon$ 4) sobre la formación y la estabilidad de las placas de amiloide fibrilar, se inyectaron vectores AAV4 que codifican para cada isoforma de ApoE en el ventrículo de ratones APP/PS de 7 meses de edad. Usando la adquisición de imágenes multifotónicas *in vivo*, se hizo un seguimiento de las poblaciones de depósitos amiloides en estado basal y después

de la exposición a ApoE a lo largo de un intervalo de dos meses, permitiendo así una vista dinámica de la progresión de la amiloidosis en un animal vivo.

5 [0118] Se observó que la cinética de deposición de placas amiloides fue variable de acuerdo con cada isoforma, de manera que los ratones inyectados con ApoE  $\epsilon$ 4 tuvieron un incremento de 38% de placas seniles mientras que los ratones tratados con ApoE  $\epsilon$ 2 presentaron una disminución de 15% en el número de depósitos amiloides en comparación con ApoE  $\epsilon$ 3 después de 2 meses. El análisis post-mortem confirmó estos resultados y reveló la presencia de proteínas ApoE humanas en las placas de la corteza, reflejando una gran difusión de la proteína a lo largo del parénquima y su acumulación focal en los lugares de depósito de péptidos A $\beta$ . Es importante notar que este contenido incrementado de proteína ApoE  $\epsilon$ 4 también se asoció con una pérdida más severa de sinapsis alrededor de los depósitos amiloides.

[0119] En conjunto, los presentes datos demostraron que la sobreproducción de diferentes isoformas de ApoE fue capaz de influenciar la progresión de la enfermedad y pudo modular la extensión de la pérdida de sinapsis, uno de los parámetros que mejor se correlaciona con el daño cognitivo de los pacientes con AD

15 *1. La inyección intraventricular de AA V4-ApoE conduce a una expresión estable de huApoE y una detección sostenida de proteína ApoE humana recombinante (huApoE) en el cerebro.*

[0120] En resumen, se inmunodetectaron GFP y huApoE en ratones APP/PS inyectados con vectores AAV4. Pudo observarse señal de la GFP en toda el área ventricular (panel superior) y en las células que recubren el ventrículo, así como también de APOE humana.

20 [0121] Con el objetivo de evaluar la presente estrategia, se inyectaron AAV4-Venus (control), -ApoE2, -ApoE3 y -ApoE4 en el ventrículo de ratones de tipo salvaje. Dos meses después de la inyección, se pudieron detectar proteínas ApoE humanas en el parénquima cortical alrededor de los depósitos amiloides (notar el anticuerpo 3H1; solo se observó una señal de fondo no específica en los ratones inyectados con AAV4-GFP). Por lo tanto, se detectó un nivel significativo de ApoE humana por ELISA en el cerebro, y las tinciones inmunohistológicas para Venus y ApoE confirmaron la expresión de los diferentes transgenes por parte de las células que recubren el ventrículo.

25 [0122] Se realizaron experimentos de qRT-PCR con el objetivo de evaluar los niveles de ARNm del transgén. Una curva estándar permitió a los inventores determinar las concentraciones de ARNm de huApoE de acuerdo con el nivel de la GAPDH endógena. Se incluyeron las muestras de los ratones que se expusieron durante 2 o 5 meses. Se realizó un ensayo de ELISA diseñado para detectar específicamente la APOE humana en homogenatos de cerebro (Figura 1A). Se pudieron detectar niveles bajos de las proteínas recombinantes en los ratones inyectados con AAV4-APOE en comparación con los animales tratados con AAV4-GFP, de acuerdo con la cuantificación por ELISA específico para APOE humana (Figura 1B) y se confirmaron por transferencia Western.

*2. La sobreexpresión de cada isoforma de APOE afecta en forma diferencial la progresión de la amiloidosis.*

35 [0123] Se usó la adquisición de imágenes de dos fotones *in vivo* para seguir la deposición amiloide en el tiempo en un animal vivo. En resumen, se inyectó en forma estereotáctica a ratones APP/PS (7 meses de edad) con vectores AAV4 que codifican para ApoE2, ApoE3, ApoE4 y Venus. Después de 1 semana, se implantó una ventana craneal y se tomaron imágenes de los depósitos amiloides a lo largo del tiempo después de la craneotomía. Después de 2 meses, se sacrificaron los animales y se llevaron a cabo análisis post-mortem.

40 [0124] Se prepararon imágenes de 2 fotones de los ratones APP/PS inyectados con AAV4-ApoE2, AAV4-ApoE3 o AAV4-ApoE4. Se pudieron detectar placas amiloides después de la inyección intraperitoneal de Methoxy-XO4 (5mg/kg) y se inyectó Texas Red dextrano (70.000 Da de peso molecular; 12,5 mg/ml en PBS estéril) en una vena lateral de la cola para proveer un angiograma fluorescente. Se tomaron imágenes una semana (=T0), un mes y dos meses después de la inyección. Se capturaron los mismos campos a lo largo del tiempo para seguir la progresión de las lesiones. Aparecieron unos pocos depósitos nuevos de amiloide mientras que algunos de ellos ya no se pudieron detectar más después de un periodo de tiempo de dos meses.

45 [0125] Un análisis completo de las imágenes *in vivo* demuestra que el número de depósitos amiloides se incrementa de manera significativa más rápidamente en los ratones APP/PS inyectados con AAV4-ApoE4 en comparación con los animales tratados con AAV4-ApoE3 y con AAV4-Venus. Por el contrario, se mide una pequeña pero significativa disminución de la densidad de las placas al usar AAV4-ApoE2 (Figura 2). Se observa una tendencia hacia placas más grandes en los ratones APP/PS inyectados con AAV4-ApoE4 ( $p < 0,06$ ), pero en general el tamaño de las placas permanece constante. Los datos resumidos de las imágenes *in vivo* demuestran que la sobreexpresión de cada isoforma de APOE afecta en forma diferente la progresión de la deposición amiloide *in vivo*. La inyección de AAV4-ApoE2 conduce a una leve disminución de la densidad amiloide a lo largo del tiempo, mientras que la inyección de AAV4-ApoE4 agrava la amiloidosis.

3. *El tamaño de las placas amiloides varía de acuerdo con cada isoforma de ApoE.*

[0126] Las imágenes de dos fotones *in vivo* permitieron el seguimiento de los cambios en el tamaño de cada depósito amiloide a lo largo de un periodo de 2 meses. El tamaño de las placas puede permanecer estable, incrementarse o disminuir a lo largo del tiempo. Las distribuciones de las proporciones de tamaño entre T1/T0 y T2/T1 demuestran que existe una tendencia hacia placas amiloides más grandes en los ratones inyectados con un AAV4-ApoE4 en comparación con los otros grupos (Figura 3).

4. *La evaluación post-mortem de la carga amiloide confirma los efectos de ApoE2 y ApoE4 sobre la deposición amiloide.*

[0127] Dos meses después de la inyección de AAV4, la evaluación estereológica post-mortem reveló que los animales inyectados con AAV4-ApoE4 tienen una mayor densidad de placas amiloides en la corteza, mientras que no se pudo detectar ninguna diferencia entre los otros grupos (Figura 4A). Se observó este número incrementado de depósitos amiloides cuando las placas se marcaron con TioS o Bam10. Sin embargo, no se detectaron cambios en la proporción entre Bam10 y TioS. Cinco meses después de la inyección, los efectos de cada isoforma de ApoE son más pronunciados en comparación con el punto de dos meses (Figura 4B). Se observó una densidad de depósitos significativamente incrementada cuando los ratones se inyectaron con AAV4-ApoE4 mientras que se detectó un efecto inverso con la ApoE2. Nuevamente, no se detectaron cambios en la proporción entre Bam10 y TioS.

5. *Cada isoforma de ApoE afecta en forma diferencial la densidad sináptica alrededor de los depósitos amiloides.*

[0128] Se usó tomografía matricial para determinar en forma precisa la densidad de elementos presinápticos y postsinápticos alrededor de los depósitos amiloides. Este nuevo método de adquisición de imágenes ofrece capacidades de adquisición de imágenes de alta resolución de la arquitectura molecular del tejido. La tomografía matricial se basa en el seccionado ultrafino del espécimen (70 nm), inmunotinción y reconstrucción en 3D. Imágenes representativas de muestras de tomografía matricial teñidas para placa amiloide y el marcador postsináptico PSD95. En las imágenes por tomografía matricial se muestra que se observa un número disminuido del marcador postsináptico PSD95 alrededor de los depósitos amiloides, pero este efecto es anulado al alejarse de las placas. Se realizó la cuantificación de los marcadores presinápticos (sinapsina-1) y postsinápticos en la vecindad o lejos de las placas en cada grupo de ratones inyectados con un AAV4 (Figura 5A-D). La cuantificación general de los elementos presinápticos y postsinápticos confirmó que hubo una menor densidad de sinapsina 1 y PSD95 asociada con las placas amiloides, en donde este efecto se amplificó en gran medida cuando se sobreexpresó la ApoE4 en el cerebro de los ratones APP/PS1 (Figura 5C, Figura 5D). La sobreexpresión de ApoE4 se asocia con una mayor pérdida de espinas en comparación con los otros grupos en la vecindad de los depósitos amiloides. Por el contrario, la densidad de puntos de sinapsina es mayor en los animales tratados con ApoE2 alrededor de las placas.

*Conclusión*

[0129] Las inyecciones intraventriculares del virus AAV de serotipo 4 condujo a una sobreproducción sostenida y crónica de proteínas recombinantes solubles por todo el parénquima cerebral. La sobreexpresión de ApoE2, ApoE3 y ApoE4 afectó en forma diferencial del curso de la patología en los ratones APP/PS, de manera que la progresión de la carga amiloide se incrementó de manera significativa cuando se inyectó ApoE4 en comparación con ApoE3. Por el contrario, la ApoE2 se asoció con efectos protectores y los pocos depósitos amiloides ya no son detectables dos meses después de la inyección. El análisis inmunohistoquímico post-mortem confirmó el efecto adverso de la ApoE4. La sobreproducción sostenida de la ApoE4 exacerbó la pérdida de sinapsis observada alrededor de los depósitos amiloides en comparación con la ApoE3, mientras que la ApoE2 tuvo un efecto leve. El presente estudio demostró una conexión directa entre las isoformas de ApoE, la progresión de la amiloidosis y la pérdida de sinapsis *in vivo*.

**Ejemplo 2**

**Tratamiento de Trastornos del Sistema Nervioso Central a través del Líquido Cefalorraquídeo (LCR) en Mamíferos Grandes**

[0130] Con el objetivo de lograr la terapia génica para trastornos del cerebro, tales como la enfermedad de Alzheimer, se necesita determinar si se pueden conseguir niveles de estado estacionario a largo plazo de las enzimas terapéuticas en un mamífero. Se descubrió que las células ependimarias (células que revisten los ventrículos del cerebro) pueden transducirse y secretar una enzima diana al líquido cefalorraquídeo (LCR). Se determinó que el virus adenoasociado (AAV4) puede transducir el epéndimo en un modelo de ratón con alta eficacia. (Davidson y col, PNAS, 28:3428-3432, 2000.) En los ratones hubo una normalización de los niveles de sustrato almacenado en el cerebro enfermo después del tratamiento con AAV4.

[0131] Se investigó si la administración global de un vector podía funcionar en forma eficaz para conseguir niveles de estado estacionario de la enzima en el LCR. Primero, se necesita hallar un vector que pueda transducir las células endoteliales (células que revisten los ventrículos) en el cerebro de mamíferos grandes. Se llevaron a cabo estudios en un modelo de LINCL en perro y un modelo de LINCL en primate no humano. Los perros con LINCL son normales al nacimiento, pero desarrollan signos neurológicos alrededor de los 7 meses, déficits cognitivos comprobables a los ~ 5-6 meses, convulsiones a los 10-11 meses, y pérdida visual progresiva.

[0132] Se seleccionó un virus adenoasociado (AAV) como vector debido a su pequeño tamaño (20 nm), y a que la mayor parte de su material genético puede eliminarse ("destrirse") de manera que no haya presentes genes virales y de manera que el mismo sea incompetente para la replicación. Previamente se probó si los vectores del virus adenoasociado tipo 4 (AAV4) podían mediar mejoras funcionales y patológicas globales en un modelo murino de mucopolisacaridosis de tipo VII (MPS VII) causada por deficiencia de beta-glucuronidasa (Liu y col., J. Neuroscience, 25(41):9321-9327, 2005). Se inyectaron vectores recombinantes AAV4 que codifican para beta-glucuronidasa en forma unilateral en el ventrículo lateral de ratones MPS VII con enfermedad establecida. El epéndimo transducido expresó altos niveles de la enzima recombinante, con enzima secretada penetrando en las estructuras cerebrales y cerebelares, así como también en el tronco encefálico. Los estudios inmunohistoquímicos revelaron una asociación estrecha de la enzima recombinante y la microvasculatura del cerebro, indicando que la beta-glucuronidasa alcanzó el parénquima del cerebro a través de los espacios perivascuales que recubren los vasos sanguíneos. Se ensayó un aprendizaje asociativo aversivo por condicionamiento de miedo al contexto. En comparación con los controles heterocigotas de edad coincidente, los ratones afectados mostraron una falla de la respuesta condicionada al miedo y de discriminación de contexto. Este déficit de comportamiento se revirtió 6 semanas después de la transferencia génica en los ratones MPS VII tratados con AAV4 beta-glucuronidasa. Los datos muestran que las células endoteliales pueden servir como fuente de secreción enzimática hacia el parénquima cerebral circundante y al LCR.

[0133] Sorprendentemente, sin embargo, cuando se extendieron estos estudios a mamíferos grandes (es decir, perros y primates no humanos), los vectores AAV4 no fueron eficaces para direccionarse hacia el epéndimo en estos animales. En lugar de ello, necesitó usarse un vector AAV2. En resumen, se generó un rAAV2 que codifica para TPP1 (AAV2-CLN2), y se inyectó por vía intraventricular para transducir el epéndimo (Liu y col., J. Neuroscience, 25(41):9321-9327, 2005). La TPP1 es la enzima deficiente en la LINCL. Los datos indicaron que la transducción del epéndimo en el cerebro de NHP resultó en un incremento significativo de la enzima en el LCR. Los resultados indicaron niveles elevados de actividad de TPP1 en diversas regiones del cerebro, en donde el eje vertical muestra el % control de actividad (Figura 7).

[0134] En el primer perro que se trató, la administración del vector fue subóptima, pero aun así mostró actividad CLN2 en el cerebro. Los perros subsiguientes se sometieron a administración ICV con estereotaxia. Se halló que las capacidades cognitivas de los perros tratados mejoraron de manera significativa por sobre un perro no tratado, de acuerdo a la medida por desempeño en laberinto en forma de T (Figura 8). Además, los efectos de la administración ICV de AAV2-CLN2 en el modelo canino de LINCL fueron muy pronunciados. En el animal no tratado (-/-), hay presentes grandes ventrículos, mientras que los cerebros de los animales control sin tratar y los animales tratados no mostraron ventrículos. Después de la administración de AAV.TPP1 a los ventrículos de los perros con LINCL, se notó actividad enzimática detectable en diversas regiones del cerebro, incluyendo el cerebelo y la médula espinal superior. En dos perros vivos afectados adicionales, la atrofia de cerebro se vio atenuada de manera significativa, se incrementó la longevidad y mejoró la función cognitiva. Finalmente, en los NHP, los inventores demuestran que este método puede conseguir niveles de actividad de TPP1 entre 2 y 5 por arriba de los niveles de tipo salvaje.

[0135] Se generaron varios vectores AAV y se probaron para determinar la combinación óptima de ITR y cápside. Se produjeron cinco combinaciones diferentes, una vez que se determinó que la ITR de AAV2 era la más eficaz: AAV2/1 (es decir, ITR de AAV2 y cápside de AAV1), AAV2/2, AAV2/4, AAV2/5, y AAV2/8. Se descubrió que la combinación AAV2/2 funcionó mucho mejor en los mamíferos grandes (perros y NHP), seguida por AAV2/8, AAV2/5, AAV2/1 y AAV2/4. Esto fue bastante sorprendente debido a que el orden de eficacia de los vectores virales es el opuesto al observado en los ratones.

[0136] Por lo tanto, el presente trabajo ha demostrado que las células que recubren el ventrículo pueden ser una fuente de enzima recombinante para el LCR para su distribución en todo el cerebro, y que el AAV2/2 es un vehículo eficaz para administrar los agentes terapéuticos, tal como el gen que codifica para la CLN2 (TPP1) en perros y primates no humanos.

### Ejemplo 3

**Las Isoformas de APOE Humana Administradas A Través de Transferencia Génica Modulan en Forma Diferencial La Enfermedad de Alzheimer Afectando la Deposición, la Eliminación y la Neurotoxicidad Amiloide**

[0137] La enfermedad de Alzheimer (AD) es el trastorno neurodegenerativo relacionado con la edad más frecuente y se ha convertido en un problema mayor de la salud pública. Entre los genes de susceptibilidad asociados con la forma de inicio tardío esporádico de AD, el alelo  $\epsilon 4$  de la apolipoproteína E (*APOE* - gen; ApoE – proteína) es por lejos el factor de riesgo genético más significativo. La presencia de una copia de *APOE*  $\epsilon 4$  incrementa sustancialmente el riesgo de desarrollar la enfermedad en un factor de 3 en comparación con el alelo más frecuente de *APOE*, el  $\epsilon 3$ , mientras que dos copias conducen a un incremento de 12 veces. Curiosamente, la *APOE*  $\epsilon 2$  tiene un impacto opuesto y es un factor protector, de manera que la herencia de este alelo específico disminuye el riesgo relacionado con la edad para AD en aproximadamente la mitad, en comparación con *APOE* $\epsilon 3/\epsilon 3$ . La edad promedio de inicio de demencia también se corresponde con estos perfiles de riesgo, en donde los portadores de *APOE* $\epsilon 4/\epsilon 4$  tiene un inicio en un punto intermedio entre los 60 y 70 años y los portadores de *APOE* $\epsilon 2/\epsilon 3$  en los primeros años después de los 90 años de edad, un desplazamiento de casi 3 décadas, mientras que los individuos con *APOE* $\epsilon 3/\epsilon 3$  tienen una edad de inicio en algún punto entre los 60 y 70 años.

[0138] El mecanismo mediante el cual la ApoE influye sobre la AD es controversial. Se cree que la acumulación de placas seniles que contienen A $\beta$ , en el hipocampo y la corteza de los pacientes, tiene un rol central en la AD debido a que todos los genes conocidos responsables de la rara forma autosómica dominante de la enfermedad participan en la producción de péptidos A $\beta$ . Interesantemente, se demostró que el genotipo de la *APOE* afecta fuertemente la extensión de la deposición amiloide en los pacientes con AD, así como también la cantidad de A $\beta$  oligomérico soluble neurotóxico detectado en muestras de autopsias. Se ha sugerido que las isoformas de ApoE influyen sobre la integridad cerebrovascular y afectan el eflujo de péptidos A $\beta$  en forma diferencial a través de la barrera hematoencefálica, modulando así la formación de agregados amiloides alrededor de los vasos sanguíneos (angiopatía amiloide cerebral o CAA). Además, también se ha relacionado a la ApoE directamente con la neurodegeneración y la plasticidad neuronal. Los efectos de la ApoE2 se han estudiado relativamente poco en estos contextos.

[0139] Los animales modificados genéticamente que expresan *APOE* $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$  humanas tienen un orden de rango de carga amiloide similar a los humanos, en consistencia con la hipótesis de que diferentes isoformas de ApoE influyen sobre el inicio y/o el crecimiento de las placas. Sin embargo, se necesitan más estudios para deducir los mecanismos de los efectos mediados por ApoE sobre los depósitos amiloides y la neurodegeneración existentes. Para superar esta brecha del conocimiento, los inventores usaron una estrategia de transferencia génica en la que se inyectan vectores de virus adenoasociado que expresan los diversos alelos de *APOE* (o control de GFP) en el ventrículo lateral para transducir principalmente el epéndimo, el que luego actúa como fábrica biológica para administrar la ApoE dentro de los fluidos cefalorraquídeo e intersticial. Luego los inventores usaron microscopía multifotónica intravital para seguir los efectos de las diversas isoformas de ApoE sobre la formación y crecimiento de las placas, y en el caso de la ApoE2, la disolución, así como también estrategias de microdiálisis *in vivo* para monitorear las variables bioquímicas de ApoE y de A $\beta$  en el ISF, y tomografía matricial para evaluar los cambios de neurotoxicidad asociada con A $\beta$ . Los inventores hallaron que las isoformas de ApoE influyen sobre los niveles de A $\beta$  oligomérico soluble en el ISF, el ritmo de fibrilización y la deposición de A $\beta$ , la estabilidad de los depósitos amiloides una vez formados, su eliminación, y la extensión de los efectos neurotóxicos alrededor de las placas. De hecho, los ratones con AD tratados con ApoE4 muestran una mayor cantidad de A $\beta$  soluble, una mayor densidad de placas fibrilares, una exacerbación de la pérdida de elementos sinápticos y un número incrementado de distrofias neuríticas alrededor de cada depósito, mientras que se observó un efecto protector relativo con la ApoE2. Estos datos apoyan la hipótesis de que los alelos de *APOE* median su efecto sobre la AD principalmente a través de los péptidos A $\beta$ , y destacan a la ApoE como diana terapéutica.

## RESULTADOS

### ***La inyección intraventricular de AAV4-APOE conduce a una expresión estable de APOE y a una producción sostenida de ApoE humana en el cerebro***

[0140] La apolipoproteína E es una proteína secretada naturalmente que es producida principalmente por los astrocitos y las células de la microglia y puede difundir a través del parénquima cerebral. Los inventores aprovecharon esta propiedad para inyectar un AAV de serotipo 4 que codifica para *GFP* (control) o para cada alelo de *APOE* en los ventrículos laterales cerebrales de ratones APP/PS1 de 7 meses de edad. Considerando las grandes áreas cerebrales afectadas por las lesiones características de la AD, esta estrategia ofreció una gran ventaja en comparación con las inyecciones intraparenquimales múltiples.

[0141] Dos meses después de la inyección, se detectaron células transducidas en el plexo coroideo y en el epéndimo que recubre el ventrículo, confirmando de esa forma la funcionalidad de los vectores AAV4. Usando anticuerpos específicos para cada especie, también se detectaron las proteínas ApoE tanto humanas como murinas por ELISA (Figura 9A, 9B y 15A) y por transferencia Western. Los inventores observaron que la concentración de apolipoproteína humana E alcanzó los 20  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína total en promedio (Figura 9A), representando aproximadamente el 10% de la apoE murina endógena (Figura 9B). La presencia de esta modesta cantidad adicional de ApoE humana no alteró en forma detectable los niveles de proteína apoE murina endógena (Figura 15A). Se observó una pequeña pero estadísticamente significativa disminución entre 2 y 5 meses después de la

inyección de AAV4 (Figura 15B). Sin embargo, los niveles de proteína humana siguieron siendo detectables en comparación con el grupo control, lo que sugiere que la transducción mediada por AAV4 proveyó una plataforma para la producción sostenida de la proteína recombinante secretada por todo el parénquima. De hecho, se pudieron detectar las proteínas ApoE humanas alrededor de los depósitos amiloides de los ratones APP/PS1 a lo largo del manto cortical, en donde se sabe que se acumula la proteína murina endógena apoE.

[0142] Luego, los inventores evaluaron la presencia de ApoE humana en el fluido intersticial (ISF), un compartimiento extracelular que también contiene especies solubles de A $\beta$  con alta actividad biológica. Debido a la cantidad relativamente pequeña de ApoE detectada en el lisado de cerebro total, los inventores inyectaron varios ratones KO para apoE con cada vector AAV4-APOE, y monitorearon la presencia de la proteína humana usando anticuerpos no específicos de especie, pero altamente sensibles. Usando una técnica de microdiálisis, los inventores confirmaron la presencia de ApoE en el ISF de los animales KO para apoE inyectados.

[0143] En resumen, estos datos confirman que una inyección intracerebroventricular individual de AAV4 fue suficiente para conducir a una producción sostenida de una proteína de interés a lo largo de todo el parénquima cerebral y dentro del ISF, y que puede usarse el epéndimo/plexo coroideo como "bomba biológica" para administrar proteínas potencialmente terapéuticas al cerebro.

**La infusión de las isoformas de ApoE afecta en forma diferencial los péptidos amiloides y la deposición de placas**

[0144] Se transdujeron ratones APP/PS1 con vectores que expresan GFP o las diversas isoformas de ApoE durante 5 meses antes de la eutanasia. Un análisis de la carga de placas amiloides reveló que, después de 5 meses, se observaba una disminución significativa de la densidad de los depósitos amiloides en la corteza de los animales inyectados con AAV4-APOE4 en comparación con aquellos que expresan la APOE2. La densidad de placas en los ratones tratados con AAV4-GFP y AAV4-APOE3 no fue diferente entre los mismos a un nivel intermedio (Figura 16A).

[0145] Las concentraciones de los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> medidas a partir de extractos de ácido fórmico reprodujeron los cambios observados en el contenido de placas amiloides, de manera que se halló un incremento de la concentración de péptidos amiloides en los ratones que expresan el alelo APOE4 (Figura 16B), y se detectó un efecto opuesto con la APOE2 después de 5 meses. El contenido de los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> en la fracción soluble en TBS se vio afectada similarmente por la inyección de cada AAV-APOE (Figura 16C). Además, la proporción entre péptidos A $\beta$  agregados y solubles permaneció inalterada por la exposición a la ApoE, lo que sugiere que la sobreexpresión de cada diferente isoforma de ApoE humana modula en forma concomitante las especies amiloides tanto fibrilares como solubles.

[0146] La sobreexpresión de cada isoforma de ApoE por solo 2 meses conduce a efectos menores que los observados en el estudio de 5 meses. Sin embargo, se observó un incremento significativo de la densidad de placas amiloides dentro del área cortical de los ratones inyectados con AAV4-APOE4, en comparación con los otros grupos experimentales (Figura 16A). Esto fue reproducido por la cantidad de A $\beta$  contenida en la fracción de ácido fórmico (Figura 16C), lo que demuestra un efecto predominante de esta variante específica. Las especies de A $\beta$ <sub>40/42</sub> solubles en TBS solo mostraron una tendencia a disminuir o aumentar cuando se expresó AAV4-APOE2 o AAV4-APOE4, respectivamente, durante 2 meses (datos no mostrados).

[0147] Para determinar si la presencia de las isoformas de ApoE humana podrían reflejar un cambio temprano en el grado de fibrilación de A $\beta$ , los inventores también midieron la proporción entre la inmunotinción robusta de A $\beta$  usando Bam10 (que marca todos los depósitos amiloides) y Tio-S (que solo tiñe la región central densa) 2 meses después de la inyección. No se observaron cambios entre las 3 isoformas, lo que sugiere que no hubo un efecto diferencial sobre la distribución de las poblaciones de depósitos amiloides densos y difusos a través de los grupos experimentales dentro de este marco de tiempo (Figura 16B). Estos datos indican que una exposición más larga a las variantes de ApoE tiene efectos más fuertes sobre la deposición amiloide en comparación con una exposición más corta.

[0148] Se ha sugerido que la ApoE tiene un rol en el transporte de A $\beta$  a través de la barrera hematoencefálica. Para probar si la exposición de las isoformas de ApoE podría modular el eflujo de los péptidos A $\beta$  a través de la barrera hematoencefálica, se midió la concentración de A $\beta$ <sub>40</sub> en el plasma de cada animal inyectado. Los inventores observaron que el contenido plasmático de A $\beta$  humana en los ratones AAV4-APOE3 y AAV4-APOE4 inyectados en forma intracerebroventricular fue inferior en comparación con los inyectados con AAV4-APOE2 y AAV4-GFP (Figura 10D). Esto sugiere que ambas variantes E3 y E4 ayudan a retener al A $\beta$  en el compartimiento del sistema nervioso central, en consistencia con las concentraciones relativamente incrementadas de A $\beta$  en el parénquima cerebral observadas y con datos previos que sugieren una mayor vida media de los A $\beta$  debido a la ApoE.

[0149] Los portadores de *APOE4* son más susceptibles a la disfunción neurovascular, y recientemente se demostró que la ruptura de la barrera hematoencefálica se ve favorecida en los ratones transgénicos para *APOE4* incluso en ausencia de deposición amiloide. Con el objetivo de evaluar si una inyección intraventricular de un AAV4-*APOE* en ratones APP/PS podría comprometer la integridad de la BBB, se llevó a cabo una tinción post-mortem con azul de Prusia. A pesar de la presencia de pocas áreas focales positivas para hemosiderina escasamente esparcidas por el cerebro en todos los grupos, no se observaron diferencias obvias entre ninguno de los grupos experimentales de animales.

**La expresión de las isoformas de ApoE modula la cinética de la progresión de la amiloidosis**

[0150] La ApoE4 se asoció con un incremento de la densidad de depósitos amiloides, mientras que se observó el efecto opuesto con la ApoE2 después de 5 meses. Esto podría reflejar cambios en las tasas de deposición o eliminación de  $\beta$  amiloide, o en ambos. Para evaluar cómo afectan las variantes de ApoE la progresión dinámica de la amiloidosis, los inventores usaron adquisición de imágenes con dos fotones *in vivo* y monitorearon la cinética de formación y de eliminación de las placas amiloides. Los ratones recibieron una inyección intraventricular con un vector AAV4 a los 7 meses de edad y se implantó una ventana craneal una semana después de la inyección con el objetivo de llevar a cabo la primera sesión de imágenes (T0). Después de 1 (T1) y 2 meses (T2), se adquirieron imágenes de los depósitos amiloides en los mismos campos de visión. Se sacrificaron los ratones para el análisis post-mortem después de la segunda sesión de imágenes.

[0151] La gran mayoría de los depósitos amiloides permanecieron estables, a pesar de que se pudieron detectar ocasionales nuevas placas en el pequeño volumen de visión a lo largo del periodo de tiempo de dos meses. Más aún, en una rara ocasión, una placa metoxi-positiva que se fotografió al comienzo del experimento, no se pudo detectar después de uno o dos meses, lo que sugiere que algunas placas podrían eliminarse. Con el tiempo, los inventores observaron un incremento global de la densidad volumétrica de los depósitos amiloides, en donde la densidad en T2 fue en promedio un 23% mayor que en T1. La tasa de progresión amiloide fue mayor en los ratones APP/PS1 tratados con ApoE4, mientras que los animales expuestos a ApoE2 tuvieron una densidad de depósitos amiloides significativamente reducida en relación con la GFP (0,66), ApoE3 (0,67) y ApoE4 (0,74) después de 2 meses (**Figuras 11A,11B**). Importantly, los cambios por ApoE2 reflejan una disminución en comparación con el estado basal, mostrando directamente, y por primera vez, una eliminación activa no inmunológica de las placas. Contrariamente a los datos obtenidos con los animales transgénicos para *APOE*, estos resultados demuestran que la inducción de un modesto incremento de la cantidad de ApoE puede afectar el proceso amiloidogénico en marcha incluso después de que ya ha comenzado la deposición amiloide.

[0152] Luego, los inventores evaluaron el crecimiento de placas amiloides individuales mediante la medida de la proporción del área transversal de los depósitos individuales entre T1/T0 y T2/T1. Se detectaron diferencias entre los grupos a T1 (proporción T1/T0), pero no a T2 (proporción T2/T1, **Figura 12**), lo que sugiere que la presencia de las variantes de ApoE humana afecta principalmente el crecimiento de las placas durante el primer mes después de la exposición, pero en adelante este parámetro ya no difiere. En particular, el tamaño de los depósitos amiloides aumentó de manera significativa en los ratones tratados con ApoE4 en comparación con ApoE2 y ApoE3, lo que sugiere que no solo se exacerbó el número de placas sino también su tamaño como consecuencia de este alelo. Por lo tanto, la ApoE4 afecta tanto la deposición inicial de los péptidos A $\beta$  así como también el tamaño de las placas preexistentes.

**La densidad sináptica alrededor de los depósitos amiloides empeora ante las isoformas ApoE3 y ApoE4 en comparación con la ApoE2**

[0153] La pérdida de sinapsis es el parámetro que mejor se correlaciona con el daño cognitivo. Los inventores demostraron recientemente que la presencia de ApoE4 se asocia con mayores niveles de A $\beta$  oligoméricos sinápticos en el cerebro de los pacientes humanos con AD y conduce a una disminución significativa de la densidad de sinapsis alrededor de las placas amiloides en comparación con ApoE3 (R. M. Koffie y col., Apolipoprotein E4 effects in Alzheimer's disease are mediated by synaptotoxic oligomeric amyloid-beta. *Brain* 135, 2155 (Jul, 2012); T. Hashimoto y col., Apolipoprotein E, Specially Apolipoprotein E4, Increases the Oligomerization of Amyloid beta Peptide. *J Neurosci* 32, 15181 (Oct 24, 2012)). Además, la evidencia reciente *in vitro* demostró que la ApoE4 falló en la protección contra la pérdida de sinapsis inducida por A $\beta$  (M. Buttini y col., Modulation of Alzheimer-like synaptic and cholinergic deficits in transgenic mice by human apolipoprotein E depends on isoform, aging, and overexpression of amyloid beta peptides but not on plaque formation. *J Neurosci* 22, 10539 (Dec 15, 2002); A. Sen, D. L. Alkon, T. J. Nelson, Apolipoprotein E3 (ApoE3) but not ApoE4 protects against synaptic loss through increased expression of protein kinase C epsilon. *J Biol Chem* 287, 15947 (May 4, 2012)). Por lo tanto, los inventores hipotetizaron que una distribución continua y difusa de cada isoforma de ApoE puede no solo afectar diferencialmente la cinética de deposición de A $\beta$  y su eliminación en el cerebro de los ratones APP/PS, sino también la integridad de las sinapsis alrededor de los depósitos amiloides.

[0154] Se determinaron las densidades de los elementos presinápticos y postsinápticos (respectivamente sinapsina-1 y PSD95) usando tomografía matricial, una técnica de alta resolución basada en tinción por inmunofluorescencia

de secciones ultra finas de tejido (K. D. Micheva, S. J. Smith, Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits. *Neuron* 55, 25 (Jul 5, 2007); R. M. Koffie y col., Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4012 (Mar 10, 2009)). Como se demostró que las especies amiloides oligoméricas se concentran en gran medida en la vecindad estrecha de los depósitos amiloides, se cuantificaron los puntos de sinapsina-1 y PSD95 lejos ( $> 50 \mu\text{m}$ ) o cerca ( $< 50 \mu\text{m}$ ) de las placas usando protocolos previamente establecidos (R. M. Koffie y col., Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4012 (Mar 10, 2009)). Los inventores observaron que la pérdida de elementos presinápticos cerca de las placas se vio exacerbada cuando se expresaron *APOE3* o bien *APOE4*, lo cual no ocurrió después de la inyección de AAV4-*APOE2* o AAV4-GFP (Figura 13A). Por el contrario, la densidad de los puntos postsinápticos permaneció inalterada entre los ratones inyectados con GFP, ApoE2 y ApoE3, mientras que los animales tratados con ApoE4 mostraron una pérdida significativa de PSD95 alrededor de los depósitos amiloides, reforzando así el efecto deletéreo de la ApoE4 sobre los efectos neurotóxicos de los A $\beta$  (Figura 13C). Cuando se evaluó la densidad de los elementos sinápticos en áreas lejanas a los depósitos amiloides ( $> 50\mu\text{m}$ ), no se pudo detectar ninguna diferencia entre los grupos, lo que sugiere que no existe un efecto de las variantes de ApoE humana por sí mismas sobre la densidad sináptica, pero sí un efecto importante de las isoformas de ApoE sobre la neurotoxicidad inducida por los péptidos A $\beta$ . Por lo tanto, la pérdida sináptica relativa observada con ApoE3 y ApoE4 se relaciona directamente con la presencia de péptidos A $\beta$  alrededor de cada placa (a una distancia  $<50 \mu\text{m}$  desde su borde).

[0155] Como parámetro neuropatológico adicional, los inventores también evaluaron el número de distrofias neuríticas asociadas con los depósitos amiloides en ratones APP/PS1 inyectados con AAV4. Además de una densidad espinal disminuida alrededor de las mismas, las placas seniles también causan una alteración más general del neuropilo con un incremento de la curvatura de las neuritas y la aparición de distrofias por inflamación. Estos cambios patológicos probablemente se pueden atribuir a las especies oligoméricas solubles de A $\beta$  que están enriquecidas en una región dentro de los  $50 \mu\text{m}$  desde la superficie de la placa. Los inventores observaron que la sobreexpresión de ApoE4 exagera la formación de distrofias neuríticas positivas para SMI312 asociadas con los depósitos amiloides en comparación con el caso de GFP, ApoE2 y ApoE3 (Figura 13C). Este resultado confirma la observación de que la isoforma ApoE4 tiene el más fuerte de los efectos y que no solo modula la formación de placas, sino que también afecta la neurotoxicidad asociada con los depósitos amiloides.

### 30 ***Las proteínas ApoE humanas modifican la cantidad de especies oligoméricas de A $\beta$ contenidas en el fluido intersticial en otro modelo de AD en ratón***

[0156] Luego, los inventores abordaron la cuestión de si la presencia de diferentes isoformas de ApoE dentro del ISF podría alterar la cantidad de especies solubles de amiloide en el mismo compartimento extracelular. Los inventores eligieron inyectar otro modelo de AD, los ratones Tg2576, con el objetivo de validar sus hallazgos previos en una línea de ratón transgénico diferente. Los ratones Tg2576 sobreexpresan la forma mutada de APP que contiene la mutación sueca y presentan un fenotipo más leve que los ratones APP/PS1 a una edad dada. Los inventores inyectaron cohortes de animales de entre 16 y 18 meses de edad, de manera que los depósitos amiloides ya estuviesen presentes al momento de la transducción del AAV4-APOE. Tres meses después de la transferencia génica, se insertó una sonda de microdiálisis en el hipocampo y se recolectaron muestras para caracterizar los cambios tempranos asociados con cada variante de APOE en el ISF.

[0157] Los inventores observaron que la concentración de especies oligoméricas de A $\beta$  medidas mediante el uso del ensayo de ELISA 82E1/82E1 específico fue significativamente mayor (en  $42\pm 7\%$ ) después de la inyección del AAV4-APOE4 en comparación con AAV4-APOE2 (Figura 14), sugiriendo que la presencia de ApoE puede modular la naturaleza de los agregados amiloides en compartimento extracelular. Además, cuando se evaluaron los A $\beta_{40}$  y A $\beta_{42}$  totales en el ISF, se observaron las mismas tendencias, pero no alcanzaron una diferencia significativa (Figura 17A), sugiriendo que la presencia de diferentes isoformas de ApoE en el ISF influye en el estado de agregación de los péptidos amiloides un poco más que la cantidad total.

[0158] Tal como era esperado, los análisis bioquímicos posteriores a la muerte de cerebros de ratones Tg2576 expuestos a las diferentes isoformas de ApoE mostraron que la concentración de A $\beta_{42}$  en la fracción de ácido fórmico aumentó de manera significativa en animales tratados con ApoE4 (Figura 17B), confirmando en un segundo modelo transgénico las observaciones de los inventores en ratones APP/PS1.

[0159] En conjunto, estas medidas bioquímicas sugieren que la expresión de ApoE en ratones Tg2576 induce cambios similares en la biología amiloide como se observó en ratones APP/PS1. Importantemente, se observa un cambio temprano en el contenido de oA $\beta$  en el ISF, en donde estas especies neurotóxicas pueden interactuar directamente con las terminales sinápticas.



## DISCUSIÓN ---

[0160] La conexión sorprendente entre la herencia de alelos *APOE4* que aumentan el riesgo, y alelos *APOE2* que tienen un efecto opuesto dramático para el desarrollo de AD ha llevado a muchas sugerencias de cómo está mediado este riesgo. Se ha implicado a la ApoE como una proteína de unión a A $\beta$  involucrada en la depuración de A $\beta$ . Sin embargo, los estudios en ratones con noqueo de *apoE* reportan sorprendentemente que los depósitos de A $\beta$  fueron sustancialmente más bajos en ausencia de apoE. El reemplazo con *APOE2*, *APOE3*, o *APOE4* humana condujo a un aumento en los depósitos amiloides del mismo orden que en pacientes con AD, lo cual se postuló que ocurre mediante un efecto sobre el inicio de la placa o formación de fibrillas. Existen hipótesis alternativas que se enfocan en los efectos diferenciales sobre el desarrollo neurítico, o incluso proponen que el efecto del genotipo de APOE sobre el fenotipo de la enfermedad de Alzheimer es una consecuencia de otro gen en el desequilibrio genético con *APOE* en el cromosoma 19.

[0161] Los datos de los inventores, derivados del estudio de 2 modelos de ratones diferentes usando una estrategia previamente ensayada en las condiciones de enfermedad de almacenamiento lisosomal y enfermedad de Huntington, abordaron directamente estos problemas mediante el uso de una combinación de imágenes de fotón múltiple *in vivo*, inmunohistopatología cuantitativa estándar, estudio de tomografía matricial de la estructura sináptica, y estrategias de microdiálisis de alto peso molecular novedosas que permiten el examen de A $\beta$  oligomérico. Los inventores mostraron que el cambio del microambiente de ApoE en ISF en animales con enfermedad establecida tiene efectos específicos de alelo sorprendentes y rápidos sobre la economía de A $\beta$ . El estudio de los inventores demostró que incluso un aumento modesto (~10%) en los niveles de ApoE4, administrada al ISF, impacta de manera marcada en el fenotipo y cinética depuración de A $\beta$ , con una retención asociada a ApoE4 de A $\beta$  soluble aumentado, así como también las formas fibrilares y extraíbles con ácido fórmico, y aumenta la neurotoxicidad alrededor de las placas marcado por la pérdida sináptica y distrofias neuríticas aumentadas. En cambio, la apoE2 disminuye el A $\beta$ , y tiene un efecto neuroprotector marcado.

[0162] Debido a que los cambios modestos en los niveles de ApoE en ISF tienen tales consecuencias dramáticas, estos resultados pueden llevar a conocimientos sobre los efectos de una amplia variedad de factores ambientales y genéticos que podrían alterar el riesgo de AD o progresión de AD mediante la influencia en la expresión de *APOE*. Los aumentos en ApoE sustancialmente mayores que la magnitud el mostraron los inventores puede producirse después de un trauma, epilepsia, isquemia y dietas ricas en colesterol, las cuales han sido asociadas a A $\beta$  cerebral elevado. Además, los polimorfismos de promotor que han sido previamente encontrados en desequilibrio genético con el alelo *APOE4* impactan en la expresión de *APOE*.

[0163] Otras manipulaciones que impactan en la homeostasis de ApoE o ApoE-lipoproteínas en el SNC cambiar claramente la deposición de A $\beta$ . Por ejemplo, en experimentos con transferencia génica focal con lentivirus de APOE (principalmente en las neuronas del hipocampo), la sobreexpresión de *APOE4* ejerce un efecto más fuerte sobre el amiloide en relación a *APOE3*. Estudios previos también mostraron que los agonistas de RXR, que tienen efectos múltiples incluyendo síntesis endógena aumentada de apoE, llevan a la depuración de A $\beta$  del cerebro quizás mediante un efecto sobre la depuración a través de la barrera hematoencefálica. Además, la transducción en cerebro de CYP46A, que metaboliza el colesterol en el SNC y disminuye sus niveles, reduce la deposición de A $\beta$  como lo hace el aumento de LDL-R en el cerebro, que se sabe que disminuye los niveles de apoE. Finalmente, las manipulaciones genéticas sugieren que el cambio en la expresión de *apoE* a la mitad pueden impactar en el fenotipo de A $\beta$ . Los resultados de los inventores sugieren de manera interesante que cambios más modestos también podrían tener efectos dramáticos.

[0164] Los datos de los inventores abordan directamente otras 4 áreas importantes de controversia en la literatura sobre APOE-Alzheimer. 1) Los inventores demuestran un efecto claro de la isoforma de ApoE sobre la neurotoxicidad evaluado mediante la pérdida de sinapsis y distrofias neuríticas, ambos relacionados posiblemente por deterioros en la función del sistema neuronal. Debido a que estos efectos fueron evidentes en la cercanía inmediata de las placas, pero no en áreas distantes de las placas, la naturaleza protectora de las sinapsis de ApoE2 en comparación con ApoE4 posiblemente esté mediada por efectos sobre el A $\beta$  cercano a la placa más que debido a un efecto directo de ApoE sobre la estabilidad sináptica. 2) La observación directa de la cinética de la deposición y crecimiento de placa usando imágenes de multifotón longitudinal *in vivo* muestran que la ApoE4 aumenta la deposición y crecimiento de placa, mientras que ApoE2 se asocia realmente con la resolución de placas - con el argumento de que las isoformas de ApoE tienen un impacto poderoso sobre el ritmo y progresión de la enfermedad más allá de un efecto inicial sobre la formación de placa fibrilar. Los resultados refuerzan la idea de que ApoE4 puede acelerar el proceso de la enfermedad en términos de la deposición amiloide y neurotoxicidad (y por lo tanto llevar a una edad más temprana de inicio) mientras que ApoE2 hace lo opuesto, que plantea la posibilidad de que la introducción de ApoE2 (o un mimético de ApoE2) en el SNC podría tener un valor terapéutico incluso después de que la enfermedad esté bien establecida. 3) Se ha sugerido de manera variable a la ApoE como un mecanismo para depurar a A $\beta$  del cerebro o como una molécula de retención que aumenta la vida media de la depuración; los resultados actuales de los inventores muestran que la introducción de cantidades modestas de ApoE en el ISF es suficiente para aumentar la retención de A $\beta$  en el SNC, a menos que sea ApoE2. 4) Los mecanismos de la acción protectora notable de *APOE2* en AD no son claros, en parte debido a que ApoE2 se une a receptores de ApoE de

una manera relativamente pobre. Los datos actuales de los inventores sugieren que ApoE2 tiene una ganancia de función - capaz de revertir de hecho los depósitos de A $\beta$ , así como también ayudar a la plasticidad sináptica y neurítica - además de un efecto posiblemente neutro o nulo sobre la depuración de A $\beta$  en el plasma. Esto sugiere que la diferencia de décadas en la edad de inicio entre pacientes que heredan los alelos *APOE4* y *APOE2* puede reflejar un punto de inicio diferente y diferencias continuas en la cinética de deposición y depuración de A $\beta$  así como también las diferencias específicas de alelo en la extensión de la neurotoxicidad asociada con los depósitos. Esta función dual de ApoE2 puede llevar a estrategias terapéuticas dirigidas a mimetizar su depuración de placa y capacidad de restauración sináptica.

[0165] Estos resultados son consistentes con un modelo en el cual la apoE actúa como un andamiaje para la oligomerización de A $\beta$ , con una eficacia de la formación y estabilización de A $\beta$  oligomérico ApoE4>ApoE3>ApoE2, y con la observación reciente de los inventores de que el A $\beta$  oligomérico está elevado en el SNC de paciente humano con AD ApoE4 >ApoE3 (incluso cuando la carga de placa se normaliza para los diferentes casos). Si ApoE, especialmente ApoE4, media la formación de A $\beta$  oligomérico neurotóxico, los inventores predicen que la ApoE4 aumentada podría llevar a alteraciones sinápticas y neuríticas aumentadas, como parece ser el caso en los presentes datos. En base a estos resultados, se debe tener cuidado respecto a agentes que podrían aumentar los niveles de ApoE en el cerebro en pacientes con AD que han heredado el alelo *APOE4*.

[0166] Finalmente, nuestros datos confirman la capacidad de AAV de mediar la transducción del epéndimo para proveer proteínas secretadas al cerebro y de aquí, a todo el manto cortical. La transferencia génica u otras estrategias que disminuyen apoE4, o aumentan apoE2, son un medio poderoso para impactar sobre la progresión de la enfermedad AD.

## MATERIALES Y MÉTODOS

[0167] **Animales.** Se realizaron experimentos usando ratones doble transgénicos APPswe/PS1dE9 (APP/PS1) (D. R. Borchelt y col., Accelerated deposición amiloide in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 19, 939 (Oct, 1997)) (obtenidos de Jackson laboratory, Bar Harbor, Maine) y ratones Tg2576 (K. Hsiao y col., Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99 (Oct 4, 1996)). Se insertó un gen de la proteína precursora amiloide mutante de humano que contenía la mutación doble sueca K594N/M595L en el genoma de estas dos líneas de ratones, bajo el control del promotor de la proteína prión. Además, el modelo de ratón APP/PS1 sobreexpresa una variante del gen de Presenilina 1 eliminado del exón 9 (controlado por el mismo promotor). La sobreexpresión concomitante de APPswe y PSEN1 en ratones APP/PS1 lleva a un fenotipo más severo, con deposición amiloide sustancial visible tan temprano como a los seis meses de edad. Por otra parte, la línea de ratones Tg2576 es un modelo mucho más leve que sólo desarrolla placas amiloides alrededor de a un año de edad. Para determinar si la introducción de diferentes isoformas de ApoE podría afectar la progresión de la enfermedad, los inventores inyectaron respectivamente ratones APP/PS1 de 7 meses de edad y 16 meses de edad (entre 4 y 7 animales por condición) y Tg2576 (entre 3 y 5 animales por condición). También se usaron ratones deficientes de APOE (ApoE-KO, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine). Los experimentos se realizaron de acuerdo con las guías de NIH y de la institución.

### Construcción y producción de vectores virales

[0168] Los ADNc de *APOE-2*, *-3* y *-4* fueron provistos de manera generosa por el Dr. LaDu de la Universidad de Illinois (Chicago). Después de la amplificación por PCR, cada uno de ellos fue digerido con BamHI e insertados en un esqueleto AAV2-pCMV-hrGFP. Se produjeron títulos más altos de vectores de serotipo 4 de AAV (AAV4-APOE2, AAV4-APOE3, AAV4-APOE4 y AAV4-GFP) usando el sistema baculovirus del Centro de Vectores de Transferencia Génica de la Universidad de Iowa, ciudad de Iowa. Los virus se titularon utilizando PCR cuantitativa.

[0169] **Inyecciones Intraventriculares Estereotácticas.** Se realizaron inyecciones intraventriculares estereotácticas de vectores de serotipo 4 de AAV como se describió previamente (T. L. Spires y col., Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci* 25, 7278 (Aug 3, 2005); G. Liu, I. H. Martins, J. A. Chiorini, B. L. Davidson, Adeno-associated virus type 4 (AAV4) targets ependyma and astrocytes in the subventricular zone and RMS. *Gene Ther* 12, 1503 (Oct, 2005)). Se anestesia en unos animales mediante inyección intraperitoneal de ketamina/xilazina (100mg/kg y 50mg/kg de peso corporal, respectivamente) y se posicionaron en un marco estereotáctico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). Se realizaron las inspecciones de vectores en cada ventrículo lateral con 5 $\mu$ l de preparación viral (título 2  $10^{12}$  vg/ml) usando una micropipeta aguda de calibre 33 unida a una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l (Hamilton Medical, Reno, NV) a una velocidad de 0,25  $\mu$ l/minuto. Las coordenadas estereotácticas de los sitios de inyección se calcularon respecto al bregma (anteroposterior +0,3mm, mediolateral  $\pm$  1mm y dorsoventral -2mm).

[0170] **Implantación de ventana craneal y obtención de imágenes multifotón.** Una semana después de la inyección intraventricular, se anestesia a los ratones con isoflurano (1,5%) y se implantó una ventana craneal por eliminación de una pieza del cráneo y reemplazo por un portaobjetos de vidrio de 8 mm de diámetro (como se describió previamente, T. L. Spires y col., Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice

demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. J Neurosci 25, 7278 (Aug 3, 2005)). Para obtener las imágenes, se construyó un anillo de cera a lo largo del borde de la para crear un pocillo de agua para el objetivo (objetivo 20, apertura numérica de 0,95, Olympus). Con el objetivo de visualizar los depósitos amiloides, los animales transgénicos recibieron una inyección intraperitoneal de metoxi-XO<sub>4</sub> (5mg/kg) 24hrs antes de la cirugía, un compuesto fluorescente que atraviesa la barrera hematoencefálica y se une a los depósitos amiloides (B. J. Bacsikai, W. E. Klunk, C. A. Mathis, B. T. Hyman, Imaging amyloid-beta deposits *in vivo*. J Cereb Blood Flow Metab 22, 1035 (Sep, 2002)). Antes de obtener las imágenes, se inyectó Texas Red dextrano (peso molecular de 70.000 Da; 12,5 mg/ml en PBS estéril; Molecular Probes, Eugene, OR) en una vena lateral de la cola para proveer un angiograma fluorescente, de manera que la forma de la vasculatura podría usarse como referencia para seguir los mismos campos exactos de observación a lo largo del tiempo. Se obtuvieron imágenes de los ratones una semana después de la inyección de AAV con el objetivo de evaluar el nivel basal de los depósitos amiloides, luego uno y dos meses después de la inyección.

[0171] Un láser Ti:Zafiro de modo bloqueado (MaiTai, Spectra-Physics, Mountain View, CA) montado sobre un sistema multifotón de imágenes (Bio-Rad 1024ES, Bio-Rad, Hercules, CA) generó una luz de excitación de fluorescencia de dos fotones de 860 nm. La luz emitida fue recogida a través de un detector externo a medida que contenía tres tubos foto multiplicadores (Hamamatsu Photonics, Bridgewater, NJ), en el rango de entre 380 y 480, entre 500 y 540 y entre 560 y 650 nm. Se obtuvieron imágenes de 2 colores para placas y angiografía de manera simultánea. Se adquirieron imágenes *in vivo* de baja magnificación (615x615 µm; paso z, 2 µm, profundidad, ~200 µm) y se obtuvieron imágenes de entre 6 y 8 campos de observación para cubrir 1 área cortical grande.

[0172] **Procesamiento y análisis de imágenes.** La densidad de placa en cada campo de observación se cuantificó mediante el uso de Image J mediante el informe del número total de depósitos amiloides por volumen de corteza registrado. Los inventores consideraron el volumen cortical comenzando desde la primera sección del apilamiento en z en la superficie hasta la última sección en la cual se podía detectar depósitos amiloides. El tamaño de los depósitos amiloides se evaluó a lo largo del tiempo por medida de su área de sección transversal a partir de la intensidad máxima después de la proyección en dos dimensiones. Para cada placa, se calculó la relación del área entre el punto de tiempo inicial y el primer mes (T1/T0), o entre el segundo y el primer mes (T2/T1).

[0173] Las configuraciones del microscopio multifotón (potencia del láser y PMT) se mantuvieron sin cambio a lo largo de las diferentes sesiones de obtención de imágenes durante todo el tiempo del experimento.

[0174] **Toma de muestra para microdiálisis *in vivo*.** Se realizó la toma de muestras para microdiálisis *in vivo* de Aβ y ApoE intersticial de cerebro en ratones Tg2576, 3 meses después de la inyección intracerebroventricular de cada AAV4 (S. Takeda y col., Novel microdiálisis method to assess neuropeptides and large molecules in free-moving mouse. Neuroscience 186, 110 (Jul 14, 2011)). La sonda de microdiálisis tenía un eje de 4 mm con una membrana de polietileno (PE) de 3,0 mm, con corte de peso molecular de 1000 kDa (MWCO) (PEP-4-03, Eicom, Kioto, Japón). Antes del uso, la sonda se acondicionó mediante inmersión breve en etanol, y luego lavado con solución amortiguadora de perfusión de líquido cefalorraquídeo artificial (aLCR) (en mM: 122 NaCl, 1,3 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 MgCl<sub>2</sub>, 3,0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25,0 NaHCO<sub>3</sub>) que se filtró través de una membrana de tamaño de poro de 0,2-µm. La salida y entrada de la sonda preacondicionada se conectaron a una bomba peristáltica (ERP-10, Eicom, Kioto, Japón) y una bomba para microjeringa (ESP-32, Eicom, Kioto, Japón), respectivamente, usando tubería de etileno polipropileno fluorado (FEP) (φ 250 µm i.d.).

[0175] La implantación de la sonda se realizó como se describió previamente (S. Takeda y col., Novel microdialysis method to assess neuropeptides and large molecules in free-moving mouse. Neuroscience 186, 110 (Jul 14, 2011); J. R. Cirrito y col., *In vivo* assessment of brain fluido intersticial with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. J Neurosci 23, 8844 (Oct 1, 2003)), con modificaciones leves. En resumen, los animales anestesiados (isoflurano 1,5%) se implantaron de manera estereotáctica con una cánula de guía (PEG-4, Eicom, Kioto, Japón) en el hipocampo (bregma -3,1 mm, -2,5 mm lateral a la línea media, -1,2 mm ventral a la dura). Luego se fijó la guía al esqueleto usando cemento dental binario.

[0176] Cuatro días después de la implantación de la cánula guía, los ratones se colocaron en una caja para microdiálisis estándar y se insertó una sonda a través de la guía. Después de inserción de la sonda, con el objetivo de obtener registros estables, la sonda y las tuberías de conexión se perfundieron con aLCR durante 240 min a una velocidad de flujo de 10 µl/min antes de la recolección de muestras. Las muestras se recolectaron a una velocidad de flujo de 0,25 (para la cuantificación de Aβ) y 0,1 µl/min (para la detección de ApoE). Las muestras se almacenaron a 4°C en tubos de polipropileno. Durante la recolección de muestras para microdiálisis, los ratones estaban despiertos y sin restricción de movimiento en la caja para microdiálisis diseñada para permitir el movimiento sin restricciones de los animales sin aplicar presión sobre la estructura de la sonda (sistema para microdiálisis AtmosLM, Eicom, Kioto, Japón).

[0177] **Análisis Inmunohistológico.** Se practicó la eutanasia de los ratones APP/PS1 por inhalación de CO<sub>2</sub> a los 2 o 5 meses después de la inyección intraventricular (exposición a corto y largo plazo), mientras que los animales Tg2576 se sacrificaron después de 3 meses. Se fijó un hemisferio cerebral completo en paraformaldehído 4% en

solución amortiguada con fosfato para análisis inmunohistológico y se embebido en parafina. Se proceso una sección coronal de 1mm a través de la corteza frontal para el ensayo de tomografía matricial, mientras que el resto del en mi cerebro se congeló rápidamente para realizar los análisis bioquímicos y moleculares.

5 [0178] Para detectar los depósitos amiloides, ApoE y GFP, se desparafinaron de manera secuencial las secciones embebidas en parafina (10 $\mu$ m) en xileno, se rehidrataron en etanol, se trataron en solución amortiguada con citrato (Citrato de sodio 10mM, Tween 20 0,05%, pH 6,0), se permeabilizaron en PBS con Tritón 0,5% y se bloquearon en PBS con BSA 3% durante 2 horas a temperatura ambiente. La incubación con anticuerpos primarios se realizó durante la noche a 4°C: Bam10 (SIGMA 1:1000) y R1282 (1:500, provistos por el Dr Dennis Selkoe) para las placas amiloides, anticuerpo monoclonal de ratón 3H1 (Instituto del Corazón de Ottawa) para ApoE humana, anti-GFP de gallina (1:500, Aves) y SMI-312 (Covance) para distrofias neuríticas. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente al día siguiente. Las placas amiloides de núcleo denso se marcaron mediante la incubación de las secciones durante 8 minutos en una solución de Thio-S (Sigma, St Louis, MO) 0,05% en etanol 50% antes del montaje.

### **Preparación de la muestra, inmunotinción y análisis de imágenes de tomografía matricial**

15 [0179] Los análisis de la tomografía matricial de los elementos pre y postsinápticos se realizaron como se describió previamente (R. M. Koffie y col., Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. Proc Natl Acad Sci USA 106, 4012 (Mar 10, 2009)). En resumen, se realizó la disección de una pieza de tejido cortical (1 mm<sup>3</sup>) adyacente a la región ventricular y se fijó durante 3h en paraformaldehído 4%, sacarosa 2,5% en PBS 0,01M. Después de la deshidratación en etanol, las muestras se incubaron en resina blanca LR (Electron Microscopy Sciences) durante la noche a 4°C antes de la polimerización a 53°C. Luego se cortaron tiras de secciones (70nm) en un micrótopo de ultracorte (Leica) mediante el uso de un Jumbo Histo Diamond Knife (Diatome).

25 [0180] Después de la rehidratación en glicina 50 mM en TBS durante 5 minutos, las secciones se bloquearon en Tween 0,05% y BSA 0,1% en Tris durante 5 minutos, y se aplicaron los anticuerpos primarios 1:50 en solución amortiguadora de bloqueo durante 2 horas (PSD95 Abcam Ab12093, Sinapsina I Millipore AB1543 y NAB61 del Dr Virginia Lee que tñe de manera preferible las especies oligoméricas de A $\beta$ , E. B. Lee y col., Targeting amyloid-beta peptide (Abeta) oligomers by passive immunization with a conformation-selective monoclonal antibody improves learning and memory in Abeta precursor protein (APP) transgenic mice. J Biol Chem 281, 4292 (Feb 17, 2006)). Las secciones se lavaron con TBS y se aplicaron los anticuerpos secundarios (anti-cabra-Alexa Fluor 488, anti-ratón Cy3, o anti-ratón Alexa Fluor 488 Invitrogen). Las imágenes se obtuvieron en las secciones 7-30 a través de la corteza frontal y se obtuvieron mediante el uso de un microscopio multifotón/confocal Zeiss Axioplan LSM510 (objetivo de inmersión en aceite apocromático 63x apertura numérica Plan A).

35 [0181] las imágenes se analizaron como se describió previamente mediante el uso de Image J (programa de computación abierto de los Institutos Nacionales de Salud) y MATLAB (Mathworks) (R. M. Koffie y col., Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. Proc Natl Acad Sci USA 106, 4012 (Mar 10, 2009)). Cada conjunto de imágenes se convirtió a un apilamiento, y se alinearon mediante el uso de los complementos MultiStackReg y StackReg para Image J (cortesía de Brad Busse y P. Thevenaz, Universidad de Stanford). Se seleccionaron volúmenes conocidos y se usó un programa de detección automatizado basado en un umbral para contar las puntas de PSD95 y sinapsina que aparecían en más de una sección consecutiva (programa WaterShed, provisto por Brad Busse, Stephen Smith, y Kristina Micheva, Universidad de Stanford). El Watershed exportó un apilamiento de imágenes tratadas con umbral (separadas para cada canal) mostrando que las puntas estaban presentes en más de una sección de la matriz. Se tomaron muestras de varios sitios en la corteza por ratón y se midió su distancia respecto al borde de una placa.

### **Cuantificación de A $\beta$**

45 [0182] Se determinaron las concentraciones de A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> en la fracción soluble de TBS, fracción de aseo fórmico así como también en el microdializado mediante ELISA en sándwich BNT-77/BA-27 (para A $\beta$ <sub>40</sub>) y BNT-77/BC-05 (para A $\beta$ <sub>42</sub>) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japón), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad de A $\beta$  oligomérico en la muestra se determinó mediante un ELISA en sándwich 82E1/82E1 (Immuno-Biological Laboratories, Inc, Hamburg, Alemania), en el cual se usaron los mismos anticuerpos de extremo N terminal (residuos 1-16) para la captura y detección (W. Xia y col., A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring beta-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer disease. Arch Neurol 66, 190 (Feb, 2009)).

### **Análisis de inmunotransferencia**

55 [0183] Se realizó la electroporación de las fracciones solubles en TBS y microdializados de cerebro (20  $\mu$ g de proteínas) en geles 4-12% Novex Bis-Tris (Invitrogen) en solución amortiguadora de corrida MOPS para SDS-PAGE

(Invitrogen). Los geles se transfirieron a una membrana de PVDF, y se bloquearon durante 60 min a RT en Leche 5% / TBS-T. Las membranas se enfrentaron a anticuerpo de cabra anti-ApoE (1:1000, Millipore, AB947) para detectar cantidades pequeñas de APOE en el ISF de animales nulos de APOE, mientras que como control se detectó a la albúmina. Las transferencias para ApoE de humano y ratón se ensayaron respectivamente con anticuerpo EP1373Y (1:1000, Novus Biologicals, NB110-55467) y con anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra apoE (1:1000, Abcam, ab20874). La incubación con los anticuerpos dirigidos contra IgG de cabra conjugados a HRP (Vector) se realizó durante 2 horas. Las proteínas inmunorreactivas se revelaron utilizando el kit ECL (Western Lightning, PerkinElmer) y se detectaron en Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

#### **qRT-PCR**

10 [0184] Se extrajo el ARN total de muestras de cerebro usando el reactivo TRIzol® (Life technologies; 15596-026) y luego se sintetizaron los ADNc de acuerdo con las instrucciones del fabricante del Sistema de RT-PCR SuperScript® III One-Step (Life technologies; 12574-018). Los cebadores para PCR se diseñaron específicamente para amplificar el ARNm de la APOE humana recombinante y los ARNm de *ApoE* y *Gapdh* endógenas (*ApoE* directo: 5'-AGCTCCCAAGTCACACAAGA ; *ApoE* inverso: 5'- GTTGCCTAGATCCTCCATGT ; APOE directo: 5'-CCAGCGACAATCACTGAAC ; APOE inverso: 5'- GCGCGTAATACGACTACTA; *Gapdh* directo: 5'-ATGACATCAAGAAGGTGGTG y *Gapdh* inverso: 5'-CATACCAGGAAATGAGCTTG).

#### **ELISA para APOE**

20 [0185] Se usaron ensayos de ELISA específicos para detectar las proteínas APOE endógenas de humano y de murino. En resumen, se recurrieron a las placas de ELISA durante la noche con 1,5 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-APOE (para detectar la APOE murina) o 1,5 µg/ml de anticuerpo WUE4 (para detectar la APOE humana) y se bloquearon con leche descremada al 1% diluida en PBS durante 1,5 horas a 37°C. Se usaron las proteínas apoE recombinantes humanas como estándares (para el ensayo específico de humano, Biovision) o estándares de ratón internos de extractos de cerebro (para el ensayo pacífico murino) y las muestras se diluyeron en solución amortiguadora para ELISA (BSA 0,5% y Tween-20 0,025% en PBS) y se incubaron durante la noche. Después del lavado, se usaron los anticuerpos de detección específicos para humano (cabra-apoe Millipore; 1:10,000) o ratón (Abcam ab20874 ; 1:2.000) respectivamente, seguido por una incubación de 1,5 horas con un secundario apropiado conjugado con HRP. El revelado de la señal se realizó usando el sustrato TMB antes de detener la solución usando H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Los resultados colorimétricos se midieron a 450nm.

#### **Análisis estadístico**

30 [0186] Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa de computación Prism. Debido al tamaño pequeño de las muestras, no se pudo asumir la normalidad para la mayor parte de los análisis. Para todos los análisis posteriores a la muerte, se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida por una prueba de comparación múltiple de Dunn para evaluar el efecto de cada vector inyectado. Los datos de imágenes *in vivo* de la progresión amiloide se analizaron utilizando un modelo de efectos mixtos, con un efecto al azar para ratón, y efectos fijos para el vector, tiempo y densidad volumétrica basal. Se consideró una interacción entre el tiempo y vector en este análisis, pero no fue significativo. Para el análisis del tamaño de placa a lo largo del tiempo, se ajustaron dos modelos de efectos mixtos para log de la relación de dos puntos en el tiempo consecutivos, con efectos al azar para ratón y efectos fijos para el tamaño basal de log (t<sub>0</sub> en el primer análisis, t<sub>1</sub> en el segundo análisis).

40 [0187] Se debe considerar que el uso de los términos "uno/a" y "un" y "el/la" y referencias similares en el contexto de la descripción de la invención cubren la referencia en singular y plural, a menos que se indique de otra manera en la presente o que el contexto lo contradiga claramente. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye", y "que contiene" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, que significan "que incluyen, pero sin limitación a") a menos que se indique otra manera. La indicación de rangos de valores en la presente tiene la única intención de servir como un método abreviado de referirse de manera individual a cada valor separado que cae dentro del rango, a menos que se indique de otra manera en la presente, y que cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si fuera descrito de manera individual en la presente. Todos los métodos descritos en la presente se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otra manera en la presente o que el contexto lo contradiga claramente de otra manera. El uso de cualquier ejemplo y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplificativo (por ejemplo, "tal como") provisto en la presente, tiene la única intención de ilustrar de mejor manera la invención y no implica una limitación en el alcance de la invención a menos que se invoque de otra manera. No se debe interpretar ningún lenguaje en la memoria descriptiva como que se refiere a cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

55 [0188] En la presente se describen distintas formas de realización de esta invención, que incluyen el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Las variaciones de aquellas formas de realización pueden resultar evidentes para los expertos en la materia al leer la descripción precedente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION

5 <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR DEPÓSITOS AMILOIDES

<130> 17023.122WO1

<140>

10 <141>

<150> 61/648.801

<151> 2012-05-18

15 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 735

<212> PRT

<213> Virus adenoasociado 2

<400> 1

25

ES 2 786 078 T3

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser  
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro  
20 25 30

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro  
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
50 55 60

Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
65 70 75 80

Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro  
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
130 135 140

Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly  
145 150 155 160

Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
165 170 175

Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro  
180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly  
195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser





ES 2 786 078 T3

Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr  
 435 440 445

Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln  
 450 455 460

Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly  
 465 470 475 480

Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn  
 485 490 495

Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly  
 500 505 510

Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp  
 515 520 525

Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys  
 530 535 540

Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr  
 545 550 555 560

Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr  
 565 570 575

Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr  
 580 585 590

Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp  
 595 600 605

Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr  
 610 615 620

Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys  
 625 630 635 640

ES 2 786 078 T3

His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn  
645 650 655

Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln  
660 665 670

Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys  
675 680 685

Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr  
690 695 700

Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr  
705 710 715 720

Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
725 730 735

<210> 2

<211> 734

<212> PRT

5 <213> Virus adenoasociado 4

<400> 2

ES 2 786 078 T3

Met Thr Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser Glu  
1 5 10 15

Gly Val Arg Glu Trp Trp Ala Leu Gln Pro Gly Ala Pro Lys Pro Lys  
20 25 30

Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro Gly  
35 40 45

Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro Val  
50 55 60

Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp Gln  
65 70 75 80

Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala Asp  
85 90 95

Ala Glu Phe Gln Gln Arg Leu Gln Gly Asp Thr Ser Phe Gly Gly Asn  
100 105 110

Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro Leu  
115 120 125

Gly Leu Val Glu Gln Ala Gly Glu Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro  
130 135 140

Leu Ile Glu Ser Pro Gln Gln Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile Gly Lys  
145 150 155 160

Lys Gly Lys Gln Pro Ala Lys Lys Lys Leu Val Phe Glu Asp Glu Thr  
165 170 175

Gly Ala Gly Asp Gly Pro Pro Glu Gly Ser Thr Ser Gly Ala Met Ser  
180 185 190

Asp Asp Ser Glu Met Arg Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Val Glu Gly  
195 200 205

Gly Gln Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys



ES 2 786 078 T3

Asp Gln Tyr Leu Trp Gly Leu Gln Ser Thr Thr Thr Gly Thr Thr Leu  
 435 440 445

Asn Ala Gly Thr Ala Thr Thr Asn Phe Thr Lys Leu Arg Pro Thr Asn  
 450 455 460

Phe Ser Asn Phe Lys Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Ser Ile Lys Gln  
 465 470 475 480

Gln Gly Phe Ser Lys Thr Ala Asn Gln Asn Tyr Lys Ile Pro Ala Thr  
 485 490 495

Gly Ser Asp Ser Leu Ile Lys Tyr Glu Thr His Ser Thr Leu Asp Gly  
 500 505 510

Arg Trp Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Pro Met Ala Thr Ala Gly Pro  
 515 520 525

Ala Asp Ser Lys Phe Ser Asn Ser Gln Leu Ile Phe Ala Gly Pro Lys  
 530 535 540

Gln Asn Gly Asn Thr Ala Thr Val Pro Gly Thr Leu Ile Phe Thr Ser  
 545 550 555 560

Glu Glu Glu Leu Ala Ala Thr Asn Ala Thr Asp Thr Asp Met Trp Gly  
 565 570 575

Asn Leu Pro Gly Gly Asp Gln Ser Asn Ser Asn Leu Pro Thr Val Asp  
 580 585 590

Arg Leu Thr Ala Leu Gly Ala Val Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg  
 595 600 605

Asp Ile Tyr Tyr Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp  
 610 615 620

Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Ile Gly Gly Phe Gly Leu Lys His  
 625 630 635 640

ES 2 786 078 T3

Pro Pro Pro Gln Ile Phe Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro  
645 650 655

Ala Thr Thr Phe Ser Ser Thr Pro Val Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr  
660 665 670

Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Gln Ile Asp Trp Glu Ile Gln Lys Glu  
675 680 685

Arg Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Phe Thr Ser Asn Tyr Gly  
690 695 700

Gln Gln Asn Ser Leu Leu Trp Ala Pro Asp Ala Ala Gly Lys Tyr Thr  
705 710 715 720

Glu Pro Arg Ala Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr His His Leu  
725 730

<210> 3

<211> 2208

<212> ADN

5 <213> Virus adenoasociado 2

<400> 3

ES 2 786 078 T3

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca ctctctctga aggaataaga 60  
cagtgggtgga agctcaaacc tggcccacca ccaccaaagc ccgacagagcg gcataaggac 120  
gacagcaggg gtctttgtgct tcctgggtac aagtacctcg gacccttcaa cggactcgac 180  
aaggagagagc cggccaacga ggcagacgcc gcggccctcg agcacgacaa agcctacgac 240  
cggcagctcg acagcggaga caacccttac ctcaagtaca accacgccga cgcggagttt 300  
caggagcggc ttaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcggacgagc agtcttccag 360  
gcgaaaaaga gggttcttga acctctgggc ctggttgagg aacctgttaa gacggctccg 420  
ggaaaaaaga ggccggtaga gcaactctcct gtggagccag actcctcctc gggaaccgga 480  
aaggcgggccc agcagcctgc aagaaaaaga ttgaattttg gtcagactgg agacgcagac 540  
tcagtacctg acccccagcc tctcggacag ccaccagcag cccctctgg tctgggaact 600  
aatacgatgg ctacaggcag tggcgcacca atggcagaca ataacgaggg cgccgacgga 660  
gtgggtaatt cctcgggaaa ttggcattgc gattccacat ggatgggcca cagagtcatc 720  
accaccagca cccgaacctg ggccctgccc acctacaaca accacctcta caaacaatt 780  
tccagccaat caggagcctc gaacgacaat cactactttg gctacagcac cccttggggg 840  
tattttgact tcaacagatt ccaactgccac ttttaccac gtgactggca aagactcatc 900  
aacaacaact ggggattccg acccaagaga ctcaacttca agctctttaa cattcaagtc 960  
aaagaggcca cgcagaatga cggtagcagc acgattgcca ataaccttac cagcacggtt 1020  
cagggtgttta ctgactcggg gtaccagctc ccgtactgctc tcggctcggc gcatcaagga 1080  
tgcttcccgc cgttcccagc agacgtcttc atggtgccac agtatggata cctcacctg 1140  
aacaacggga gtcaggcagt aggacgctct tcattttact gcctggagta ctttccttct 1200  
cagatgctgc gtaccggaac caactttacc ttcagctaca cttttgagga cgttcctttc 1260  
cacagcagct acgctcacag ccagagtctg gaccgtctca tgaatcctct catcgaccag 1320  
tacctgtatt acttgagcag aacaacact ccaagtggaa ccaccacgca gtcaaggctt 1380  
cagttttctc aggccggagc gactgacatt cgggaccagt ctaggaactg gcttcctgga 1440  
ccctgttacc gccagcagcg agtatcaaag acatctcgcg ataacaaca cagtgaatac 1500  
tcgtggactg gagctaccaa gtaccacctc aatggcagag actctctggt gaatccgggc 1560  
ccggccatgg caagccacaa ggacgatgaa gaaaagtttt ttcctcagag cggggttctc 1620

ES 2 786 078 T3

atctttggga agcaaggctc agagaaaaca aatgtggaca ttgaaaaggt catgattaca 1680  
gacgaagagg aaatcaggac aaccaatccc gtggctacgg agcagtatgg ttctgtatct 1740  
accaacctcc agagaggcaa cagacaagca gctaccgag atgtcaacac acaaggcgtt 1800  
cttccaggca tggctctggca ggacagagat gtgtaccttc aggggcccac ctgggcaaag 1860  
attccacaca cggacggaca ttttcacccc tctcccctca tgggtggatt cggacttaaa 1920  
caccctcctc cacagattct catcaagaac accccggtag ctgcgaatcc ttcgaccacc 1980  
ttcagtgcgg caaagtttgc ttccttcac acacagtact ccacgggaca ggtagcgtg 2040  
gagatcgagt gggagctgca gaaggaaaac agcaaacgct ggaatcccga aattcagtag 2100  
acttccaact acaacaagtc tgtaaatgtg gactttactg tggacactaa tggcgtgtat 2160  
tcagagcctc gccccattgg caccagatac ctgactcgta atctgtaa 2208

<210> 4

<211> 2205

<212> ADN

5 <213> Virus adenoasociado 4

<400> 4



ES 2 786 078 T3

atgactgacg gttaccttcc agattggcta gaggacaacc tctctgaagg cgttcgagag 60  
 tggtagggcgc tgcaacctgg agcccctaaa cccaaggcaa atcaacaaca tcaggacaac 120  
 gctcggggtc ttgtgcttcc gggttacaaa tacctcggac ccggcaacgg actcgacaag 180  
 ggggaacctcg tcaacgcagc ggacgcggca gccctcgagc acgacaaggc ctacgaccag 240  
 cagctcaagg ccggtgacaa cccctacctc aagtacaacc acgccgacgc ggagttccag 300  
 cagcggcttc agggcgacac atcgtttggg ggcaacctcg gcagagcagt cttccaggcc 360  
 aaaaagaggg ttcttgaacc tcttggctctg gttgagcaag cgggtgagac ggctcctgga 420  
 aagaagagac cgttgattga atccccccag cagcccgact cctccacggg tatcggcaaa 480  
 aaaggcaagc agccggctaa aaagaagctc gttttcgaag acgaaactgg agcaggcgac 540  
 ggacccccctg agggatcaac ttccggagcc atgtctgatg acagtgagat gcgtgcagca 600  
 gctggcggag ctgcagtcga gggcggacaa ggtgccgatg gaggggtaa tgcctcgggt 660  
 gattggcatt gcgattccac ctggtctgag ggccacgtca cgaccaccag caccagaacc 720  
 tgggtcttgc ccacctata caaccacctc tacaagcgac tcggagagag cctgcagtcc 780  
 aacacctaca acggattctc cccccctgg ggatactttg acttcaaccg cttccactgc 840  
 cacttctcac cacgtgactg gcagcgactc atcaacaaca actggggcat gcgacccaaa 900  
 gccatgcggg tcaaaatctt caacatccag gtcaaggagg tcacgacgtc gaacggcgag 960  
 acaacggtgg ctaataacct taccagcacg gttcagatct ttgcggactc gtcgtacgaa 1020  
 ctgccgtacg tgatggatgc gggcaagag ggacgctgc ctctttttcc caacgacgtc 1080  
 tttatggtgc ccagtagcg ctactgtgga ctggtgaccg gcaacacttc gcagcaacag 1140  
 actgacagaa atgccttcta ctgcctggag tactttcctt cgcagatgct gcggactggc 1200  
 aacaactttg aaattacgta cagttttgag aagggtcctt tccactcgat gtacgcgcac 1260  
 agccagagcc tggaccggct gatgaaccct ctcatcgacc agtacctgtg gggactgcaa 1320  
 tcgaccacca ccggaaccac cctgaatgcc gggactgcca ccaccaactt taccaagctg 1380  
 cggcctacca acttttcaa ctttaaaaag aactggctgc ccgggccttc aatcaagcag 1440  
 cagggtctct caaagactgc caatcaaac tacaagatcc ctgccaccgg gtcagacagt 1500  
 ctcatcaaat acgagacgca cagcactctg gacggaagat ggagtgccct gacccccgga 1560  
 cctccaatgg ccacggctgg acctgcggac agcaagtcca gcaacagcca gctcatcttt 1620

ES 2 786 078 T3

gcggggccta aacagaacgg caacacggcc accgtacccg ggactctgat cttcacctct 1680  
 gagggaggagc tggcagccac caacgccacc gatacggaca tgtggggcaa cctacctggc 1740  
 ggtgaccaga gcaacagcaa cctgccgacc gtggacagac tgacagcctt gggagccgtg 1800  
 cctggaatgg tctggcaaaa cagagacatt tactaccagg gtcccatttg ggccaagatt 1860  
 cctcataccg atggacactt tcaccctca ccgctgattg gtgggtttgg gctgaaacac 1920  
 ccgctcctc aaatTTTTat caagaacacc ccggtacctg cgaatcctgc aacgacctc 1980  
 agctctactc cggtaaactc cttcattact cagtacagca ctggccaggt gtcggtgcag 2040  
 attgactggg agatccagaa ggagcgggcc aaacgctgga accccgaggt ccagtttacc 2100  
 tccaactacg gacagcaaaa ctctctgttg tgggctcccg atgctgctgg gaaatacact 2160  
 gagcctaggg ctatcgggtac ccgctacctc acccaccacc tgtaa 2205

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 5

10 agctccaag tcacacaaga 20

<210> 6  
 <211> 20  
 <212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 6

20 gttgcgtaga tcctcatgt 20

<210> 7  
 <211> 19  
 <212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 7

ccagcgaaa tctactgaac 19

35

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

# ES 2 786 078 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 8

5 ggcgctaata cgactcacta 20

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 9

15 atgacatcaa gaaggtagtg 20

<210> 10

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

25

<400> 10

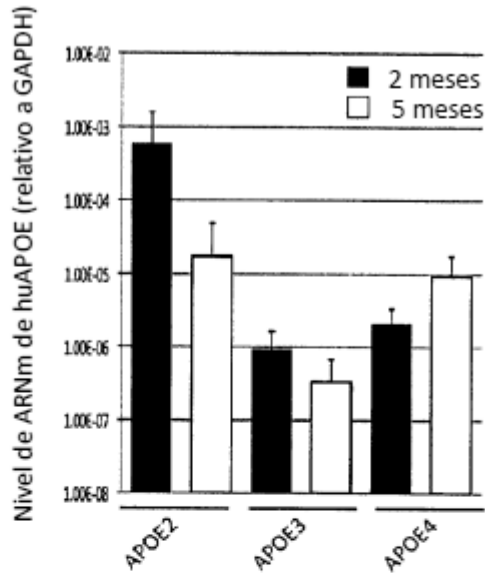
cataccagga aatgagcttg 20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una partícula de rAAV2 que comprende una proteína de la cápside de AAV2 y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para una proteína protectora isoforma ε2 de ApoE insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV2, para usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un mamífero, en donde la partícula de rAAV se administra a una célula endotelial proveyendo de esta manera el ácido nucleico a la célula endotelial, en donde la célula endotelial secreta la proteína ApoE ε2 para tratar la enfermedad, y en donde el mamífero es un mamífero no roedor.
- 10 2. La partícula de rAAV2 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la partícula de rAAV2 se administra *ex vivo* a una célula endotelial del mamífero no roedor y la célula endotelial se regresa al mamífero no roedor, proveyendo de esta manera el ácido nucleico al mamífero no roedor.
3. La partícula de rAAV2 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la partícula de rAAV2 se administra al líquido cefalorraquídeo (LCR) del mamífero no roedor.
- 15 4. La partícula de rAAV2 para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el mamífero no roedor es un primate, caballo, oveja, cabra, cerdo, o perro.
5. La partícula de rAAV2 para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el mamífero no roedor es un humano.
- 20 6. La partícula de rAAV2 para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el vector además comprende un elemento control, en donde el elemento control dirige la transcripción o expresión del ácido nucleico en el mamífero *in vivo*.
- 25 7. Una composición farmacéutica que comprende una partícula de rAAV2 que comprende una proteína de la cápside de AAV2 y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para una proteína protectora isoforma ε2 de ApoE insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV2, para usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un mamífero, en donde la partícula de rAAV2 se administra a una célula endotelial proveyendo de esta manera el ácido nucleico a la célula endotelial, en donde la célula endotelial secreta la proteína ApoE ε2 para tratar la enfermedad, y en donde el mamífero es un mamífero no roedor.

Figura 1

A



B

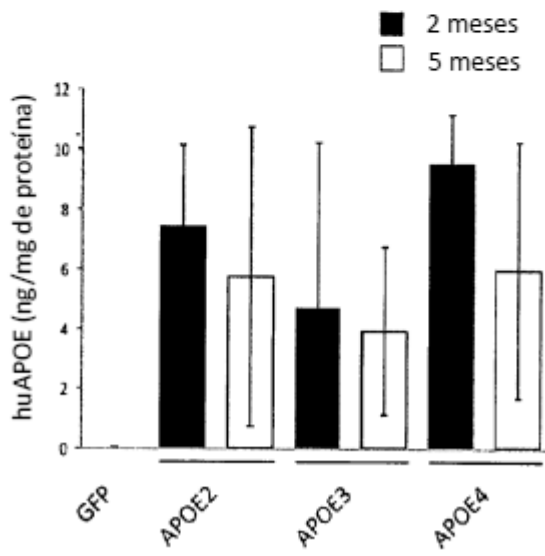


Figura 2

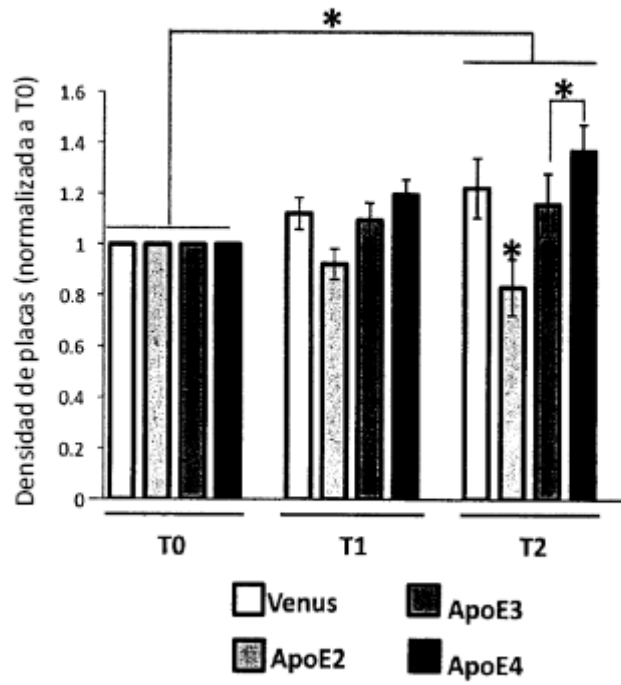


Figura 3

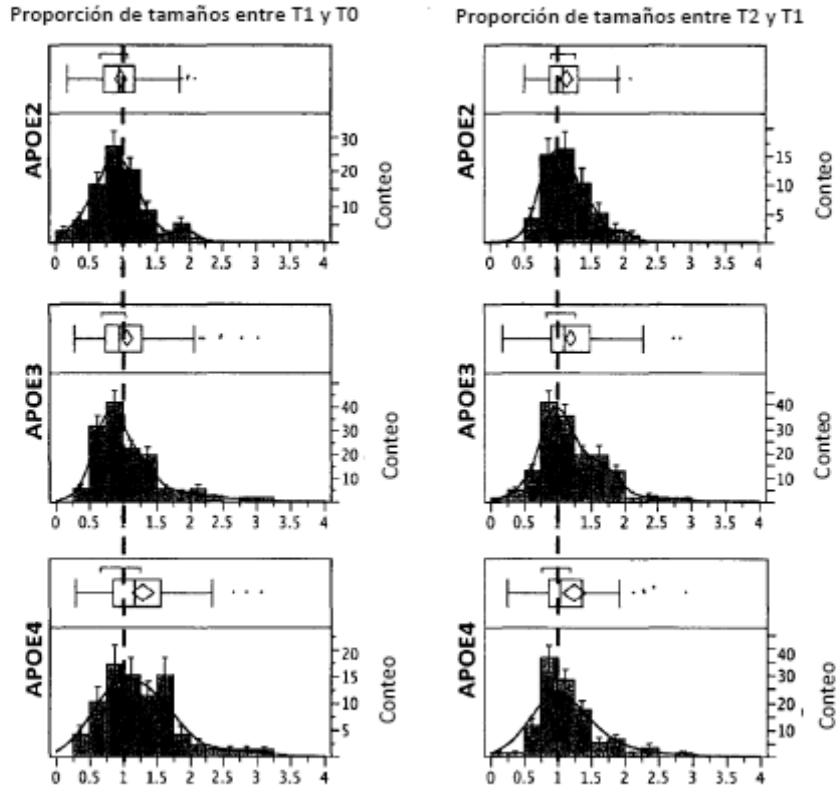


Figura 4

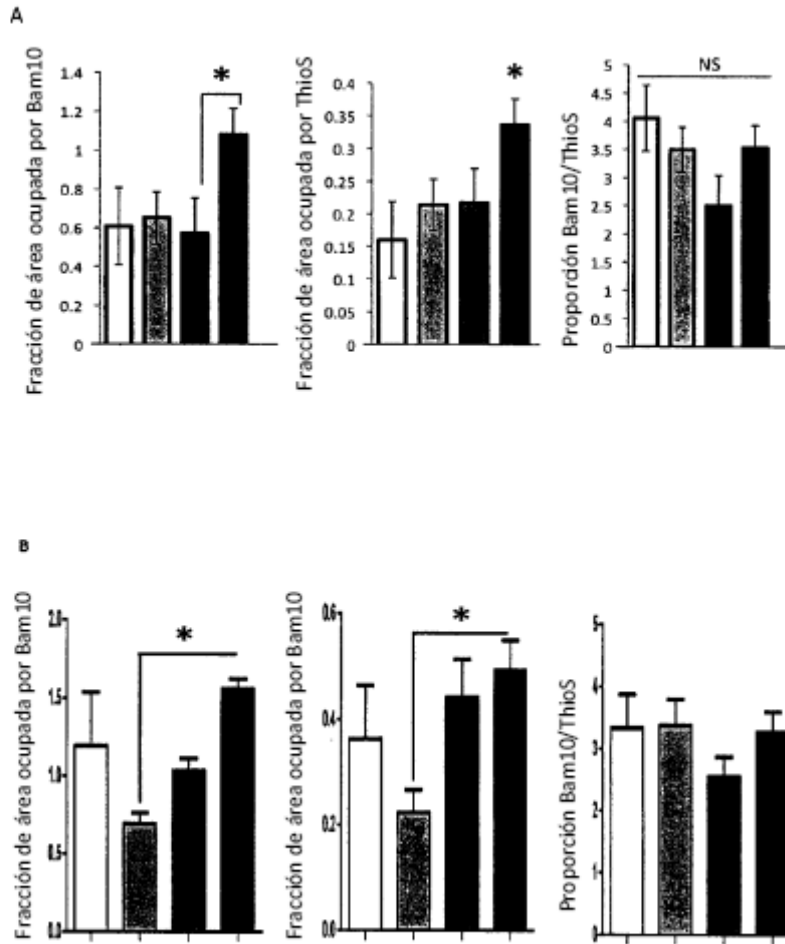




Figura 5

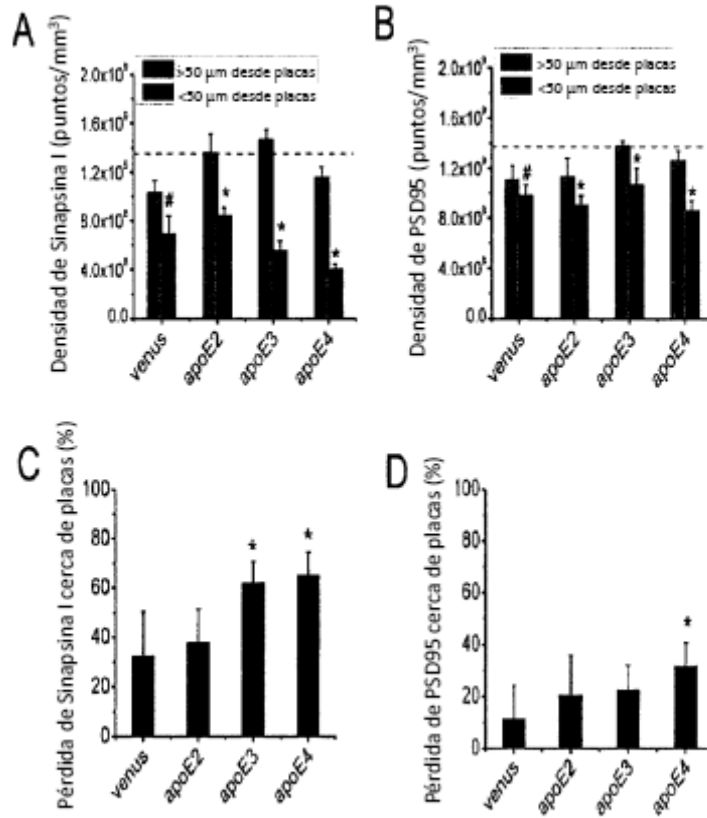








Figura 6B-1

ClustalW (v1.83) alineamiento de múltiples secuencias

2 secuencias alineadas                      Puntuación de alineamiento = nan  
 Brechas insertadas = 10                      Identities Conservadas = 1440

Modo de alineamiento de a pares: lento  
 Parámetros de alineamiento de a pares  
     Penalidad por brecha abierta = 10.0                      Penalidad por brecha extendida = 5.0  
     Matriz de similitud: gonnet

Parámetros de alineamiento múltiple  
     Penalidad por brecha abierta = 30.0                      Penalidad por brecha extendida = 5.0  
     Divergencia retraso = 40%                      Transiciones: ponderadas

Tiempo de procesamiento: 1.8 segundos

1. AAV2capNuc vs. AAV4capNuc1

Longitud alineada = 2235    Brechas = 10  
 Identities = 1440 (65%)

```

AAV2capNuc      1 ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATAAGA   60
AAV4capNuc1    1 ---ATGACTGACGGTTACCTTCCAGATTGGCTAGAGGACAACCTCTCTGAAGGCGTTCGA   57
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AAV2capNuc     61 CAGTGGTGGAAGCTCAAACCTGGCCACCACCACCAAAGCCCGCAGAGCGGCATAAGGAC   120
AAV4capNuc1    58 GAGTGGTGGGCGCTGCAACCTGGAGCCCCATAACCCAAGGCAAATCAACAACATCAGGAC   117
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

Figura 6B-2

AAV2capNuc 121 GACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCTGGGTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGAC 180  
 AAV4capNuc1 118 AACGCTCGGGGTCTTGTGCTTCCGGGTACAATAACCTCGGACCCGGCAACGGACTCGAC 177  
 \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*

AAV2capNuc 181 AAGGGAGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGGCCCTCGAGCAGACAAAGCCTACGAC 240  
 AAV4capNuc1 178 AAGGGGGAACCCGTCAACGCAGCGGACGCGGCAGCCCTCGAGCAGACAAGGCCTACGAC 237  
 \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\* \*\* \*\*

AAV2capNuc 241 CGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGCGGAGTTT 300  
 AAV4capNuc1 238 CAGCAGCTCAAGGCCGGTGAACAACCCCTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGCGGAGTTT 297  
 \* \*\*\*\*\* \* \*\* \*\*\*\*\*

AAV2capNuc 301 CAGGAGCGCCTTAAAGAAGATACGTCTTTGGGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCCAG 360  
 AAV4capNuc1 298 CAGCAGCGGCTTCAGGGCAGACATCGTTTGGGGCAACCTCGGCAGAGCAGTCTTCCAG 357  
 \*\*\* \*\* \*\* \* \* \*\* \* \*\* \*\*\*\*\*

AAV2capNuc 361 GCGAAAAAGAGGTTCTTGAACCTCTGGCCTGGTTGAGGAACCTGTTAAGACGGTCCG 420  
 AAV4capNuc1 358 GCCAAAAAGAGGTTCTTGAACCTCTGGTCTGGTTGAGCAAGCGGTGAGACGGTCTCT 417  
 \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \* \*\*\*\*\*

AAV2capNuc 421 GGAAAAAAGAGGCCGGTAGAGCACTCTCTGTGGAGCCAGACTCCTCCTCGGGAACCGGA 480  
 AAV4capNuc1 418 GGAAAGAAGAGACC GTTGATTGAATCCCCCAGCAGCCGACTCCTCCACGGGTATCGGC 477  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*

AAV2capNuc 481 AAGGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAAGATTGAATTTGGTCAGACTGGAGACGCAGAC 540  
 AAV4capNuc1 478 AAAAAAGCAAGCAGCCGGCTAAAAAGAAGCTCGTTTTCGA-----AGACGAAACT 528  
 \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \* \* \*\* \* \*\*\*\*\* \*



Figura 6B-4

```

AAV2capNuc 961 AAAGAGGTCACGCAGAATGACGGTACGACGACGATTGCCAATAACCTTACCAGCACGGTT 1020
AAV4capNuc1 934 AAGGAGGTCACGACGTCGAACGGCGAGACAACGGTGGCTAATAACCTTACCAGCACGGTT 993
      ** ***** * **** ** ** * ** *****
AAV2capNuc 1021 CAGGTGTTTACTGACTCGGAGTACCAGCTCCCGTACGTCCTCGGCTCGGGCATCAAGGA 1080
AAV4capNuc1 994 CAGATCTTTGCGGACTCGTCGTACGAAGTCCCGTACGTGATGGATGCGGGTCAAGAGGGC 1053
      *** * ** * ***** **** * ** ***** * * *** ** * **
AAV2capNuc 1081 TGCTCCCGCCGTTCCAGCAGACGTCTTCATGGTGCCACAGTATGGATACCTCACCTG 1140
AAV4capNuc1 1054 AGCTGCCTCCTTTTCCCAACGACGTCTTATGGTGCCCCAGTACGGCTACTGTGGACTG 1113
      **** ** * ** * ** ***** ***** ***** ** ** **
AAV2capNuc 1141 AACAAACGGGAGT--CAGGCAGTAGGACGCTC-----TTCATTTTACTGCCTGGAGTAC 1191
AAV4capNuc1 1114 GTGACCGGCAACACTTCGAGCAACAGACTGACAGAAATGCCTTCTACTGCCTGGAGTAC 1173
      * ** * **** * * ** * * ** *****
AAV2capNuc 1192 TTTCTTCTCAGATGCTGCGTACCGAAACAACCTTTACCTTCAGCTACACTTTTGAGGAC 1251
AAV4capNuc1 1174 TTTCTTTCGAGATGCTGCGGACTGGCAACAACCTTTGAAATTACGTACAGTTTTGAGAAG 1233
      ***** ***** ** ** ***** * * *** ***** *
AAV2capNuc 1252 GTTCCTTTCCACAGCAGCTACGCTCACAGCCAGAGTCTGGACCGTCTCATGAATCCTCTC 1311
AAV4capNuc1 1234 GTGCCTTTCCACTCGATGTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCTGATGAACCCTCTC 1293
      ** ***** * ***** ***** ***** ** ***** *****
AAV2capNuc 1312 ATCGACCAGTACCTGTATTACTTGAGCAGAACAACACTCCAAGTGAACACCACGCAG 1371
AAV4capNuc1 1294 ATCGACCAGTACCTGTGGGACTGCAATCGACCACCACCGGAACCACCTGAATGCCGGG 1353
      ***** ** ** * ** ** * * *

```



Figura 6B-5

```

AAV2capNuc 1372 TCAA--GGCTTCAGTTTTCTCAGGCCGGAGCG-AGTGACATTCGGGACCAGTCTAGGAAC 1428
AAV4capNuc1 1354 ACTGCCACCACCAACTTTACCAAGCTGCGGCTACCAACTTTTCCAACTTTAAAAAGAAC 1413
      *      * ** *** ** ** * ** * ** ** ** *
AAV2capNuc 1429 TGGCTTCCTGGACCCTGTTACCGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGGATAACAAC 1488
AAV4capNuc1 1414 TGGCTGCCCGGGCCTTCAATCAAGCAGCAGGGCTTCTCAAAGACTGCCAATCAAACACTAC 1473
      ***** ** ** * * * ***** * * ***** * * ** **
AAV2capNuc 1489 AACAG--TGAATACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCA-----CCTCAAT 1533
AAV4capNuc1 1474 AAGATCCCTGCCACCAGGTCAGACAGTCTCATCAAATACGAGACGCACAGCACTCTGGAC 1533
      ** * ** * ** * * * * * ** ** * * *
AAV2capNuc 1534 GGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCGCCATGGCAAGCCACAAGGACGATGAAGAA 1593
AAV4capNuc1 1534 GGAAGATGGAGTGCCCTGACCCCGGACCTCCAATGGCCACGGCTGGACCTGCGGACAGC 1593
      ** *** * *** ** ** * * ***** * * **
AAV2capNuc 1594 AAGTTTTTCTCAGAGCGGGTCTCATCTTTGGAAGCAAGGCTCAGAGAAAACAAT 1653
AAV4capNuc1 1594 AAGTTCAG---CAACAGCCAGCTCATCTTTGCGGGCCTAACAGAACGGCAACACGGCC 1650
      ***** * *** * * ** * *** ** * ** **
AAV2capNuc 1654 GTGGACATTGAAAAGGTCATGATTACAGACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCCGTG 1713
AAV4capNuc1 1651 ACCGTACCCGGGACTCTGATCTTACCTCTGAGGAGGAGCTGGCAGCCACCAACGCCACC 1710
      * * * * ** * ** * * ** * * * * ** **
AAV2capNuc 1714 GCTACGGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGGCAACAGACAAGCAGCT 1773
AAV4capNuc1 1711 GATACGGACATGTGGGCAACCTACCTGGCGGTGACCAGAGCAACAGCAACCTGCCGACC 1770
      * ***** ** ** ** ** ** * ***** ** ** * * *

```

Figura 6B-6

```

AAV2capNuc 1774 ACCGCAGATGTCAACACACAAGGCGTTCTTCCAGGCATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTG 1833
AAV4capNuc1 1771 GTGGACAGACTGACAGCCTTGGGAGCCGTGCCTGGAATGGTCTGGCAAACAGAGACATT 1830
      * * * * *
AAV2capNuc 1834 TACCTTCAGGGGCCATCTGGGCAAAGATTCCACACACGGACGGACATTTTCACCCCTCT 1893
AAV4capNuc1 1831 TACTACCAGGTCCCATTGGGCAAGATTCCTCATACCGATGGACACTTTCACCCCTCA 1890
      *** **
AAV2capNuc 1894 CCCCTCATGGGTGGATTCCGACTTAAACACCCTCCTCCACAGATTCTCATCAAGAACC 1953
AAV4capNuc1 1891 CCGTGATTGGTGGGTTGGGCTGAAACACCCGCCTCCTCAAATTTTATCAAGAACC 1950
      ** * * * * *
AAV2capNuc 1954 CCGGTACCTGCGAATCCTTCGACCACCTTCAGTGCGCAAAGTTTGCTTCCTTCATCACA 2013
AAV4capNuc1 1951 CCGGTACCTGCGAATCCTGCAACGACCTTCAGCTCTACTCCGGTAAACTCCTTCATTACT 2010
      ***** * * * * *
AAV2capNuc 2014 CAGTACTCCACGGGACAGGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGC 2073
AAV4capNuc1 2011 CAGTACAGCACTGGCCAGGTGTCGGTGCAGATTGACTGGGAGATCCAGAAGGAGCGGTCC 2070
      ***** * * * * *
AAV2capNuc 2074 AAACGCTGGAATCCCGAAATTCAGTACACTTCCAACACAAAGTCTGTTAATGTGGAC 2133
AAV4capNuc1 2071 AAACGCTGGAACCCCGAGGTCCAGTTTACCTCCAACACGAGCAAAACTCTCTGTTG 2130
      ***** * * * * *
AAV2capNuc 2134 TTTACTGTGGACTAATGGCGTGTATTAGAGCCTCGCCCATTTGGCACCAGATACCTG 2193
AAV4capNuc1 2131 TGGGCTCCCGATGCGGCTGGGAAATACACTGAGCCTAGGGCTATCGGTACCCGCTACCTC 2190
      * * * * *

```

Figura 6B-7

```
AAV2capNuc 2194 ACTCGTAATCTGTAA 2208
AAV4capNuc1 2191 ACCCACCACCTGTAA 2205
                ** * * *****
```

Figura 7

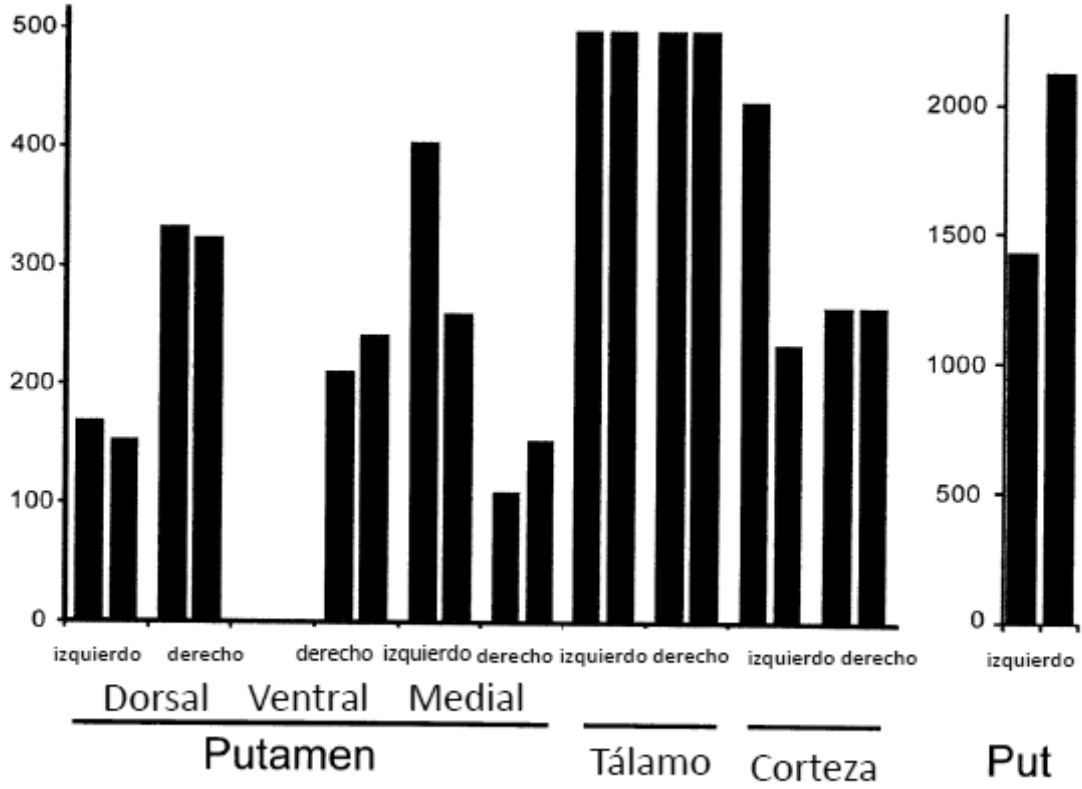


Figura 8

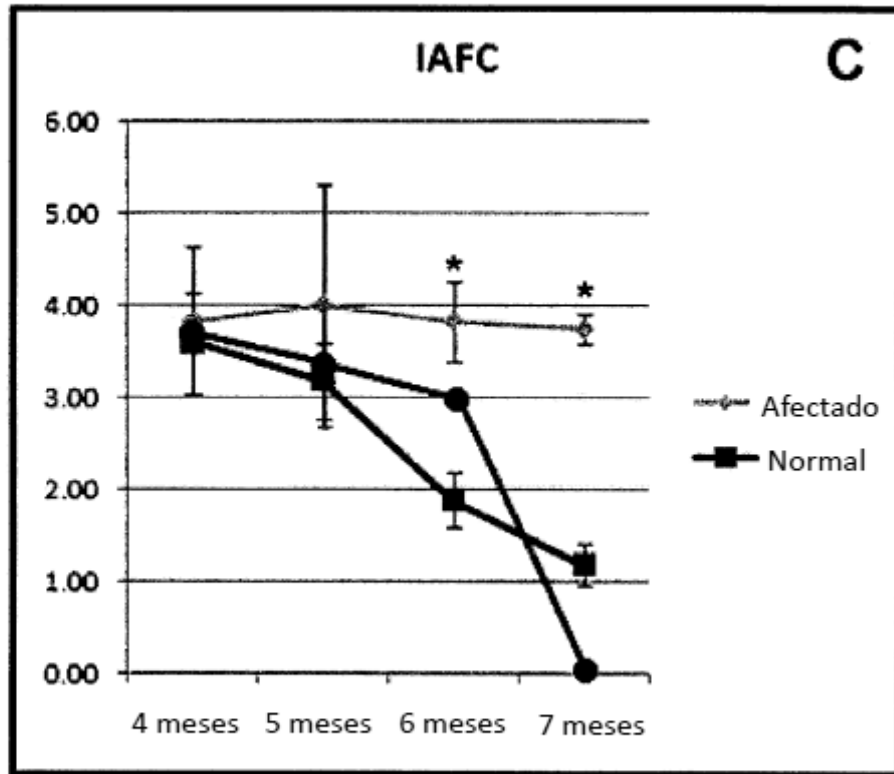


Figura 9A

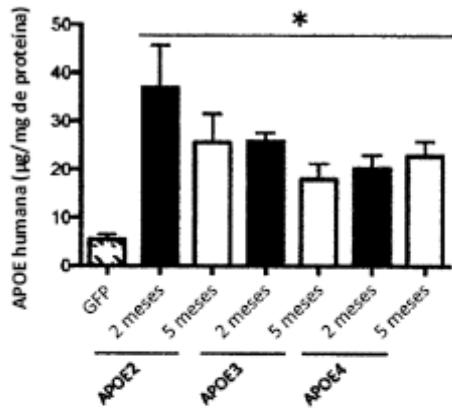


Figura 9B

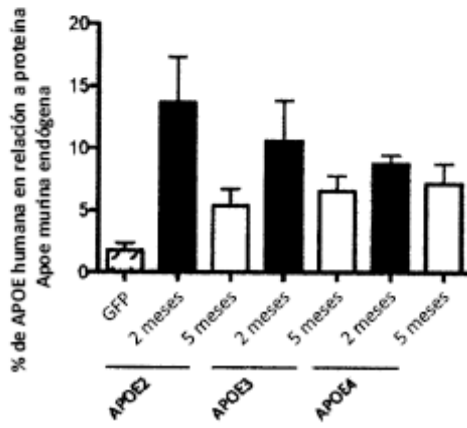


Figura 10A

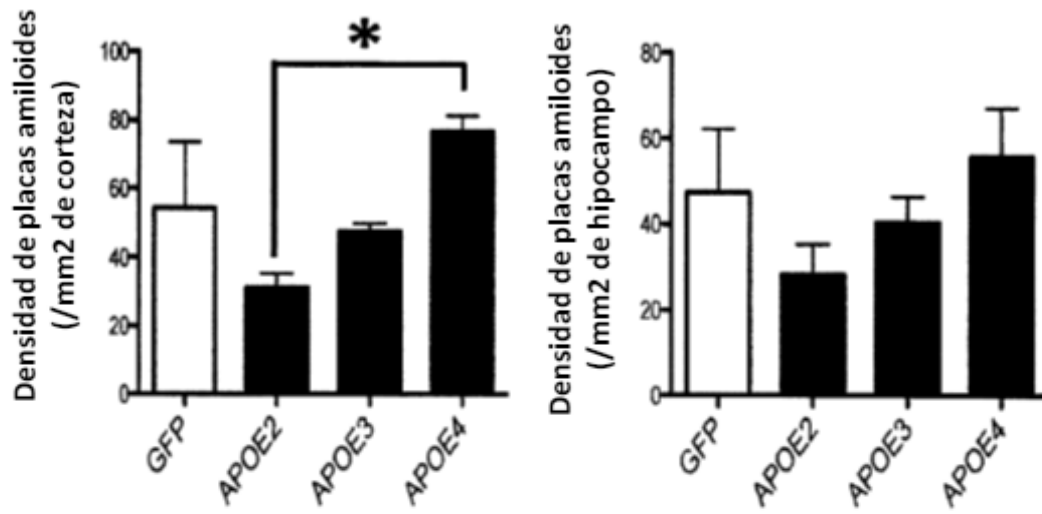


Figura 10B

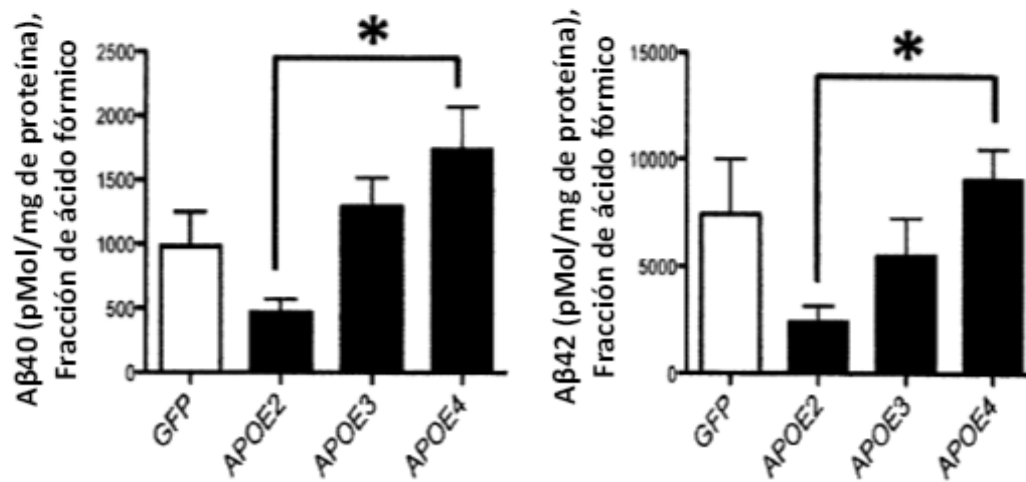


Figura 10C

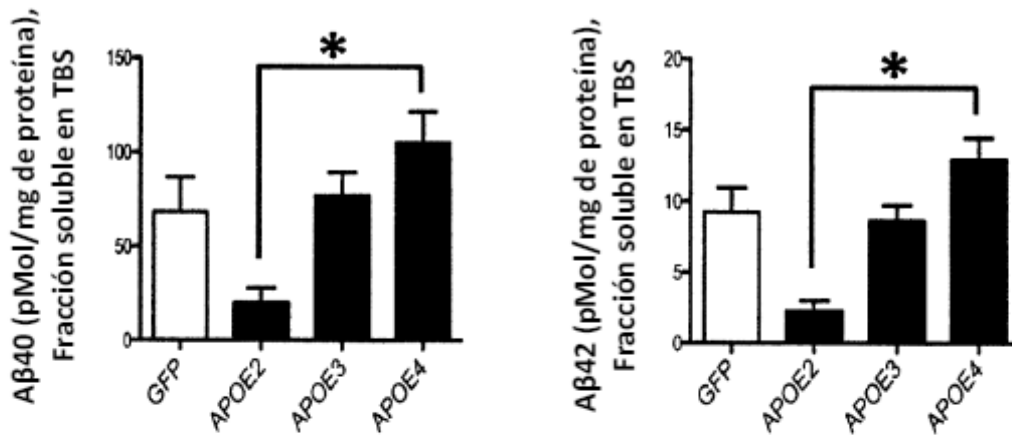


Figura 10D

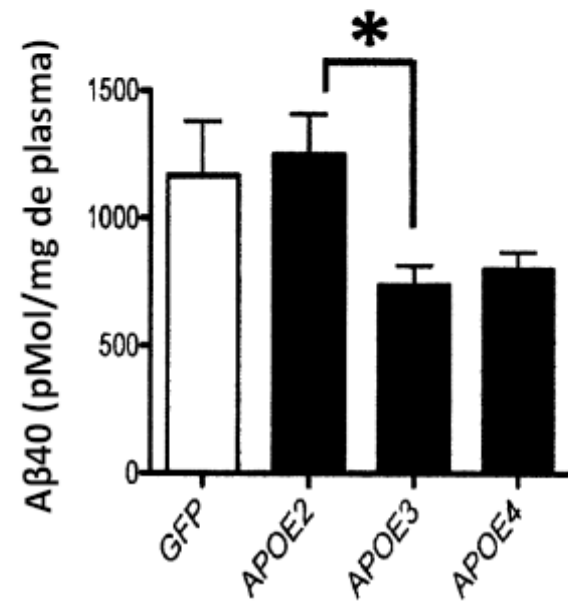




Figura 11A

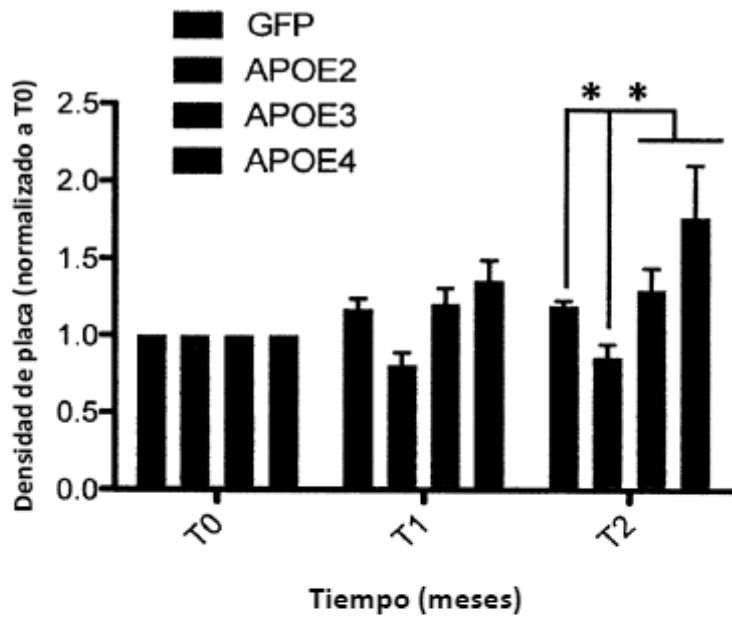


Figura 11B

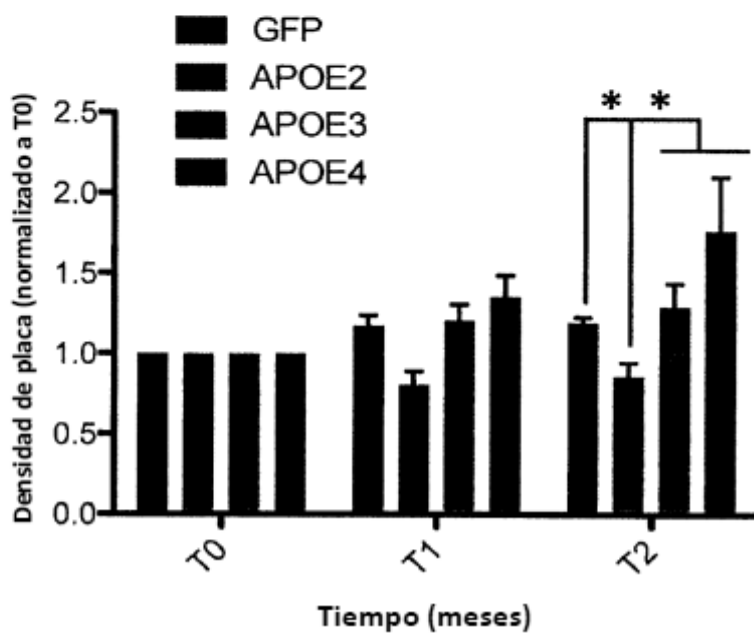


Figura 12

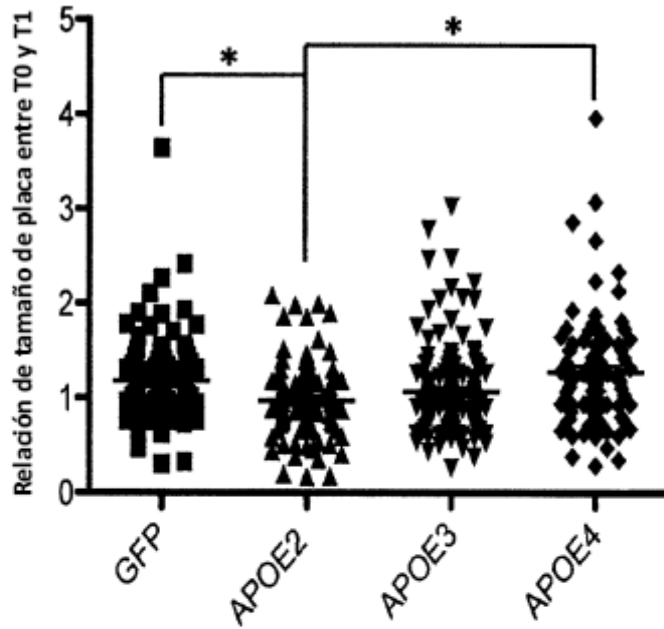


Figura 13A

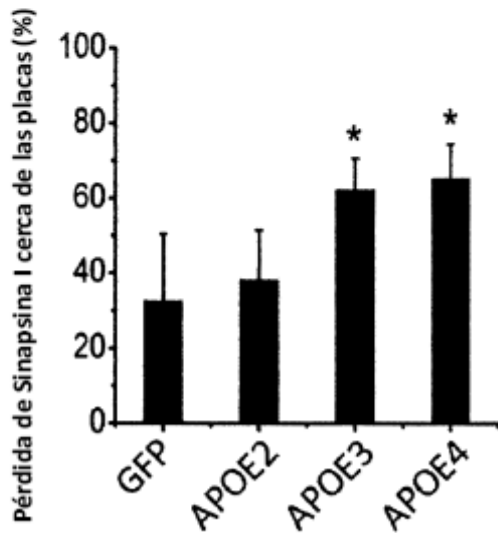


Figura 13B

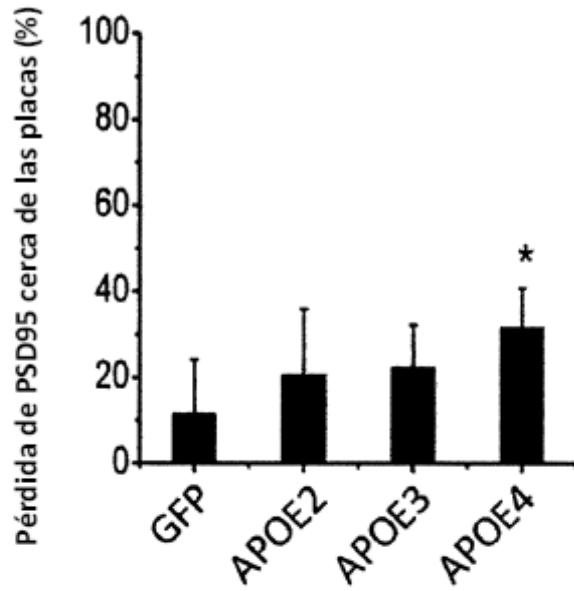


Figura 13D

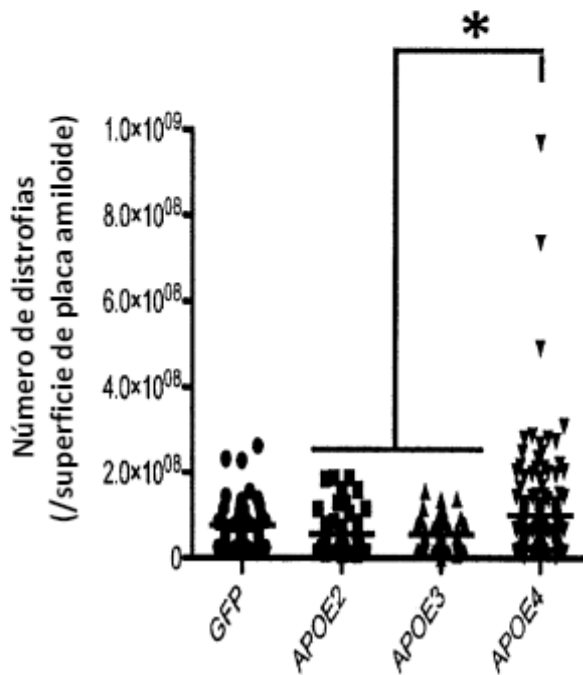


Figura 14

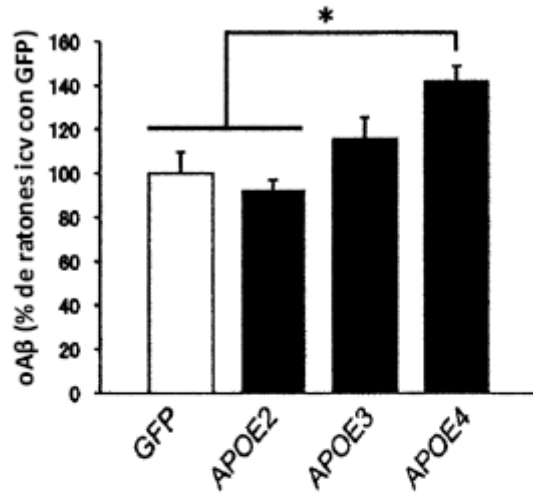


Figura 15A

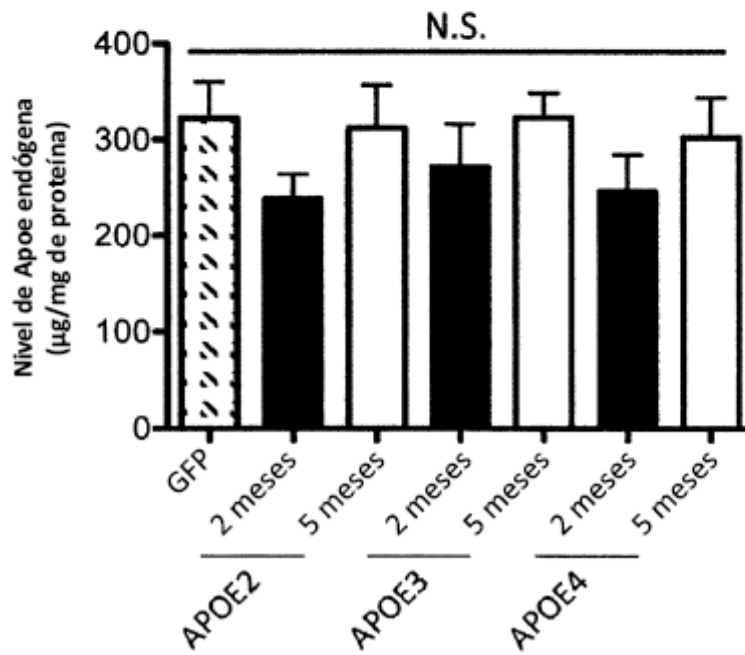


Figura 15B

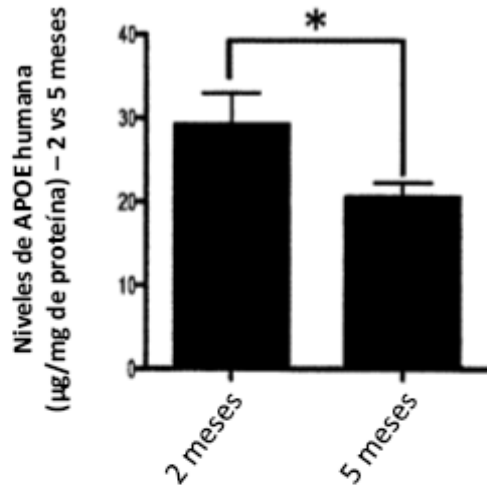


Figura 16A

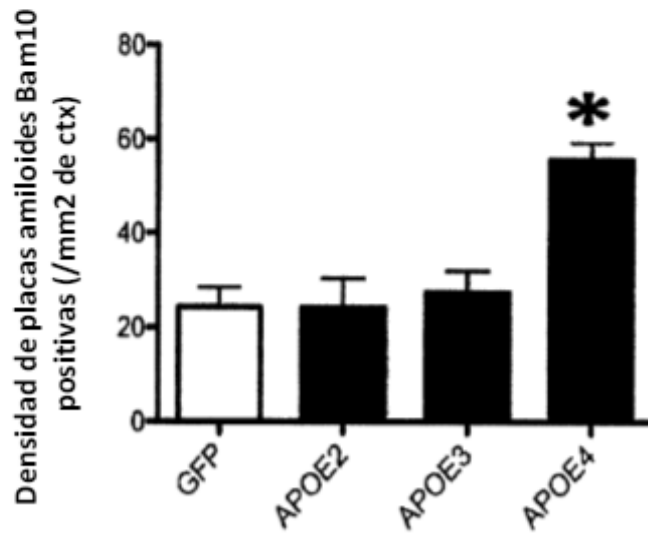


Figura 16B

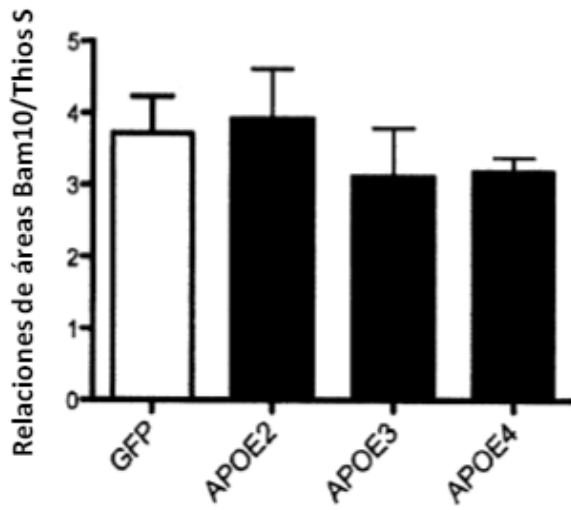


Figura 16C

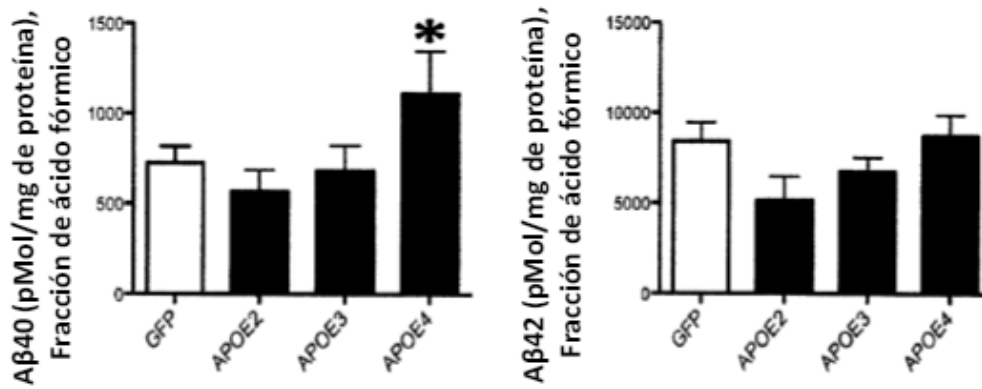


Figura 17A

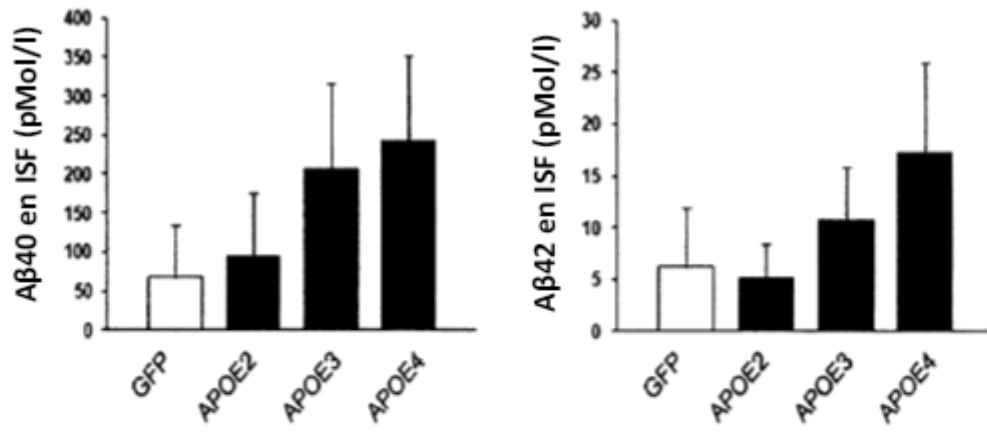


Figura 17B

