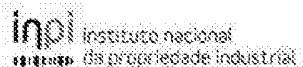

(11) Número de Publicação: **PT 2420256 T**



(51) Classificação Internacional:

A61K 48/00 (2016.01) **C12N 15/63** (2016.01)
C12N 15/74 (2016.01) **C12N 15/86** (2016.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2006.05.02**

(30) Prioridade(s): **2005.05.02 US 677057 P**
2005.05.31 US 685808 P

(43) Data de publicação do pedido: **2012.02.22**

(45) Data e BPI da concessão: **2016.06.22**
177/2016

(73) Titular(es):

GENZYME CORPORATION
500 KENDALL STREET CAMBRIDGE, MA 02142
US

(72) Inventor(es):

MARCO A. PASSINI US
JAMES DODGE US
STEWART, GREGORY R US

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **TERAPIA GENÉTICA PARA DISTÚRBOS NEUROMETABÓLICOS**

(57) Resumo:

A REVELAÇÃO DIZ RESPEITO A MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS QUE AFETAM O SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC). ESSES DISTÚRBIOS INCLUEM DISTÚRBIOS NEUROMETABÓLICOS TAIS COMO DOENÇAS DE ARMAZENAMENTO LISOSOMAL QUE AFETAM O SISTEMA NERVOSO CENTRAL, POR EXEMPLO A DOENÇA DE NIEMANN-PICK. INCLUEM TAMBÉM DISTÚRBIOS TAIS COMO A DOENÇA DE ALZHEIMER. OS MÉTODOS REVELADOS ENVOLVEM CONTACTAR UMA TERMINAÇÃO AXONAL DE UM NEURÓNIO COM UMA COMPOSIÇÃO CONTENDO UMA ELEVADA TITULAÇÃO DE AAV TRANSPORTANDO UM TRANSGENE TERAPÊUTICO, DE FORMA QUE O VETOR AAV SEJA TRANSPORTADO AXONALMENTE DE FORMA RETRÓGADA FAZENDO COM QUE O PRODUTO TRANSGÉNICO SEJA EXPRESSO DE FORMA DISTAL AO LOCAL DE ADMINISTRAÇÃO.

RESUMO

"TERAPIA GENÉTICA PARA DISTÚRBIOS NEUROMETABÓLICOS"

A revelação diz respeito a métodos e composições para o tratamento de distúrbios que afetam o sistema nervoso central (SNC). Esses distúrbios incluem distúrbios neurometabólicos tais como doenças de armazenamento lisossomal que afetam o sistema nervoso central, por exemplo a doença A de Niemann-Pick. Incluem também distúrbios tais como a doença de Alzheimer. Os métodos revelados envolvem contactar uma terminação axonal de um neurónio com uma composição contendo uma elevada titulação de AAV transportando um transgene terapêutico, de forma que o vetor AAV seja transportado axonalmente de forma retrógrada fazendo com que o produto transgénico seja expresso de forma distal ao local de administração.

DESCRIÇÃO

"TERAPIA GENÉTICA PARA DISTÚRBIOS NEUROMETABÓLICOS"

Este pedido reivindica prioridade sob Título 35, seção 119(e) do U.S.C ao pedido de patente provisório U.S. N° 60/677,057, depositado a 2 de maio de 2005, e pedido de patente provisório U.S. N° 60/685,808, depositado a 31 de maio de 2005.

Área da Invenção

A presente invenção diz respeito a composições e métodos para tratar distúrbios que afetam o sistema nervoso central (SNC) e em particular a medula espinal. A invenção diz ainda respeito a composições compreendendo vetores virais tais como vetores de vírus adeno-associados (AAV) e métodos para a sua administração.

Antecedentes da Invenção

Um grupo de distúrbios metabólicos conhecidos como doença de armazenamento lisossomal (LSD) inclui mais de quarenta distúrbios genéticos, muitos dos quais envolvem defeitos genéticos em várias hidrolases lisossomais. Doenças de armazenamento lisossomal representativas e as enzimas defeituosas associadas são listadas na Tabela 1.

Tabela 1

<i>Doença de armazenamento lisossomal</i>	<i>Enzima defeituosa</i>
Aspartilglucosaminuria	Aspartilglucosaminidase

Doença de armazenamento lisossomal	Enzima defeituosa
Fabry	α -Galactosidase A
Doença infantil de Batten* (CNL1)	Tioesterase da proteína palmitoíla
Doença Infantil de Batten clássica tardia* (CNL2)	Peptidase de tripeptidila
Doença juvenil de Batten* (CNL3)	Proteína de Transmembrana Lisossomal
Batten, outras formas* (CNL4-CNL8)	Produtos genéticos múltiplos
Cistinose	Transportador de cisteína
Farber	Ceramidase ácida
Fucosidose	α -L-fucosidase ácida
Galactosidosialidose	Proteína/catepsina A protetora
Tipos Gaucher 1, 2* e 3*	β -glucosidase, ou glucocerebrosidase ácida
Gangliosidose GM1*	B-galactosidase ácida
Hunter*	Iduronato-2-sulfatase
Hurler-Scheie*	α -L-Iduronidase
Krabbe*	Galactocerebrosidase
α -manosidose*	A-manosidase ácida
β -manosidose*	B-manosidase ácida
Maroteaux-Lamy	Arilsulfatase B
Leucodistrofia metacromática*	Arilsulfatase A

Doença de armazenamento lisossomal	Enzima defeituosa
Morquio A	Sulfatase N-acetilgalactosamina-6-sulfato
Morquio B	B-galactosidase ácida
Mucolipidose II/III*	N-acetilglucosamina-1-fosfotransferase
Niemann-Pick A*, B	Esfingomielinase ácida
Niemann-Pick C*	NPC-1
Pompe*	A-glucosidase ácida
Sandhoff*	β -Hexosaminidase B
Sanfilippo A*	Heparan N-sulfatase
Sanfilippo B*	α -N-Acetylglucosaminidase
Sanfilippo C*	Acetyl-CoA: α -glucosaminida N-acetyltransferase
Sanfilippo D*	Sulfatase N-Acetylglucosamina-6-sulfato
Doença de Schindler*	α -N-Acetylgalactosaminidase
Schindler-Kanzaki	α -N-Acetylgalactosaminidase
Sialidose	α -Neuramidase
Sly*	β -Glucuronidase
Tay-Sachs*	β -Hexosaminidase A
Wolman*	Lipase ácida
* envolvimento SNC	

A característica distintiva das LSD é a acumulação anormal de metabolitos nos lisossomas que conduz à formação de

grandes quantidades de lisossomas distendidos no pericário. Um grande desafio para tratar LSD (em vez de tratar uma enzimopatia específica do fígado) é a necessidade de reverter a patologia de armazenamento lisossomal em múltiplos tecidos separados. Algumas LSD podem ser tratadas com eficácia por infusão intravenosa da enzima em falta, conhecida como terapia de substituição de enzimas (ERT). Por exemplo, pacientes de Gaucher tipo 1 têm apenas doença visceral e respondem favoravelmente a ERT com glucocerebrosidase (Cerezyme®, Genzyme Corp.). Contudo, pacientes com doença metabólica que afeta o SNC (por exemplo, doença de Gaucher tipo 2 ou 3) não respondem a ERT intravenosa porque se evita que a enzima de substituição entre no cérebro pela barreira hematoencefálica (BBB). Além disso, tentativas de introduzir uma enzima de substituição no cérebro por injeção direta não têm tido sucesso em parte devido a citotoxicidade enzimática em elevadas concentrações locais (observações não publicadas) e taxas de difusão parenquimatosas limitadas (Pardridge, Peptide Drug Delivery to the Brain, Raven Press, 1991).

A doença de Alzheimer (AD) é um distúrbio que afeta o sistema nervoso central (SNC) caracterizado pela acumulação de peptídeo β -amilóide ($A\beta$) devido ao catabolismo reduzido de $A\beta$. À medida que se acumula $A\beta$, ele agraga-se em placas extracelulares, comprometendo a função sináptica e provocando a perda de neurónios. A patologia conduz à demência, perda de coordenação e à morte.

A terapia genética é uma modalidade de tratamento emergente para distúrbios afetando SNC, incluindo LSD e a doença de Alzheimer. Nesta abordagem, o restauro da via metabólica normal e reversão da patologia ocorre transduzindo células

afetadas com um vetor transportando uma versão saudável ou uma versão modificada do gene.

A terapia genética do SNC foi facilitada pelo desenvolvimento de vetores virais capazes de infetar efetivamente neurônios pós-mitóticos. Para uma revisão dos vetores virais para administração de genes ao SNC verDavidson et al. (2003) *Nature Rev.*, 4:353-364. Vetores de vírus adeno-associados (AAV) são considerados ótimos para terapia genética do SNC porque possuem um perfil favorável de toxicidade e imunogenicidade, são capazes de transduzir células neuronais e são capazes de mediar a expressão de longo prazo no SNC (Kaplitt et al. (1994) *Nat. Genet.*, 8:148-154; Bartlett et al. (1998) *Hum. Gene Ther.*, 9:1181-1186; e Passini et al. (2002) *J. Neurosci.*, 22:6437-6446).

Um produto transgene terapêutico, por exemplo uma enzima, pode ser segregado por células transduzidas e subsequentemente absorvida por outras células nas quais alivia então a patologia. Este processo é conhecido como uma correção cruzada (Neufeld et al. (1970) *Science*, 169:141-146). Contudo, a correção da patologia, tal como uma patologia de armazenamento no contexto de LSD, encontra-se tipicamente confinada à proximidade imediata do local da injeção por causa da difusão parenquimatosa limitada do vetor injetado e do produto transgénico segregado (Taylor et al. (1997) *Nat. Med.*, 3:771-774; Skorupa et al. (1999) *Exp. Neurol.*, 160:17-27). Assim, a neuropatologia afetando múltiplas regiões do cérebro requer administração de vetor ampla, usando múltiplas injeções distribuídas espacialmente, especialmente num cérebro grande como o humano. Isto aumenta significativamente o

risco de danos cerebrais. Para além disso, algumas regiões do cérebro podem ser de difícil acesso cirúrgico. Assim, outros modos de transporte de vetor dentro do SNC, para além de difusão, seriam benéficos.

Quando administrados em terminações axonais, alguns vírus internalizam-se e são transportados de forma retrógrada ao longo do axónio para o núcleo. Neurónios numa região do cérebro são interligados por axónios a regiões do cérebro distais providenciando assim um sistema de transporte para administração de vetores. Estudos com adenovírus HSV e vírus da pseudorraiva têm utilizado propriedades de tráfego destes vírus para administrar genes a estruturas distais no interior do cérebro (Soudas et al. (2001) FASEB J., 15:2283-2285; Breakefield et al. (1991) New Biol., 3:203-218; e deFalco et al. (2001) Science, 291:2608-2613).

Vários grupos têm relatado que a transdução do cérebro por serótipo AAV 2 (AAV2) é limitada pelo local de injeção intracraniana (Kaplitt et al. (1994) Nat. Genet., 8:148-154; Passini et al. (2002) J. Neurosci., 22:6437-6446; e Chamberlin et al. (1998) Brain Res., 793:169-175). Um relatório recente sugere que o transporte axonal retrógrado de AAV2 pode também ocorrer em circuitos selecionados do cérebro de rato normal (Kaspar et al. (2002) Mol. Ther., 5:50-56). Contudo, não se sabe que parâmetros específicos foram os responsáveis pelo transporte axonal observado e se ocorreria um transporte axonal eficaz e suficiente num neurónio doente em estado de disfunção celular. De facto, foi relatado que lesões observadas em neurónios LSD interferem com ou chegam mesmo a bloquear o transporte axonal (revisto em Walkley (1998) Brain Pathol., 8:175-

193), sugerindo que neurónios afetados pela doença não suportariam o tráfego de AAV ao longo dos seus axónios.

Como tal, há a necessidade na técnica de desenvolver novos métodos terapêuticos para tratar distúrbios metabólicos que afetam o SNC.

Resumo da Invenção

A invenção providencia uma composição compreendendo um vetor viral adeno-associado (AAV) que codifica uma molécula biologicamente ativa, em que o vetor AAV é um vetor de serótipo AAV2/7 ou AAV2/8, para utilização em um método de tratamento de uma doença de armazenamento lisossomal num mamífero, em que o método compreende a administração da composição num local de administração no sistema nervoso central do mamífero, em que o vetor transduz uma célula localizada num local distal no sistema nervoso central, e em que a molécula biologicamente ativa codificada é traduzida. Aspetos e formas de realização adicionais da invenção são apresentados nas reivindicações 2 a 17 em anexo.

A revelação providencia métodos e composições para o tratamento ou prevenção de distúrbios metabólicos tais como as doenças de armazenamento lisossomal (LSD) ou função anormal de armazenamento de colesterol, que se caracterizam por ou estão associados a um risco de diminuição da função do SNC.

A revelação providencia métodos e composições para o

tratamento ou prevenção de distúrbios que afetam o sistema nervoso central (SNC), tais como a doença de Alzheimer, que se caracterizam por ou estão associados a um risco de diminuição da função do SNC.

A revelação providencia ainda métodos para administração precisa minimamente invasiva de um transgene a regiões selecionadas no cérebro de um paciente afetado.

Vantagens adicionais da invenção serão apresentadas em parte na descrição que se segue e em parte serão dadas a entender pela descrição ou poderão ser aprendidas pondo em prática a invenção.

A murganhos com gene inativado para esfingomielinase ácida (ASM), um modelo da doença de Niemann-Pick tipo A, foi administrado um vetor AAV2 transportando o gene humano de ASM (AAV-ASM) por meio de uma única injeção intracraniana num hemisfério do cérebro. A presente invenção baseia-se, em parte, na descoberta e demonstração de que a injeção de titulação elevada de AAV-ASM no cérebro doente resulta em expressão de AAV-ASM dentro de múltiplos locais distais num padrão consistente com a organização topográfica dos neurónios de projeção que inervam o local de injeção. A invenção baseia-se ainda, em parte, na descoberta e demonstração de correção abrangente de patologia de armazenamento lisossomal no local de injeção e os locais distais para os quais AAV-ASM foi transportado e onde ASM foi expresso.

Num aspeto adicional, a revelação providencia um método para correção da patologia de armazenamento de colesterol e iniciar a recuperação funcional no murganho ASMKO após

injeção unilateral ou, alternativamente, bilateral nos núcleos cerebelares profundos.

São adicionalmente providenciados os métodos mencionados acima em que o transgene é administrado em um vetor AAV recombinante selecionado do grupo consistindo dos serótipos AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 e AAV2/8. A título de ilustração apenas, os vetores recombinantes codificaram a proteína ASM humana funcional em um modelo de murganho.

Em conformidade, em um aspeto, a presente revelação providencia métodos para o tratamento de distúrbios neurometabólicos em mamíferos. As populações tratadas pelos métodos da revelação incluem, mas não se limitam a, pacientes tendo ou em risco de desenvolver uma LSD, tais como os distúrbios listados na Tabela 1, em particular se tal doença afetar o SNC. Numa forma de realização ilustrativa, a doença é a doença A de Niemann-Pick e/ou a patologia secundária de armazenamento de colesterol comumente associada com NPA.

Em um aspeto, os métodos revelados incluem a administração ao SNC de um paciente afetado de um vetor viral AAV transportando um transgene codificando um produto terapêutico e permitindo que o transgene seja expresso dentro do SNC distalmente ao local de administração num nível terapêutico. Além disso, o vetor pode compreender um polinucleotídeo que codifica uma molécula biologicamente ativa eficaz no tratamento do distúrbio do SNC. Tais moléculas biologicamente ativas podem compreender peptídeos incluindo, mas sem limitação, versões nativas ou mutadas de proteínas de comprimento total, versões nativas ou mutadas de fragmentos proteicos, polipeptídeos sintéticos,

anticorpos, e fragmentos de anticorpos tais como moléculas Fab'. As moléculas biologicamente ativas podem também compreender nucleotídeos incluindo polinucleotídeos de DNA de fita simples ou fita dupla e polinucleotídeos de RNA de fita simples ou fita dupla. Para uma revisão de tecnologias de nucleotídeos exemplificativas que podem ser usadas na prática dos métodos revelados no presente documento, ver Kurreck (2003) J., Eur. J. Biochem. 270, 1628-1644 [antisense technologies]; Yu et al., (2002) PNAS 99(9), 6047-6052 [RNA interference technologies]; e Elbashir et al., (2001) Genes Dev., 15(2):188-200 [siRNA technology].

Numa forma de realização, a administração é feita por injeção intraparenquimatosa direta de uma solução de vetor AAV de titulação elevada no cérebro doente. Como tal, o transgene é expresso distalmente, contralateralmente ou ipsilateralmente em relação ao local de administração num nível terapêutico a pelo menos 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 mm do local de administração.

Em outro aspeto, a revelação também providencia um método de administração de um genoma AAV recombinante ao núcleo de um neurónio afetado pela doença *in vivo*. Em algumas formas de realização, a patologia celular exibida pelo neurónio é a de uma doença de armazenamento lisossomal tais como os distúrbios listados na Tabela 1. Numa forma de realização ilustrativa, a doença é a doença A de Niemann-Pick. Em outras formas de realização, a patologia celular exibida é aquela da doença de Alzheimer. O método de administração de um genoma AAV recombinante ao núcleo de um neurónio afetado pela doença comprehende contactar uma terminação axonal do neurónio afetado pela doença com uma composição comprehendendo uma partícula viral AAV comprehendendo o

genoma AAV recombinante e permitindo que a partícula viral seja endocitada e transportada de forma retrógrada intracelularmente ao longo do axónio para o núcleo do neurónio. A concentração do vetor na composição é pelo menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, ou 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ou 50 ($\times 10^9$ tu/ml); ou (c) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ou 50 ($\times 10^{10}$ iu/ml). Em certas formas de realização, o neurónio é um neurónio de projeção e/ou a distância da terminação axonal para o núcleo do neurónio é pelo menos 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 mm.

A presente revelação providencia métodos e composições para administração de um transgene à medula espinal e/ou à região de tronco cerebral de um paciente por administração de um vetor viral neurotrópico recombinante contendo o transgene a pelo menos uma região dos núcleos cerebelares profundos (DCN) do cérebro do paciente. A administração viral ocorre em condições que favorecem a expressão do transgene na medula espinal e/ou na região do tronco cerebral. Numa forma de realização ilustrativa, a doença é a doença A de Niemann-Pick. Em outras formas de realização, a patologia celular exibida é aquela da doença de Alzheimer.

Em outro aspeto, a revelação providencia métodos e composições para administração de um transgene à medula espinal de um paciente por administração de um vetor viral neurotrópico recombinante contendo o transgene à região do córtex motor do cérebro do paciente. A administração do vetor viral ocorre em condições que favorecem a expressão do transgene na medula espinal. Os vetores virais administrados à região do córtex motor são internalizados

por neurónios motores através de sua região de corpo celular e o transgene é expresso. O transgene expresso pode ser então transportado de forma anterógrada até a porção terminal axonal do neurónio motor, que está presente na medula espinal. Devido à natureza do córtex motor, os vetores virais administrados nessa região do cérebro podem ser também internalizados por terminais axonais de neurónios motores. O vetor viral pode ser também transportado de forma retrógrada ao longo do axónio do neurónio motor e ser expresso no corpo celular do neurónio motor. Numa forma de realização ilustrativa, a doença é a doença A de Niemann-Pick. Em outras formas de realização, a patologia celular exibida é aquela da doença de Alzheimer.

Em outro aspeto, a revelação providencia um método de administração de um produto transgene terapêutico a uma célula alvo do SNC, que é um neurónio ou uma célula glial num mamífero afetado por um distúrbio neurometabólico, por exemplo uma LSD que afeta o SNC. O método inclui contactar uma terminação axonal de um neurónio com uma composição contendo um vetor AAV transportando pelo menos uma parte de um gene codificando um produto de transgene terapêutico, permitindo que a partícula viral seja endocitada e transportada ade forma retrógrada intracelularmente ao longo do axónio para o núcleo do neurónio, permitindo que o produto de transgene terapêutico seja expresso e segregado pelo neurónio e permitindo que a célula alvo absorva o produto de transgene terapêutico, pelo que o produto de transgene terapêutico alivia assim a patologia na célula alvo. Em certas formas de realização, a concentração do vetor na composição é pelo menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, ou 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8,

8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ou 50 ($\times 10^9$ tu/mi); ou (c) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ou 50 ($\times 10^{10}$ iu/ml).

Nos métodos da revelação, o transgene terapêutico codifica uma molécula biologicamente ativa, cuja expressão no SNC resulta em pelo menos correção parcial da neuropatologia. Em algumas formas de realização, o produto de transgene terapêutico é uma hidrolase lisossomal. Numa forma de realização ilustrativa, a hidrolase lisossomal é ASM. Em outras formas de realização, o transgene terapêutico é uma metaloendopeptidase, por exemplo neprilisina.

Deve ser entendido que tanto a precedente descrição geral como a descrição detalhada que se segue são apresentadas apenas a título de exemplo e de explicação e não são restritivas da invenção como reivindicada.

Breve Descrição das Figuras

A Figura 1A mostra uma representação de um corte transversal do cérebro de murganho ASMKO, 5 ou 15 semanas a seguir a uma injeção de 2 μ l de AAV-ASM de titulação elevada ($9,3 \times 10^{12}$ gp/ml) no hipocampo. O local da injeção é mostrado por uma linha vertical; a expressão de mRNA de ASM, como detetada por hibridização *in situ*, é representada círculos mais pequenos; e a expressão de proteína ASM, como detetada por coloração imunohistoquímica, é representada pelos círculos maiores sombreados. O padrão de expressão resultou numa área abrangente de reversão de patologia (representada pelo sombreado claro) no hipocampo e em regiões corticais em ambos os hemisférios do cérebro.

A Figura 1B mostra o transporte axonal de AAV para regiões distais do cérebro do murganho a seguir a uma injeção AAV de titulação elevada no hipocampo como descrito pela Figura 1A. A injeção no hipocampo (10) resultou em transporte axonal do vetor viral através do circuito intrahipocampal para o hipocampo contralateral (20) e através do circuito entorrinodenteado para o córtex entorrinal (30). O local de injeção é mostrado por uma linha vertical.

A Figura 1C é um diagrama esquemático mostrando as ligações do intrahipocampo e circuitos entorrinodenteados do cérebro do rato. A injeção no hipocampo (10) resulta em infecção e transdução de corpos celulares localizados na área do cornu ammonis 3 (CA3) e na camada celular granular do denteado (G). Para além disso, um subconjunto do vetor AAV injetado infeta as terminações axonais dos neurónios de projeção inervando o local de injeção, é submetido a transporte axonal retrógrado e administra o transgene ao campo CA3 (CA3) e hilo (H) na parte contralateral do hipocampo (20) e ipsilateralmente no córtex entorrinal (30).

A Figura 2A mostra uma representação de um corte transversal do cérebro do murganho ASMKO 5 ou 15 semanas a seguir a uma injeção intrahipocampal de AAV-ASM de titulação elevada como descrito na Figura 1A. A expressão de mRNA de ASM, como detetada por hibridização *in situ*, é representada pelos círculos mais pequenos; e a expressão de proteína de ASM, como detetada por coloração imunohistoquímica, é representada pelos círculos maiores sombreados. A injeção resultou em proteína e mRNA de ASM sendo detetadas no septo. Este padrão de expressão resultou numa área abrangente de reversão de patologia (representada pelo sombreado claro).

A Figura 2B mostra o transporte axonal de AAV para regiões distais do cérebro do murganho a seguir a uma injeção de titulação elevada no hipocampo como descrito pela Figura 1A. A injeção no hipocampo (10) resultou em transporte axonal do vetor viral através do circuito septohipocampal do local da injeção (representado por uma linha vertical) para o septo (40).

A Figura 2C é um diagrama esquemático mostrando as ligações do circuito septohipocampal. A injeção no hipocampo resultou em transdução para corpos celulares localizados no campo CA3 (11). Para além disso, um subconjunto do vetor AAV infeta as terminações axonais dos neurónios de projeção inervando o local de injeção, é submetido a transporte axonal retrógrado e administra o transgene ao septo mediano (40).

A Figura 3 mostra o transporte axonal de AAV no circuito nigroestriado a seguir a injeção de titulação elevada de AAV no corpo estriado (50) do cérebro do rato. O transporte axonal de AAV ocorre do local de injeção (representado por uma linha vertical) à substância negra (60).

A Figura 4 mostra o transporte axonal de AAV no circuito medulocerebelar a seguir a injeção de titulação elevada de AAV no corpo estriado (70) do cérebro do murganho ASMKO. O transporte axonal de AAV2 ocorre do local de injeção (representado por uma linha vertical) até à medula oblonga (80).

A Figura 5 mostra o transporte axonal de AAV nos circuitos intrahipocampais, nigroestriados e entorrinodenteados a

seguir a injeção de elevada titulação de AAV7-ASM no hipocampo ipsilateral (10). Foram detetadas células transduzidas, como determinado por hibridização *in situ*, ao longo de todo o eixo rostral-caudal do hipocampo contralateral (90), septo mediano (40) e córtex entorrinal (100) após injeção de AAV7-ASM do hipocampo ipsilateral (representado por uma linha vertical).

As Figuras 6A a 6E mostram a marcação imunopositiva para ASM humana em cortes cerebelares sagitais após injeção de diferentes vetores de serótipos de AAV [(A)2/1, (B)2/2, (C)2/5, (D)2/7 e (E)2/8] que codificam a ASM humana nos núcleos cerebelares profundos de murganhos ASMKO.

As Figuras 7A a 7E demonstram o transporte de hASM até a medula espinal a partir dos núcleos cerebelares profundos. Esse efeito foi observado em murganhos tratados com AAV2/2-ASM, AAV2/5-ASM, AAV2/7-ASM e AAV2/8-ASM (A) hASM aumento de 10X; (B) hASM aumento de 40X; (C) hASM confocal; (D) ChAT confocal; e (E) hASM e ChAT confocal.

A Figura 8 mostra os níveis de homogenatos de tecido cerebelar após injeção de diferentes vetores de serótipos de AAV (2/1, 2/2, 2/5, 2/7 e 2/8) que codificam a ASM humana nos núcleos cerebelares profundos ($n=5$ /grupo). Os grupos não associados pela mesma letra são significativamente diferentes ($p<0,0001$).

As Figuras 9A a G mostram a marcação imunopositiva para calbindina em cortes cerebelares sagitais após injeção de diferentes vetores de serótipos de AAV [(A)2/1, (B)2/2, (C)2/5, (D)2/7 e (E)2/8] que codificam a ASM humana nos núcleos cerebelares profundos de murganhos ASMKO.

As Figuras 10A e 10B mostram o desempenho com aceleração e oscilação de barra rotatória (rotarod) (em 14 semanas de idade) em murganhos ASMKO (injetados com AAV- β gal), de tipo selvagem (WT) e ASMKO tratados com AAV-ASM ($n=8$ /grupo). Os grupos não associados pela mesma letra são significativamente diferentes. Os murganhos injetados com AAV2/1-ASM e AAV2/8-ASM demonstraram uma latência significativamente maior ($p<0,0009$) para cair do que murganhos ASMKO injetados com AAV2/1- β gal no teste de aceleração de barra rotatória. No caso do teste de oscilação da barra rotatória, os murganhos injetados com AA2/1-ASM demonstraram uma latência significativamente maior ($p<0,0001$) para cair do que murganhos injetados com AAV2/1- β gal.

As Figuras 11A e 11B mostram o desempenho em barra rotatória (rotarod) de murganhos ASMKO ($n=8$), de tipo selvagem (WT) ($n=8$) e tratados bilateralmente com AAV-ASM ($n=5$ /grupo) (com 20 semanas de idade). Em ambos os testes de aceleração e oscilação, os murganhos tratados com AAV-ASM tiveram desempenho significativamente melhor ($p<0,001$) do que murganhos ASMKO tratados com AAV2/1- β gal. O desempenho de murganhos injetados com AAV2/1-ASM era indistinguível daquele dos murganhos de tipo selvagem em ambos os testes de aceleração e oscilação.

A Figura 12 mostra os níveis cerebrais de esfingomielina (em 20 semanas de idade) em murganhos ASMKO injetados bilateralmente com AAV1- β gal ou com os serótipos 1 e 2 de AAV codificando hASM. Os cérebros foram divididos em 5 cortes rostrocaudais (S1=mais rostral e S5=mais caudal). Um

asterisco indica que o ponto de dados é significativamente diferente de murganhos ASMKO ($p<0,01$).

A Figura 13A ilustra as conexões entre as regiões dos núcleos cerebelares profundos (medial, intermediária e lateral) e as regiões da medula espinal (cervical, torácica, lombar e sacral). **A Figura 13B** ilustra as conexões entre as regiões dos núcleos cerebelares profundos (medial, intermediária e lateral) e as regiões do tronco cerebral (mesencéfalo, ponte de Varólio e medula oblonga). As conexões são representadas por setas que começam na região do corpo celular de um neurónio e terminam na região terminal axonal do neurónio. Por exemplo, cada uma das três regiões do DCN possui neurónios com corpos celulares que projetam axónios que terminam na região cervical da medula espinal enquanto a região cervical da medula espinal possui corpos celulares que projetam axónios que terminam na região medial ou intermediária do DCN.

A Figura 14 ilustra a distribuição de proteína verde fluorescente no tronco cerebral, ou neurónios motores superiores, após administração ao DCN de AAV codificando a proteína verde fluorescente (GFP).

A Figura 15 ilustra a distribuição de proteína verde fluorescente nas regiões de medula espinal após administração ao DCN de AAV codificando a proteína verde fluorescente (GFP).

A Figura 16 mostra a distribuição de GFP no cérebro de murganho após administração bilateral de um vetor AAV1 de expressão de GFP aos núcleos cerebelares profundos (DCN). Além de no DCN, foi também observada marcação positiva para

GFP nos bulbos olfatórios, córtex cerebral, tálamo, tronco cerebral, córtex cerebelar e medula espinal. Todas essas regiões recebem projeções de e/ou enviam projeções para o DCN.

Descrição Detalhada da Invenção

Para que a presente invenção possa ser mais facilmente compreendida, alguns termos são definidos em primeiro lugar. Definições adicionais são apresentadas ao longo da descrição detalhada.

O termo "transgene" refere-se a um polinucleotídeo que é introduzido numa célula e que é capaz de ser traduzido e/ou expresso sob condições apropriadas, conferindo uma propriedade desejada a uma célula na qual foi introduzido ou conduzindo de outra forma a um efeito terapêutico desejado.

Os termos "partículas de genoma (gp)" ou "equivalentes de genoma" como usados em referência a uma titulação viral, referem-se ao número de vírions contendo o genoma de DNA de AAV recombinante, independentemente da infetividade ou funcionalidade. O número de partículas de genoma numa preparação de vetor particular pode ser medido por procedimentos tais como descritos nos Exemplos aqui apresentados ou, por exemplo, em Clark et al. (1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) Mol. Ther., 6:272-278.

Os termos "unidade de infecção (iu)," "partícula infeciosa" ou "unidade de replicação" como usados em referência a um título viral, referem-se ao número de partículas de vetor

AAV recombinantes infeciosas e competentes em relação a replicação como medido por ensaio central infecioso, também conhecido como ensaio central de replicação, como descrito, por exemplo, em McLaughlin et al. (1988) J. Virol., 62:1963-1973.

O termo "unidade de transdução (tu)" como usado em referência a uma titulação viral, refere-se ao número de partículas de vetor AAV recombinantes infeciosas que resultam na produção de um produto transgene funcional como medido em ensaios funcionais como os descritos em Exemplos aqui apresentados ou, por exemplo, em Xiao et al. (1997) Exp. Neurobiol., 144:113-124; ou em Fisher et al. (1996) J. Virol., 70:520-532 (ensaio LFU).

Os termos "terapêutico", "quantidade terapeuticamente eficaz" e seus cognatos referem-se à quantidade de um composto que resulta na prevenção, ou atraso do início, ou melhoria de sintomas de num paciente ou um alcançar de um efeito biológico desejado, tal como correção de neuropatologia, por exemplo patologia celular associada a uma doença de armazenamento lisossomal tal como descrita aqui ou em Walkley (1998) Brain Pathol., 8:175-193. O termo "correção terapêutica" refere-se ao grau de correção que resulta na prevenção ou atraso do início ou melhoria dos sintomas num paciente. A quantidade eficaz pode ser determinada por métodos bem conhecidos na técnica e como descrito nas secções subsequentes.

Métodos e Composições

Murganhos ASMKO são um modelo aceite de doença de Niemann-Pick de tipo A e B (Horinouchi et al. (1995) Nat. Genetics,

10:288-293; Jin et al. (2002) *J. Clin. Invest.*, 109:1183-1191; e Otterbach (1995) *Cell*, 81:1053-1061). A doença de Niemann-Pick (NPD) é classificada como uma doença de armazenamento lisossomal e é um distúrbio neurometabólico herdado caracterizado por uma deficiência genética em esfingomielinase ácida (ASM; colinafosfohidrolase esfingomielina, EC 3.1.3.12). A falta de proteína ASM funcional resulta na acumulação de substrato de esfingomielina dentro das lisossomas de neurónios e glias ao longo do cérebro. Isto leva à formação de um grande número de lisossomas distendidas no pericário que são uma característica distintiva e o fenótipo celular primário de NPD de tipo A. A presença de lisossomas distendidas correlaciona-se com a perda de função celular normal e com um curso neurodegenerativo progressivo que conduz à morte do indivíduo afetado na primeira infância (*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, eds. Scriver et al., McGraw-Hill, Nova Iorque, 2001, pág. 3589-3610). Fenótipos celulares secundários (por exemplo, anormalidade metabólicas adicionais) são também associados a esta doença, em particular a acumulação de alto nível de colesterol no compartimento lisossomal. A esfingomielina tem forte afinidade com o colesterol, que resulta no sequestro de grandes quantidades de colesterol nos lisossomas de murganhos ASMKO e pacientes humanos (Leventhal et al. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276:44976-44983; Slotte (1997) *Subcell. Biochem.*, 28:277-293; e Viana et la. (1990) *J. Med. Genet.*, 27:499-504.)

A presente invenção baseia-se, em parte, na descoberta e demonstração de que uma injeção intrahipocampal de titulação elevada de AAV-ASM nos cérebros doentes de murganhos ASMKO resulta em expressão de proteína e mRNA de

ASM distalmente ao local de injeção num padrão consistente com a organização topográfica dos neurónios de projeção que inervam o local de injeção. Para além da expressão robusta no local de injeção, proteína e mRNA de ASM também são detetados em várias regiões distais fora do hipocampo ipsilateral (injetado), especificamente na circunvolução dentada hipocampal contralateral e CA3 e no septo mediano e córtex entorrinal. A invenção baseia-se ainda, em parte, na descoberta e demonstração de correção abrangente de patologia de armazenamento lisossomal nos locais distais permitindo assim um maior volume de correção através de um número mais pequeno de locais de injeção.

Em conformidade, em um aspeto, a presente revelação providencia métodos para o tratamento de distúrbios neurometabólicos em mamíferos. As populações tratadas pelos métodos da invenção incluem, mas não se limitam a, pacientes tendo ou em risco de desenvolver um distúrbio neurometabólico, por exemplo uma LSD, tais como as doenças listadas na Tabela 1, em particular se uma tal doença afetar o SNC. Numa forma de realização ilustrativa, a doença é a doença de Niemann-Pick de tipo A. Em certas formas de realização, distúrbios neurometabólicos podem excluir as doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington, Tay Sachs, Lesch-Nyan e Creutzfeldt-Jakob. Contudo, métodos da revelação utilizando uma metaloendopeptidase como um transgene terapêutico são especificamente úteis ao tratamento da doença de Alzheimer e distúrbios relacionados com amilóide.

Em algumas formas de realização, o método de tratamento de um distúrbio neurometabólico compreende a administração de um vetor AAV de titulação elevada transportando um

transgene terapêutico de forma que o produto transgene seja expresso num nível terapêutico num segundo local dentro do SNC distal ao primeiro local. Em algumas formas de realização, a titulação viral da composição é pelo menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, ou 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ou 50 ($\times 10^9$ tu/ml); ou (c) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ou 50 ($\times 10^{10}$ iu/ml). Em outras formas de realização, a administração é alcançada por injeção intraparenquimatosa direta de uma solução de vetor AAV de titulação elevada no cérebro doente, sendo depois disso o transgene expresso distalmente, contralateralmente ou ipsilateralmente em relação ao local de administração num nível terapêutico a pelo menos 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 mm do local de administração.

A distância entre o primeiro e segundo locais é definida como a região de distância mínima entre o local de administração (primeiro local) e o limite da transdução detetável do local distal (segundo local) como medido usando procedimentos conhecidos na técnica ou como descritos nos Exemplos, por exemplo, hibridização *in situ*. Alguns neurónios no SNC de mamíferos de maior porte podem cobrir grandes distâncias em virtude das suas projeções axonais. Por exemplo, em humanos, alguns axónios podem cobrir uma distância de 1000 mm ou superior. Assim, em vários métodos da invenção, AAV pode ser axonalmente transportado ao longo de todo o comprimento do axónio numa tal distância que permita alcançar e transduzir o corpo celular principal.

Um local de administração de vetor dentro do SNC é selecionado com base na região alvo desejada de

neuropatologia e a topologia de circuitos cerebrais envolvidos desde que um local de administração e a região alvo tenha ligações axonais. A região alvo pode ser definida, por exemplo, usando coordenadas estereotáxicas 3D. Em algumas formas de realização, o local de administração é selecionado de forma que pelo menos 0,1, 0,5, 1, 5, ou 10 % da quantidade total do vetor injetado seja administrada distalmente na região alvo a pelo menos 1, 200, 500, ou 1000 mm³. Um local de administração pode estar localizado numa região inervada por neurónios de projeção ligando regiões distais do cérebro. Por exemplo, a substância negra e área tegmental bventral enviam projeções densas ao caudado e putamen (conhecidos coletivamente como o corpo estriado). Neurónios dentro da substância negra e do tegmento ventral podem ser direcionados para transdução por transporte retrógrado de AAV, a seguir a injeção no corpo estriado. Como outro exemplo, o hipocampo recebe projeções axonais previsíveis bem-definidas de outras regiões do cérebro. Outros locais de administração podem ser localizados, por exemplo, na medula espinal, tronco cerebral (medula oblonga e ponte de Varólio), mesencéfalo, cerebelo (incluindo os núcleos cerebelares profundos), diencéfalo (tálamo, hipotálamo), telencéfalo (corpo estriado, córtex cerebral ou dentro do córtex, os lobos occipitais, temporais, parietais ou frontais) ou suas combinações.

Para identificação de estruturas no cérebro humano, ver, por exemplo, The Human Brain: Surface, Three-Dimensional Sectional Anatomy With MRI, and Blood Supply, 2^a ed., eds. Deuterón et al., Springer Vela, 1999; Atlas of the Human Brain, eds. Mai et al., Academic Press; 1997; e Co-Planar Sterotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional

Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging, eds. Tamarack et al., Thyme Medical Pub., 1988. Para identificação de estruturas no cérebro dos murganhos, ver, por exemplo, The Mouse Brain in Sterotaxic Coordinates, 2^a ed., Academic Press, 2000. Se desejado, a estrutura do cérebro humano pode ser correlacionada com estruturas semelhantes no cérebro de outro mamífero. Por exemplo, a maior parte dos mamíferos, incluindo humanos e roedores, apresenta uma organização topográfica semelhante das projeções entorrinal-hipocampo, com neurónios na parte lateral do córtex entorrinal lateral e mediano projetando-se para a parte dorsal ou pólo septal do hipocampo, enquanto a projeção para o hipocampo ventral é principalmente originária de neurónios nas partes medianas do córtex entorrinal (Principles of Neural Science, 4^a ed., eds Kandel et al., McGraw-Hill, 1991; The Rat Nervous System, 2^a ed., ed. Paxinos, Academic Press, 1995). Para além disso, as células da camada II do córtex entorrinal projetam-se para o giro denteadoo, e terminam nos dois terços exteriores da camada molecular do giro dental. Os axónios das células da camada III projetam-se bilateralmente às áreas do cornu ammonis CA1 e CA3 do hipocampo, terminando na camada molecular de estrato da lacunose .

O segundo (alvo) local pode estar localizado em qualquer região do SNC, incluindo o cérebro e a espinhal medula que contenha um neurónios que se projetam para ao primeiro local (administração). Em algumas formas de realização, o segundo local está numa região do SNC selecionada de entre a substância negra, medula oblonga ou espinhal medula.

Para administrar o vetor especificamente a uma região

particular do sistema nervoso central, especificamente a uma região particular do cérebro, este pode ser administrado por microinjeção estereotáxica. Por exemplo, no dia da cirurgia, os pacientes terão a base da estrutura estereotáxica fixa no local (aparafusada no crânio). O cérebro com base de estrutura estereotáxica (compatível com MRI com marcações fiduciárias) será representado em imagem usando MRI de alta resolução. As imagens MRI serão então transferidas para um computador que utiliza software estereotáxico. Serão usadas uma série de imagens coronais, sagitais e axiais para determinar o local alvo da injeção do vetor e a trajetória. O software traduz diretamente a trajetória em coordenadas tridimensionais apropriadas para a estrutura estereotáxica. São perfurados orifícios de trepanação acima do local de entrada e o aparelho estereotáxico localizado com a agulha é implantado à profundidade indicada. O vetor num portador farmaceuticamente aceitável será então injetado. O vetor AAV é então administrado por injeção direta no local do alvo primário e transportado de forma retrógrada para locais de alvos distais através dos axônios. Podem ser usadas vias de administração adicionais, por exemplo aplicação cortical superficial sob visualização direta ou outra aplicação não estereotáxica.

O volume total de material a ser administrado e o número total de partículas de vetor a serem administradas serão determinados pelos entendidos na técnica com base em aspectos conhecidos da terapia genética. A eficácia terapêutica e a segurança podem ser testadas num modelo animal apropriado. Por exemplo, existem vários modelos animais bem caracterizados para LSD, por exemplo como descrito em Watson et al. (2001) Methods Mol. Med., 76:383-

403; ou Jeyakumar et al. (2002) *Neuropath. Appl. Neurobiol.*, 28:343-357.

Em murganhos de laboratório, o volume total de solução AAV injetada é, por exemplo, entre 1 a 5 µl. Para outros mamíferos, incluindo o cérebro humano, os volumes e taxas de administração são escalados de forma apropriada. Por exemplo, foi demonstrado que volumes de 150 µl podem ser injetados com segurança no cérebro de um primata (Janson et al. (2002) *Hum. Gene Ther.*, 13:1391-1412). O tratamento pode consistir numa única injeção por local alvo, ou pode ser repetido ao longo do trato de injeção, se necessário. Podem ser usados vários locais de injeção. Por exemplo, em algumas formas de realização, para além do primeiro local de administração, uma composição compreendendo AAV transportando um transgene é administrada a outro local que pode ser contralateral ou ipsilateral em relação ao primeiro local de administração.

Noutro aspeto, a revelação providencia um método de administração de um genoma AAV recombinante, através de transporte axonal retrógrado, ao núcleo de um neurónio afetado pela doença *in vivo*. Em algumas formas de realização, a patologia celular exibida por um neurónio é a de uma LSD tal como listada na Tabela 1 (ver, por exemplo, Walkley (1998) *Brain Pathol.*, 8:175-193). Numa forma de realização ilustrativa, a doença é a doença A de Niemann-Pick. O método de administração de um genoma AAV recombinante ao núcleo de um neurónio afetado pela doença comprehende contactar uma terminação axonal de um neurónio afetado pela doença com uma composição compreendendo uma partícula viral de AAV compreendendo o genoma AAV recombinante e permitindo que a partícula viral seja

endocitada e transportada de forma retrógrada intracelularmente ao longo do axónio para o núcleo do neurónio, em que a concentração de genomas AAV na composição é pelo menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, ou 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ou 50 ($\times 10^9$ tu/ml); ou (c) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25 ou 50 ($\times 10^{10}$ iu/ml). Em certas formas de realização, o neurónio é um neurónio de projeção e/ou a distância da terminação axonal para o núcleo do neurónio é pelo menos 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 mm. Em várias formas de realização, o genoma AAV é transportado ao longo de todo o comprimento do axónio, em distâncias que variam dependendo do comprimento do axónio. Em humanos, essas distâncias podem ser de 1000 mm ou superiores.

Em outro aspeto, a revelação providencia um método de administração de um produto transgene a uma célula alvo do SNC, que é um neurónio ou uma célula glial num mamífero afetado por um distúrbio, por exemplo uma LSD como listada na Tabela 1. O método comprehende contactar uma terminação axonal de um neurónio com uma composição compreendendo um vetor AAV transportando pelo menos uma parte de um gene codificando um produto de transgene terapêutico; permitindo que as partículas virais sejam endocitadas e transportadas de forma retrógrada intracelularmente ao longo do axónio para o núcleo do neurónio; permitindo que o produto de transgene seja expresso e segregado pelo neurónio; e permitindo que uma segunda célula absorva o produto de transgene, pelo que o produto de transgene alivia assim a patologia na segunda célula. Em algumas formas de realização, a concentração do vetor AAV na composição é pelo menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, ou

50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8, 4, 9, 9, 3, 10, 15, 20, 25 ou 50 ($\times 10^9$ tu/ml); ou (c) 5, 6, 7, 8, 8, 4, 9, 9, 3, 10, 15, 20, 25 ou 50 ($\times 10^{10}$ iu/ml). Por exemplo, podem ser segregadas hidrolases lisossomais por células transduzidas e subsequentemente absorvidas por outra célula através de endocitose mediada por receptor de manose-6-fosfato, a segunda célula sendo transduzida ou não transduzida (Sando et al. (1977) Cell, 12:619-627; Taylor et al. (1997) Nat. Med., 3:771-774; Miranda et al. (2000) Gene Ther., 7:1768-1776; e Jin et al. (2002) J. Clin. Invest., 109:1183-1191).

Nos métodos da revelação, pode ser usado AAV de qualquer serótipo desde que o vetor seja capaz de ser submetido a transporte axonal retrógrado num cérebro afetado pela doença. O serótipo do vetor viral usado em certas formas de realização da invenção é selecionado do grupo consistindo de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 e AAV8 (ver, por exemplo, Gao et al. (2002) PNAS, 99:11854-11859; e Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003). Pode ser usado outro serótipo para além dos aqui listados. Além disso, vetores AAV pseudotipados podem ser também utilizados nos métodos aqui descritos. Os vetores AAV pseudotipados são aqueles que contêm o genoma de um serótipo de AAV no capsídeo de um segundo serótipo de AAV; por exemplo, um vetor AAV que contém o capsídeo de AAV2 e o genoma de AAV1 ou um vetor AAV que contém o capsídeo de AAV5 e o genoma de AAV2. (Auricchio et al., (2001) Hum. Mol. Genet., 10(26):3075-81). Contudo, AAV5 pode ser especificamente excluído dos métodos da invenção utilizando uma metaloendopeptidase, por exemplo neprilisina, como um transgene terapêutico.

Os vetores AAV derivam de parvovírus de DNA de cadeia única

(ss) que são não patogénicos para mamíferos (revisto em Muzyscka (1992) Curr. Top. Microb. Immunol., 158:97-129). Em resumo, os vetores de base AAV possuem os genes rep e cap que representam 96% do genoma viral removido, deixando as duas repetições de terminal invertido (ITR) flanqueadoras de par de base 145 (bp) que são usadas para iniciar replicação, empacotamento e integração de DNA viral. Na ausência de vírus adjuvante, AAV de tipo selvagem integra-se no genoma humano de célula hospedeira com especificidade de local preferencial no cromossoma 19q 13.3 ou pode permanecer expresso por episoma. Uma única partícula de AAV pode acomodar até 5 kb de ssDNA, deixando assim 4,5 kb para um transgene e elementos regulatórios, o que é tipicamente suficiente. Contudo, sistemas trans-splicing como descritos, por exemplo, na Patente Americana N° 6,544,785, podem quase duplicar este limite.

Numa forma de realização ilustrativa, AAV é AAV2 ou AAV1. Vírus adeno-associados de muitos serótipos, especialmente AAV2, foram amplamente estudados e caracterizados como vetores de terapia genética. Os entendidos na técnica conhecerão a preparação de vetores de terapia genética com base em AAV. Podem ser encontradas numerosas referências a vários métodos de produção, purificação e preparação de AAV para administração a pacientes humanos no extenso acervo da literatura publicada (ver, por exemplo, Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003). Adicionalmente, terapia genética com base em AAV dirigida a células do SNC foi descrita nas Patentes Americanas N° 6,180,613 e 6,503,888.

Em certos métodos da revelação, o vetor compreende um transgene ligado operacionalmente a um promotor. O

transgene codifica uma molécula biologicamente ativa cuja expressão no SNC resulta em correção pelo menos parcial da neuropatologia. Em algumas formas de realização, o transgene codifica uma hidrolase lisossomal. Numa forma de realização ilustrativa, a hidrolase lisossomal é ASM. As sequências de cDN genómicas e funcionais de ASM humano foram publicadas (ver, por exemplo, as Patentes Americanas Nº 5,773,278 e 6,541,218). Outras hidrolases lisossomais podem ser usadas para doenças apropriadas, por exemplo, como listadas na Tabela 1.

A revelação providencia ainda métodos de tratamento da doença de Alzheimer em mamíferos, incluindo humanos. Em tais métodos, o transgene codifica uma metaloendopeptidase. A metaloendopeptidase pode ser, por exemplo, a enzima neprilisina que degrada amiloide-beta (EC 3.4.24.11; número de acesso da sequência, por exemplo, P08473 (SWISS-PROT)), a enzima insulisina que degrada insulina (EC 3.4.24.56; número de acesso da sequência, por exemplo, P14735 (SWISS-PROT)), ou timet oligopeptidase (EC 3.4.24.15; número de acesso da sequência, por exemplo, P52888 (SWISS-PROT)).

O nível de expressão de transgene em células eucarióticas é em grande parte determinado pelo promotor transcrecional dentro da cassette de expressão de transgene. Promotores que apresentam atividade de longo-prazo e são específicos de tecidos e mesmo de células são usados em algumas formas de realização. Exemplos não limitativos de promotores incluem, mas não se limitam, ao promotor do citomegalovírus (CMV) (Kaplitt et al. (1994) Nat. Genet., 8:148-154), promotor de CMV/humano β 3-globina (Mandel et al. (1998) J. Neurosci., 18:4271-4284), promotor de GFAP (Xu et al. (2001) Gene Ther., 8:1323-1332), o promotor da enolase 1.8-kb

específica de neurônio (NSE) (Klein et al. (1998) *Exp. Neurol.*, 150:183-194), promotor de beta actina de galinha (CBA) (Miyazaki (1989) *Gene*, 79:269-277) e o promotor da β-glucuronidase (GUSB) (Shipley et al. (1991) *Genetics*, 10:1009-1018). Para prolongar expressão, outros elementos reguladores podem ser adicionalmente operacionalmente ligados ao transgene, tais como por exemplo o Elemento Pós-Regulador do Vírus de Hepatite de Woodchuck (WPRE) (Donello et al. (1998) *J. Virol.*, 72, 5085-5092) ou o local de poliadenilação da hormona do crescimento bovina (BGH).

Para algumas aplicações de terapia genética de SNC será necessário controlar a atividade transcracional. Para esta finalidade, pode ser obtida regulação farmacológica de expressão genética com vetores AAV através da inclusão de vários elementos reguladores e promotores sensíveis a fármacos, em Haberma et al. (1998) *Gene Ther.*, 5:1604-16011; e Ye et al. (1995) *Science*, 283:88-91.

Podem ser produzidas preparações AAV de elevada titulação usando técnicas conhecidas na técnica, por exemplo como descritas na Patente Americana N° 5,658,776 e *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Humana Press, 2003.

Os exemplos que se seguem providenciam formas de realização ilustrativas da revelação. Os exemplos não limitam de forma alguma a invenção.

Exemplos

Titulação de Vetores Recombinantes

As titulações de vetor AAV foram medidas de acordo com o número de cópia de genoma (partículas de genoma por milímetro). As concentrações de partículas de genoma foram baseadas em PCR Taqman® do DNA de vetor como anteriormente relatado (Clark et al. (1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) Mol. Ther., 6:272-278). Em resumo, AAV-ASM purificado foi tratado com tampão de digestão de capsídeo (50mM de Tris-HCl pH 8,0, 1,0 mM de EDTA, 0,5% de SDS, 1,0 mg/ml de proteinase K) a 50°C por 1 hora para libertar o DNA de vetor. Amostras de DNA foram submetidas a uma reação em cadeia de polimerase (PCR) com iniciadores que hibridizam com sequências específicas no DNA de vetor tais como a região promotora, transgene ou a sequência poli A. Os resultados de PCR foram então quantificados por um software Taqman® em tempo real, como o providenciado pela Sistema de Deteção de Sequência Prism 7700 da Applied Biosystems da Perkin Elmer (Foster City, CA).

Os vetores transportando um gene marcador testável como o gene da β-galactosidase ou da proteína verde fluorescente (GFP) podem ser titulados usando um ensaio de infetividade. Células suscetíveis (por exemplo, células HeLa ou COS) são transduzidas com AAV e é realizado um ensaio para determinar a expressão de genes como coloração de celulas transduzidas pelo vetor de β-galactosidase com X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranoside) ou microscopia de fluorescência para células transduzidas por GFP. Por exemplo, o ensaio é realizado da seguinte forma: 4 ×10⁴ células HeLa são plaqueadas em cada poço de uma placa de cultura de 24 poços usando meios de crescimento normais. Após ligação, ou seja, cerca de 24 horas mais tarde, as

células são infetadas com Ad tipo 5 numa multiplicidade de infecção (MOI) de 10 e transduzidas com diluições em série do vetor empacotado e incubadas a 37°C. Um a três dias mais tarde, antes de serem observados amplos efeitos citopáticos, realiza-se o ensaio apropriado nas células (por exemplo, coloração X-gal ou microscopia de fluorescência). Se for usado um gene repórter como β-galactosidase, as células são fixadas em 2% de paraformaldeído, 0,5% de glutaraldeído e submetidas a coloração quanto a atividade de β-galactosidase usando X-gal. São contadas diluições de vetor que provêm células bem separadas. Cada célula positiva representa 1 unidade de transdução (tu) do vetor.

Correção de patologia LSD no cérebro de rato

Murganhos ASMKO com dez semanas contêm patologia NPD significativa no sistema nervoso central. Foi verificada por PCR a identificação de mutantes recessivos homozigóticos. Dezasseis murganhos ASMKO com dez semanas foram anestesiados com isoflurano e montados numa estrutura estereotáxica, sendo feita uma incisão para expor o crânio subjacente, sendo feito um único orifício perfurado num hemisfério de cada rato. Dois microlitros de AAV2-CMV-ASM (Targeted Genetics, Seattle, WA) de elevada titulação ($9,3 \times 10^{12}$ gp/ml) foram injetados no hipocampo numa coordenada estereotáxica de 2,0 mm rostral de bregma, 1,5 mm à direita da linha média e 2,0 mm ventral à superfície pial. Estas coordenadas do hipocampo asseguraram que o vetor AAV2 foi exposto a neurônios do giro denteadoo e da área do cornu ammonis 3 (CA3), bem como a terminações axonais de

neurónios de projeção do hipocampo contralateral, septo mediano e córtex entorrinal. As injeções foram realizadas a uma taxa de $0,2 \mu\text{l}/\text{minuto}$, e um total de $1,86 \times 10^{10}$ de partículas genómicas foram administradas a cada cérebro.

Murganhos foram testados relativamente à função motora por aceleração e oscilação de barra rotatória Smartrod (AccuScan) usando métodos conhecidos na técnica e reproduzidos em Sleat et al. (2004) J. Neurosci. **24**:9117-9126. As Figuras 10A/B e as Figuras 11A/B mostram graficamente os resultados de testes com barra rotatória para medição da recuperação de função motora.

Os murganhos foram então sacrificados 5 ($n = 8$) ou 15 ($n = 8$) semanas após a injeção (pi). Oito cérebros ($n = 4$ cada às 5 e 15 semanas pi) foram analisados quanto a distribuição de proteína e mRNA de ASM e quanto a redução dos níveis suprafisiológicos de colesterol nos lisossomos. Os restantes 8 cérebros ($n = 4$ cada às 5 e 15 semanas pi) foram processados quanto a histopatologia para analisar a correção de lisossomas acumulados e distendidos, que é o método mais direto e preciso para determinar a reversão de patologia de armazenamento para LSD.

Foi detetada transdução robusta no hipocampo injetado (ipsilateral) às 5 e 15 semanas pi. A camada celular granulada e hilo do giro denteadoo e as camadas celulares piramidais e oriens de CA3 foram amplamente transduzidas pelo vetor AAV2. Este impressionante padrão de transdução alargou-se a outras regiões do hipocampo ipsilateral, tais como a área do subículo e cornu ammonis 1 (CA1) e 2 (CA2). Imunofluorescência com um anticorpo monoclonal ASM anti-humano confirmou a presença da proteína ASM em muitas

células. O padrão global de proteína foi semelhante ao padrão de mRNA, com alguma distribuição adicional localizada de proteína.

Proteína e mRNA de ASM humano foram também detetados em regiões exteriores ao hipocampo ipsilateral em ambos os pontos temporais. O giro denteadoo contralateral e CA3 e o septo mediano e córtex entorrinal foram positivos quanto a hibridização *in situ* e imunofluorescência (Figuras 1A e 2A). O padrão de transdução nestes locais distais foi consistente com a organização topográfica dos neurónios de projeção que inervam o local de injeção (Figuras 1B e 2B). Isto demonstrou que AAV2 foi submetido a transporte axonal retrógrado nos circuitos intrahipocampais, septohipocampais e entorrinodenteados de cérebros ASMKO, e que o vetor viral foi direcionado para o núcleo a seguir a transporte pelos axónios acima (Figuras 1C e 2C). O padrão de transdução não suporta difusão parenquimatosa como a razão para transporte de AAV2 para estes locais distais. Se tal difusão tivesse ocorrido, as estruturas entre os locais injetados e distais teriam sido expostas ao vírus migrante. Mas estas estruturas intermediárias foram negativas quanto a hibridização *in situ*. Por exemplo, o corpo estriado, que possui um forte tropismo natural quanto a AAV2, foi negativo quanto a transferência de genes apesar de estar na via direta entre o hipocampo e o septo mediano. Assim, a transferência de genes para locais distais deve ter ocorrido por transporte axonal retrógrado, o que indica que um neurónio de projeção afetado pode funcionar como um sistema de transporte de canal eficaz para o movimento de AAV2 através de um cérebro doente.

Foi ainda investigada a capacidade de ASM para reverter as

anormalidades de colesterol no cérebro ASMKO. A filipina é uma molécula autofluorescente isolada de *Streptomyces filipinensis* que se liga a complexos de colesterol (Leventhal et al. (2001) J. Biol. Chem., 276:44976-44983; e Sarna et al. (2001) Eur. J. Neurosci., 13:1-9). Cérebros de murganhos ASMKO não injetados tinham elevados níveis de coloração filipina devido a este abundantes complexos de colesterol, enquanto os cérebros de murganhos normais não produziram qualquer coloração filipina.

A injeção de AAV2-CMV-ASM resultou na perda completa de coloração filipina em todo o hipocampo ipsilateral e contralateral, septo e córtex entorrinal às 5 e 15 semanas pi de murganhos ASMKO (Figuras 1A e 2A). Isto aconteceu em forte contraste com animais de controlo ASMKO com a mesma idade não injetados, onde foram detetados níveis elevados de coloração filipina nestas mesmas estruturas. A perda de coloração filipina em cérebros injetados com AAV2 demonstra que foi corrigido um fenótipo celular secundário (por exemplo, defeito metabólico) de doença ASM. Isto sugere fortemente que a proteína ASM foi direcionada para o lisossoma e que interagiu com o complexo de esfingomielina-colesterol. Esta interação resultou provavelmente na libertação de colesterol da esfingomielina e na subsequente entrada de colesterol nas suas vias biológicas normais (tais como degradação ou translocação para a membrana de plasma (Leventhal et al. (2001) J. Biol. Chem., 276:44976-44983)).

Foi observada a perda de coloração filipina em todas as camadas celulares e subcampos dos circuitos intrahipocampais, septohipocampais e entorrinodenteados. A área de correção de colesterol foi muito maior e mais ampla

do que o padrão de proteína ASM. Isto indica que, a seguir a transporte axonal retrógrado de AAV2, os neurônios de projeção podem ter funcionado como "bombas de enzimas" e podem ter segregado proteína AASM no tecido circundante. De forma significativa, apenas uma pequena quantidade de ASM é necessária para obter um efeito terapêutico na acumulação de colesterol dentro de células afetadas de ASMKO, uma quantidade inferior ao limite de detecção do protocolo imunofluorescente.

Também foi avaliado se o transporte axonal do vetor AAV2-AASM resulta na correção do fenótipo celular primário de NPD. Secções de cérebro de histopatologia com um micrôn de espessura demonstraram uma notável redução de patologia lisossomal acumulada e distendida em cérebros injetados com AAV2-CMV-ASM às 5 semanas p.i (Tabela 2). Em todas as regiões dos hemisférios ipsilaterais e contralaterais do hipocampo ocorreu uma reversão da patologia, resultando em restauro parcial ou completo da arquitetura celular normal. O septo mediano e o córtex entorrinal também exibiram uma redução substancial nas lesões de armazenamento. De forma semelhante aos dados de filipina, o número de células corrigidas foi maior e mais abrangente do que o padrão de proteína ASM. Foi evidente a reversão de patologia dentro de regiões conhecidas por se projetarem para o hipocampo, incluindo os circuitos intrahipocampais, septohipocampais e entorrinodenteados. No geral, o volume de correção foi de 30-35 mm³ ou mais no hipocampo contralateral, 5-8 mm³ ou mais no córtex entorrinal ipsilateral, 1-2 mm³ ou mais no córtex entorrinal contralateral e 2-3 mm³ ou mais no septo mediano. Isto reforça ainda mais que o transporte axonal do vetor viral foi o responsável por este efeito terapêutico, dado que estruturas próximas (que não contribuem para estes

circuitos) teriam sido corrigidas se a distribuição viral fosse mediada meramente por difusão (ver, “corpo estriado ipsilateral” e “corpo estriado contralateral” na Tabela 2).

Para demonstrar que a reversão da patologia foi específica de ASM, um grupo adicional de murganhos ASMKO foi injetado com um vetor de controlo transportando um gene repórter, AAV2-CMV- β -gal ($n = 2$ cada a 5 e 15 semanas pi), sendo de seguida processados quanto a histopatologia. Em todos os quatro cérebros, as células permaneceram inundadas com lisossomas distendidos e continham outras anormalidades como inchaço citoplásмico e camadas celulares desorganizadas.

Tabela 2

Região do cérebro	Não tratado	Tratado com AAV2-ASM
Hipocampo Ipsilateral		
Campo CA1	++++	+
Campo CA3	++++	+
Camada Celular Granular do Denteado	++++	+
Hilo	++++	+
Hipocampo Contralateral		
Campo CA1	++++	+
Campo CA3	++++	+
Camada Celular Granular do Denteado	++++	+

Região do cérebro	Não tratado	Tratado com AAV2-ASM
Hilo	++++	+
Côrtex Entorrinal Ipsilateral	++++	++
Côrtex Entorrinal Contralateral	++++	+++
Septo Mediano Ipsilateral	++++	++
Septo Mediano Contralateral	++++	++
Corpo Estriado Ipsilateral	++++	++++
Corpo Estriado Contralateral	++++	++++
<p>++++ elevado nível de patologia em quase todas as células</p> <p>+++ patologia em muitas células, correção observada em muitas células</p> <p>++ patologia em algumas células, correção observada em muitas células</p> <p>+ pouca ou nenhuma patologia na maior parte das células, quase todas as células são corrigidas</p>		

Assim, de acordo com a presente revelação, é suficiente uma única injeção de vetor AAV2 de elevada titulação para transferir o gene ASM para estruturas que inervam o hipocampo afetado de ASMKO. O número de estruturas

positivas quanto ao vetor AAV2 foi superior ao demonstrado por um estudo recente no hipocampo normal de rato, que mostrou transporte axonal apenas no circuito entorrinodenteado (Kaspar et al. (2002) Mol. Ther., 5:50-56). Os resultados aqui descritos demonstram que o transporte axonal pode ocorrer em neurônios de projeção afetados com patologia de armazenamento e que este modo de transporte resulta na eliminação de patologia de armazenamento em estruturas próximas e regiões múltiplas distais ao local de injeção. Também demonstramos que o transporte axonal não se encontra limitado apenas aos circuitos associados ao hipocampo. O transporte axonal retrógrado ocorreu nos circuitos nigroestriados (Figura 3) e medulocerebelar (Figura 4). Isto demonstra que o transporte axonal de AAV2 em neurônios afetados pela doença é uma propriedade geral do vetor viral.

Foi realizado um estudo semelhante com AAV1-ASM com concentrações de $1-4 \times 10^{13}$ gp/ml e AAV7-ASM com a concentração de $8,4 \times 10^{12}$ gp/ml. Enquanto AAV1 não apresentou transporte axonal retrógrado detetável, AAV7 teve transporte axonal retrógrado, de forma semelhante a AAV2, e produziu correção de patologia LSD em regiões distais (ver a Figura 5).

Injeção de AAV no cerebelo

Murganhos ASMKO foram anestesiados com isoflurano e montados numa estrutura estereotáxica. O bregma foi localizado como um ponto de referência para determinar o local de perfuração para injeção na região dos núcleos cerebelares profundos do cerebelo. Uma vez localizado, uma incisão foi feita para expor o crânio subjacente, e um

único orifício perfurado foi feito no crânio sem perfurar a superfície do cérebro. Uma seringa de Hamilton foi baixada no cérebro através do orifício e AAV2-CMV-ASM foi injetado nos núcleos cerebelares profundos a uma taxa de 0,5 microlitros por segundo. Três microlitros foram injetados para uma dose total de 1×10^{10} partículas genómicas. Os murganhos foram sacrificados 7 semanas após a injeção. Os cérebros e as medulas espinais foram analisados quanto à expressão de mRNA de ASM, expressão da proteína de ASM, marcação para filipina e marcação para calbindina.

A filipina é uma molécula autofluorescente que se liga a complexos de colesterol. Cérebros de murganhos ASMKO não tratados têm elevados níveis de coloração filipina devido a abundantes complexos de colesterol que se acumulam em resultado da doença que têm. Em contraste, os cérebros de murganhos normais não exibem coloração filipina.

A calbindina é um marcador de células de Purkinje que são encontradas no cerebelo e estão envolvidas em movimentos coordenados. No murganho ASMKO, as células de Purkinje morrem a medida que esses murganhos envelhecem, resultando em uma diminuição do comportamento de movimentos coordenados. Essa perda de células de Purkinje e a perda relacionada de comportamento de movimentos coordenados não são observados em murganhos normais.

Após injeção de AAV2 no núcleo cerebelar profundo, o cerebelo era positivo para mRNA de ASM, proteína de ASM e marcação de calbindina. Esses resultados demonstram a capacidade de AAV2 de transduzir o cerebelo após injeção nos núcleos cerebelares profundos. Ademais, a transdução cerebelar e a expressão resultante de ASM preveniram a

morte de células de Purkinje como evidenciado pela presença de marcação de calbindina no murganho tratado. Em murganhos tratados com AAV-ASM, observou-se também expressão de proteína de hASM no tronco cerebral, tálamo e mesencéfalo. A expressão de proteína de hASM nessas regiões coincidiu com a eliminação na região de marcação para filipina/colesterol. Em geral, no cerebelo, existiu uma relação positiva entre os níveis de proteína de ASM, a eliminação de filipina e a sobrevivência de células de Purkinje.

O mRNA de ASM e a proteína de ASM foram também detetados fora do cerebelo. Especificamente, a medula espinal era positiva para a expressão de mRNA de ASM como evidenciado por hibridização *in situ*. A medula espinal também era positiva para proteína de ASM como evidenciado por imunofluorescência específica para ASM. Esses resultados indicam que a medula espinal foi transduzida após injeção distal do vetor AAV nos núcleos cerebelares profundos. Esse padrão de transdução era consistente com a organização topográfica dos neurônios de projeção que inervam a região dos núcleos cerebelares profundos. Esses resultados indicam que o vetor AAV2 foi captado por células de medula espinal distais e expresso.

Tratamento da doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (AD) é um distúrbio neurodegenerativo caracterizado pela acumulação de peptídeo β -amilóide ($A\beta$) devido a catabolismo $A\beta$ reduzido. À medida que se acumula $A\beta$, ele agraga-se em placas extracelulares, comprometendo a função sináptica e provocando a perda de neurônios. A

patologia conduz à demência, perda de coordenação e à morte.

A neprilisina é uma metaloendopeptidase de zinco ligada a membrana 97 kD que é a enzima de limite de taxa na degradação normal de A β . A introdução de neprilisina pode desacelerar a progressão da doença ao remover grupos A β antes da agregação. De facto, foi demonstrado que a neprilisina degrada formas oligoméricas de A β , removendo dessa forma placas existentes num modelo animal de AD (Kanemitsu et al. (2003) *Neurosci. Lett.*, 350:113-116). Murganhos com gene inativado de neprilisina exibem níveis elevados de A β (Iwata et al. (2001) *J. Neurosci.*, 24:991-998.). Inibidores de neprilisina, como tiorfano e fosforamidona, aumentam os níveis de A β no cérebro dos murganhos (Iwata et al. (2000) *Nat. Med.*, 6:143-150). Para além disso, foram encontrados níveis de mRNA de neprilisina reduzidos em áreas de elevada carga de placas amilóides em cérebros humanos, reforçando a ligação entre neprilisina e AD (Yasojima et al. (2001) *Neurosci. Lett.*, 297:97-100).

As áreas do cérebro mais afetadas por AD são o hipocampo, córtex, cerebelo, corpo estriado e tálamo (ver, por exemplo, Iwata et al. (2001) acima; Yasojima et al. (2001) acima). Estas são as mesmas áreas do cérebro que apresentam transporte axonal retrógrado eficiente com AAV.

Em conformidade, AAV pode ser usado para administrar transgenes terapêuticos a regiões de elevada carga de placas por meio de injeção direta e subsequente translocação de vírus através de circuitos cerebrais para os nossos locais alvo. A transferência de genes de neprilisina mediada por vetor viral foi eficaz no

tratamento de modelos de murganhos de AD (Marr et al. (2003) *J. Neurosci.*, 23:1992-1996; Marr et al. (2004) *J. Mol. Neurosci.*, 22:5-11; Iwata et al. (2004) *J. Neurosci.*, 24:991-998). Um relatório recente mostrou que neprilisina AAV5 removeu A β dos terminais pré-sinápticos do hipocampo em murganhos com deficiência de neprilisina, desacelerando a formação de placas nas sinapses (Iwata et al. (2004) acima). Neste relatório, foi encontrada neprilisina no hipocampo contralateral, mas continua por saber se tal se pode atribuir a transporte retrógrado de vírus ou a transporte anterógrado de proteína expressa.

Correção de Patologia de Armazenamento do Colesterol

O seguinte experimento avaliou a capacidade relativa dos vetores recombinantes de serótipos AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 e AAV2/8 codificando a ASM humana (hASM) de expressarem a proteína de hASM, corrigirem a patologia de armazenamento do colesterol, serem transportados, resgatarem células de Purkinje e iniciarem a recuperação funcional no murganho ASMKO após injeção unilateral dentro dos núcleos cerebelares profundos. Um grupo adicional de murganhos ASMKO recebeu injeções bilaterais no DCN de modo a avaliar se a difusão/expressão proteica aumentadas do transgene melhorariam a recuperação funcional comportamental.

Sessenta e seis murganhos machos homozigotos (-/-) com gene inativado para a esfingomielinase ácida (ASMKO) e dezasseis controlos machos relacionados de tipo selvagem foram criados a partir de cruzamentos entre heterozigotos (+/-). Os murganhos foram genotipados por PCR após o procedimento descrito em Gal et al. (1975) *N Engl J Med*:**293**:632-636.

Murganhos da colônia original foram retrocruzados com a linhagem C57/B16. Os animais foram abrigados com ciclo de luz:escuridão 12:12 e com acesso a alimento e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados com um protocolo aprovado pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais.

Após serem anestesiados com isoflurano, murganhos (\approx 7 semanas de idade) foram injetados unilateralmente nos núcleos cerebelares profundos (DCN) (A-P: -5,75 do bregma, M-L: -1,8 do bregma, D-V: -2,6 da dura mater, barra do incisor: 0,0) com um dos seguintes vetores de serótipos de AAV (n=8/vetor): AAV1-CMV- β gal, AAV1-CMV-ASM, AAV2-CMV-ASM, AAV5-CMV-ASM, AAV7-CMV-ASM e AAV8-CMV-ASM. Os vetores foram administrados usando uma seringa de Hamilton de 10 μ l montada em uma bomba de seringa a uma taxa de 0,5 μ l/minuto para um total de $1,86 \times 10^{10}$ partículas genómicas por cérebro. O volume de injeção final para cada vetor foi de 4 μ l. Uma hora antes e vinte e quatro horas após a cirurgia, os murganhos foram dados cetoprofeno (5 mg/kg; SC) para analgesia. Os murganhos foram sacrificados 7 semanas após a injeção (14 semanas de idade). No momento da eutanásia, os murganhos receberam uma superdosagem de euthasol (150 mg/kg; IP) e foram rapidamente decapitados (n=5/grupo) ou submetidos a perfusão transcardíaca (n=3/grupo). Os cérebros de murganhos decapitados foram rapidamente removidos, congelados instantaneamente em nitrogênio líquido, dissecados em 3 cortes (hemisfério cerebral direito, hemisfério cerebral esquerdo e o cerebelo), homogeneizados e analisados quanto à hASM por ELISA. Os cérebros e medulas espinais de murganhos submetidos a perfusão foram processados quanto à expressão de proteína de ASM humana, a acumulação de colesterol como detetada por

marcação para filipina e a sobrevivência de células de Purkinje por marcação para calbindina em cortes de 50 µm obtidos em um vibrátomo.

Usando um protocolo similar, murganhos ASMKO (\approx 7 semanas de idade) foram injetados bilateralmente com AAV2/1- β gal (n=8), AAV2/1-ASM (n=5) e AAV2/2-ASM (n=5) e sacrificados com 20 semanas de idade após serem submetidos a teste em barra rotatória. Os cérebros foram congelados instantaneamente em nitrogênio líquido, bissecados na linha média e subsequentemente divididos em cinco cortes (S1, S2, S3, S4 e S5) usando uma matriz de cérebro de murganho (ASI Instruments, Inc, MI). Os cortes 1-4 tinham uma distância de cerca de 2 mm entre si com S1 sendo a mais rostral e S4 a mais caudal. O corte 5 continha apenas o cerebelo. O hemisfério direito foi usado para quantificar os níveis de esfingomielina e o esquerdo os níveis de hASM.

O cDNA de comprimento total de ASM humana sob o controlo do promotor imediato precoce do citomegalovírus (CMV), com uma sequência de poliadenilação SV40 e um intrão híbrido, foi克隆ado em um plasmídeo contendo ITRs de AAV serótipo 2 (AAV2 ITR). Jin et al. (2002) J Clin Invest. **109**:1183-1191. Vetores híbridos foram produzidos por transfeção tripla usando uma série de plasmídeos auxiliares contendo domínios de codificação de capsídeos serótipo-específicos para além dos genes de replicação de AAV tipo 2. Essa estratégia permite o empacotamento de vetores AAV2 ITR em cada vírião serótipo-específico. Rabinowitz, et al. (2002) J. Virol. **76**:791-801. Com essa abordagem, o genoma de hASM recombinante foi usado para gerar uma série de vetores rAAV-hASM de vários serótipos incluindo AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 e AAV2/8. Os vetores AAV recombinantes foram

purificados por cromatografia de troca iônica (Serótipos 2/1, 2/2 e 2/5). O'Riordan, et al. (2000) J Gene Med **2**: 444-54. ou centrifugação com CsCl (serótipos 2/8 e 2/7). Rabinowitz et al. (2002) J. Urrol. **76**:791-801. O título final de partículas de vírus de AAV-ASM (partículas resistentes a DNase) foi determinado por PCR TaqMan da sequência de CMV. Clark et al. (1999) Hum. Gene Therapy **10**:1031-1039.

Os anticorpos contra a ASM humana são específicos para humano e não possuem reação cruzada com ASM de murganho. Placas 9018 Coster (Corning, NY) revestidas (100 µl/poço) com anticorpo monoclonal contra ASM humana recombinante (rhASM) (2 µg/ml) diluído em tampão carbonato de sódio 50 mM (pH 9,6) foram incubadas ao longo da noite a uma temperatura de 2 a 8 °C. Anticorpo de revestimento em excesso foi removido e adicionou-se diluente de bloqueio (KPL, Inc., MD) por 1 h a 37 °C. As placas foram lavadas com um lavador de microplacas (Molecular Devices, CA) por dois ciclos. Os padrões, controlos e amostras diluídos em tampão de diluição padrão (PBS, 0,05% de Tween, 1% de HP-BSA) foram pipetados em duplicata e deixados incubando durante 1 h a 37 °C. As placas foram lavadas como descrito acima. Cem microlitros de anticorpo biotinilado contra ASM humana recombinante (rhASM) (diluído 1:2K em tampão de diluição padrão) foram adicionados a cada poço, deixados incubando por 1 h a 37 °C e subsequentemente removidos com um lavador de microplacas. Estreptavidina-HRP (Pierce Biotechnology, Inc., IL) diluída 1:10K foi então adicionada (100 µl/poço) e deixada incubando por 30 min à temperatura ambiente. As placas foram lavadas como descrito acima e subsequentemente incubadas com SureBlue TMB (KPL, Inc., MD) durante 15 minutos a uma temperatura de 36 a 38 °C. A

reação foi interrompida com solução de terminação (KPL, Inc., MD) e os valores de absorbância foram então lidos a 450 nm com um leitor de placas Spectra Max 340 (Molecular Devices, CA). A análise de dados foi completada usando o programa Softmax Pro 4.3 (Molecular Devices, CA).

A concentração proteica de cada amostra foi determinada com um estojo de ensaio proteico BCA (Pierce Biotechnology, Inc., IL) usando albumina de soro bovino como padrão.

Murganhos foram submetidos a perfusão transcardíaca com fixador contendo 2% de paraformaldeído, 0,03% de glutaraldeído, 0,002% de CaCl₂ em tampão acetato de sódio 0,1 M a pH 6,5, seguida por perfusão com o mesmo fixador a pH 8,5. Os cérebros e medulas espinais de murganhos foram dissecados e pós-fixados ao longo da noite a 4 °C em fixador a pH 8,5 sem glutaraldeído. Os tecidos foram lavados em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4, embebidos em ágar a 3,5% e cortados em cortes sagitais de 50 µm com um vibratôrmo.

Os cérebros e medulas espinais foram cortados sagitalmente em um vibratôrmo a intervalos de 50 µm. Os cortes foram processados para imunofluorescência com anticorpos primários contra ASM humana (1:200). Os cortes foram incubados em soro de asno a 10%, Triton X-100 a 0,3% em PBS durante 1 hora, seguido por incubação com anticorpo de murganho biotinilado anti-ASM humana em soro de asno a 2%, Triton X-100 a 0,2% em PBS durante 72 horas. Após lavagem, o sinal foi amplificado usando um estojo de amplificação de sinal de tiramida (PerkinElmer, Boston, MA). A proteína de ASM humana foi visualizada usando um microscópio

fluorescente Nikon, e as imagens foram capturadas usando uma câmara SPOT e o programa Adobe Photoshop.

O complexo de filipina (Sigma, St. Louis, MO) foi primeiro diluído em metanol a 100% para uma concentração de estoque de 1 mg/ml. A solução de estoque é estável durante 4 semanas a -20 °C. Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados no escuro durante três horas em solução de filipina 10 µg/ml em PBS recém preparada. Os cortes foram então lavados três vezes com PBS. Os depósitos de colesterol foram visualizados com um filtro de ultravioleta em um microscópio de fluorescência.

Os cérebros foram processados para imunofluorescência usando anticorpos primários contra a proteína de ligação a cálcio, calbindina. Os cortes foram lavados com tampão fosfato de potássio (KPB) e depois lavados com solução salina tamponada de fosfato de potássio (KPBS). Os cortes foram então bloqueados em soro de asno a 5%, Triton X-100 a 0,25% em KPBS durante até 3 horas e depois incubados em soro de asno a 5%, Triton X-100 a 0,2% e anticorpo de murganho anti-calbindina (1:2500, Sigma, St. Louis, MO) em KPBS. Após 72 horas a 4 °C, os cortes foram lavados com KPBS com 0,1% de Triton X-100 três vezes. O anticorpo secundário, anticorpo de asno anti-CY3 de murganho (1:333, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) foi adicionado em KPBS + 0,1% de Triton X-100 durante 90 minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados com KPB e depois montados em lâminas revestidas com gel. As células positivas para calbindina foram visualizadas sob epifluorescência. De modo a quantificar as células de Purkinje do cerebelo, quatro cortes completos cerebelares mediais foram selecionados de cada animal. As células de

Purkinje imunopositivas para calbindina foram visualizadas com um microscópio de fluorescência e os corpos celulares foram contados em um aumento de 20X. Cada lobo foi contado separadamente. Dois planos focais distintos foram contados por lobo. Apenas células em foco foram contadas para assegurar que nenhuma célula fosse contada duas vezes.

Cortes de cinquenta (50) μm obtidos em um vibrátomo foram primeiro processados para imunofluorescência com anticorpos contra a ASM humana, como descrito acima. Os cortes foram então lavados em PBS e corados para a acetilcolina transferase (ChAT; anticorpo policlonal de coelho, 1:500, Chemicon International, Temecula, CA) com o protocolo descrito acima para calbindina. Entretanto, em vez de usar um anticorpo secundário anti-CY3, foi usado um anticorpo de asno anti-coelho conjugado com FITC (1:200, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). A marcação foi primeiro visualizada sob epifluorescência e, subsequentemente, imagens foram adquiridas usando um microscópio confocal.

A marcação de filipina foi quantificada como segue. Imagens com exposição igual foram capturadas usando um microscópio de epifluorescência vertical de campo largo Nikon E600 equipado com uma câmara digital SPOT. Imagens foram obtidas para o grupo AAV2/1- β -gal primeiro e essa exposição foi usada para adquirir todas as outras imagens. Cada imagem analisada representa um plano sagital medial que se estende pelo comprimento de cada metade do cérebro. A análise morfométrica foi realizada usando o programa Metamorph (Universal Imaging Corporation). As imagens de AAV2/1- β -gal foram usadas para estabelecer o limiar; uma vez estabelecido o limiar, o mesmo limiar foi usado para todas

as imagens. As seguintes regiões foram selecionadas manualmente pelo usuário e analisadas separadamente: cerebelo, ponte de Varólio, medula oblonga, mesencéfalo, córtex cerebral, hipocampo, tálamo, hipotálamo e corpo estriado. A intensidade integrada foi medida em cada região, e todas as medições ($n=3/\text{grupo}$) de um dado grupo de animais foram usadas para gerar as médias. A redução de colesterol nos animais tratados foi então calculada como a diminuição percentual da intensidade integrada em comparação aos murganhos com gene inativado injetados com β -gal.

Foi observada imunomarcação positiva para hASM no cerebelo (Figura 6, Tabela 3), ponte de Varólio, medula oblonga e medula espinal (Figura 7) após injeção unilateral de AAV-ASM nos núcleos cerebelares profundos.

Tabela 3

Regiões com marcação positiva para hASM em relação ao serótipo de AAV. * indica que a marcação positiva para hASM estava abaixo do limite de detecção, mas mesmo assim a patologia de colesterol foi corrigida.

Estrutura	AAV1	AAV2	AAV5	AAV7	AAV8
núcleos cerebelares profundos	++++	++	+++	+++	++++
lóbulos cerebelares	++++	++	+++	+++	++++
ponte de Varólio	++	++	++	++	+

medula oblunga	+	++	++	+++	+
medula espinhal		+++	+++	++	+
tálamo	*	*	*	*	*
hipotálamo	*	*	*	*	*
hipocampo	*	*	*	*	*
corpo estriado	*	*	*	*	*
córtex cerebral	*	*	*	*	*

No cerebelo, os murganhos tratados com AAV2/1-ASM e tiveram o nível mais distribuído (ou seja, distribuído entre lóbulos no mesmo corte sagital) de expressão de hASM, enquanto murganhos tratados com AAV2/2-ASM tiveram o nível mais restrito de expressão proteica de ASM humana. A expressão proteica de ASM humana em murganhos tratados com AAV2/5-ASM, AAV2/7-ASM e AAV2/8-ASM era intermediária entre esses dois grupos. A distribuição medial-lateral entre os cortes sagitais foi máxima em murganhos tratados com os serótipos 1 e 8 e mínima em murganhos injetados com o serótipo 2. Os serótipos 5 e 7 iniciaram padrões de distribuição medial-lateral intermediários entre os serótipos 1 e 2. Cada camada do cerebelo (ou seja, molecular, de Purkinje e granular) foi transduzida por cada serótipo de AAV; no entanto, uma maior afinidade pela camada molecular era aparente para todos os serótipos. A transdução de células de Purkinje foi máxima em murganhos tratados com os serótipos 1 e 5. Os murganhos injetados com o serótipo 7 tiveram o menor número de células de Purkinje transduzidas. Os murganhos tratados com o serótipo 8 também tiveram poucas células de Purkinje transduzidas, mas tinham

menor expressão de ASM na camada granular em comparação aos serótipos 1, 2, 5 e 7. As células de Purkinje transduzidas com ASM pareciam ter uma citoestrutura saudável. A análise quantitativa da expressão proteica de hASM mediada por AAV por ELISA em homogenatos de tecido cerebelar corrobora os nossos resultados histoquímicos. Os murganhos injetados com os serótipos 1 e 8 demonstraram níveis proteicos de hASM no cerebelo significativamente ($p<0,0001$) maiores em comparação a todos os outros murganhos (Figura 8). Os níveis de hASM no cerebelo de murganhos injetados com os serótipos 2, 5 e 7 não eram maiores do que os níveis do tipo selvagem (WT) (ou seja, o fundo). Como se esperava, a ASM humana não foi detetada em murganhos de tipo selvagem – o anticorpo anti-hASM usado no ensaio de ELISA é específico para humano.

Uma ausência de proteína de ASM funcional resulta na acumulação lisossomal de esfingomielina, e em defeitos metabólicos secundários subsequentes tais como o transporte anormal de colesterol. Sama et al. Eur. J. Neurosci. **13**:1873-1880 e Leventhal et al. (2001) J. Biol. Chem. **276**:44976-4498. O acúmulo de colesterol livre no cérebro de murganhos ASMKO é visualizado usando filipina, uma molécula autofluorescente isolada de *Streptomyces filipinensis*. Os cérebros de murganhos de tipo selvagem não coram positivamente para filipina. Em todos os murganhos tratados com AAV (exceto AAV2/1- β gal) a eliminação da marcação de filipina (Tabela 4) coincidiu com regiões que eram positivas para imunomarcação de hASM, indicando que cada vetor de serótipo é capaz de gerar um produto transgénico funcional.

Tabela 4

Redução percentual da eliminação de filipina (ou seja, colesterol) em comparação a murganhos ASMKO tratados com AAV- β gal em regiões selecionadas do cérebro após injeção intracerebelar de diferentes serótipos de AAV ($n=3$ /serótipo; 2/1, 2/2, 2/5, 2/7 e 2/8) que codificam a ASM humana nos núcleos cerebelares profundos de murganhos ASMKO.

	2/1	2/2	2/5	2/7	2/8
Cerebelo	96,54 ± 2,14	93,85 ± 1,257	86,75 ± 8,58	96,47 ± 1,93	99,12 ± 0,66
Mesencéfalo	96,72 ± 1,73	63,08 ± 22,89	65,88 ± 24,53	73,39 ± 22,39	91,10 ± 0,105
Ponte de Varolio	91,31 ± 6,80	50,07 ± 21,26	70,96 ± 25,60	93,15 ± 31,20	96,72 ± 1,20
Medula oblonga	93,29 ± 6,22	88,46 ± 3,04	81,55 ± 17,31	80,73 ± 14,99	97,40 ± 1,60
Tálamo	48,88 ± 25,26	41,21 ± 27,35	34,86 ± 16,67	48,44 ± 28,66	77,03 ± 12,08
Hipotálamo	82,81 ± 10,14	88,96 ± 12,93	88,46 ± 5,90	82,95 ± 11,46	99,68 ± 0,31
Córtex	27,60 ± 24,75	73,62 ± 14,9	56,65 ± 28,89	76,97 ± 14,27	98,30 ± 0,34

Como previamente demonstrado por (Passini et al. (2003) em "Society for Neuroscience" New Orleans, LA), a eliminação de filipina também ocorreu em regiões anatomicamente ligadas ao local de injeção, mas que não marcaram positivamente para hASM. A análise de MetaMorph indicou que uma redução da marcação de filipina ocorreu ao longo de todo o eixo rostral caudal. No cerebelo e tronco cerebral, observou-se uma redução máxima de filipina em murganhos

tratados com AAV2/1-ASM e AAV2/8-ASM, enquanto no diencéfalo e no córtex cerebral, os murganhos injetados com AAV2/8-ASM tiveram o melhor nível geral de eliminação de filipina (Tabela 4). Esses resultados, no entanto, indicam que o nível de hASM necessário para corrigir a patologia de armazenamento de colesterol é mínimo no SNC de murganhos ASMKO (ou seja, abaixo do limite de detecção da imunofluorescência de hASM).

Tabela 5

Estudos histológicos indicam que os cerebelos de murganhos ASMKO sofrem rápida deterioração. Mais especificamente, as células de Purkinje morrem progressivamente entre 8 e 20 semanas de idade (Sarna et al. (2001) Eur. J. Neurosci. **13**:1813-1880 e Stewart et al. (2002) em "Society for Neuroscience" Orlando, FL). A calbindina é um marcador de células de Purkinje amplamente aceito. A marcação positiva para calbindina em murganhos tratados com AAV-ASM seria sugestiva de que a expressão de hASM mediada por AAV é terapêutica. No geral, os nossos resultados indicam que a expressão de hASM mediada por AAV no cerebelo previne a morte de células de Purkinje no murganho ASMKO (Tabela 5, Figura 9). Como se esperava, a sobrevivência de células de Purkinje não ocorreu nos lóbulos I-III; os murganhos foram injetados com 7 semanas de idade e até 8 semanas de idade a maioria dessas células já morreu. A sobrevivência de células de Purkinje nos lóbulos IV/V foi máxima em murganhos tratados com o serótipo 1. No lóbulo VI nenhuma sobrevivência significativa de células de Purkinje foi observada em murganhos tratados com AAV. No lóbulo VII apenas murganhos tratados com o serótipo 5 apresentaram significativa sobrevivência de células de Purkinje. No

lóbulo VIII novamente os murganhos tratados com o serótipo 5 assim como com o serótipo 2 apresentaram significativa sobrevivência de células de Purkinje. Nos lóbulos IX e X não foram observadas diferenças significativas entre os murganhos de tipo selvagem (WT) e com gene inativado (KO) (ou entre murganhos tratados com AAV) nas contagens de células de Purkinje. Esperava-se isso pois com 14 semanas de idade (ou seja, na idade que são sacrificados) as células de Purkinje nesses lóbulos ainda estão viáveis em murganhos ASMKO. Em todos os lóbulos a sobrevivência de células de Purkinje foi máxima em murganhos tratados com os serótipos 1, 2 e 5 e mínima em murganhos tratados com os serótipos 7 e 8. A sobrevivência de células de Purkinje (baseada na marcação de calbindina) nos lóbulos cerebelares anteriores foi maior em murganhos que foram injetados com o serótipo 1.

As contagens de células de Purkinje nos lóbulos cerebelares I-X em murganhos de tipo selvagem (WT) e ASMKO após injeção intracerebelar de diferentes serótipos de AAV ($n=3/\text{serótipo}$; 2/1, 2/2, 2/5, 2/7 e 2/8) que codificam a ASM humana nos núcleos cerebelares profundos de murganhos ASMKO. Os números que aparecem em negrito e itálico são significativamente diferentes de murganhos com gene inativado (KO) (ou seja, murganhos tratados com AAV2/1- βgal) $p \leq 0,01$.

	2/1	2/2	2/5	2/7	2/8	Com gene deletado (KO)	De tipo selvagem (WT)
I/II	7,42 ± 9,80	4,5 ± 10,58	9,40 ± 11,59	12,33 ±	1 ± 9,16	5,8 ± 11,58	113 ± 10,58

				10,58			
III	12,42 ± 10,32	11,33 ± 11,14	26,80 ± 12,21	15,33 ± 11,14	9,8 ± 12,21	2 ± 9,65	147,50 ± 11,14
IV/V	60,67 ± 17,28	38,5 ± 18,67	27,80 ± 20,45	29,66 ± 18,67	6,8 ± 20,45	8 ± 16,16	220,66 ± 18,67
VI	61,14 ± 11,21	27,5 ± 12,11	72,20 ± 13,26	31,16 ± 12,11	3.8 ± 13,26	68,6 ± 10,48	121,16 ± 12,11
VII	17,42 ± 4,15	37,66 + 4,49	40.60 ± 4,91	5,33 ± 4,49	0,2 ± 4,95	17,37 ± 3,88	7,16 ± 4,49
VIII	44,14 ± 10,75	48,88 ± 11,62	82,80 ± 12,73	11,33 + 11,62	18,40 ± 12,73	35,12 ± 10,06	110,33 ± 11,62
IX	126,28 ± 19,17	102,66 ± 20,71	136,40 ± 22,68	60,16 ± 20,71	84,40 ± 22,68	108,0 ± 17,93	144 ± 20,71
X	89,85 ± 12,54	76,83 ± 13,65	93,80 ± 14,84	48,16 + 13,85	64,80 ± 14,84	87 ± 11,73	86,66 ± 13,55

No teste de aceleração de barra rotatória (rotarod), murganhos injetados unilateralmente com AAV2/1-ASM e AAV2/8-ASM demonstraram uma latência significativamente maior ($p<0,0009$) para cair do que murganhos ASMKO injetados com AAV2/1- β gal (Figura 10). Os murganhos injetados com o serótipo AA2/1-ASM não eram significativamente diferentes dos murganhos de tipo selvagem. Os murganhos injetados com AAV2/2-ASM e AAV2/5-ASM demonstraram uma tendência a uma maior latência para cair do que murganhos ASMKO injetados com AAV2/1- β gal; enquanto murganhos injetados com AAV2/7-

ASM não. No caso do teste de oscilação da barra rotatória, apenas os murganhos injetados com AA2/1-ASM demonstraram uma latência significativamente maior ($p<0,0001$) para cair do que murganhos injetados com AAV2/1- β gal. Nesse caso, os murganhos de tipo selvagem tiveram desempenho significativamente melhor do que os murganhos injetados com AA2/1-ASM (Figura 10). Os murganhos ASMKO que receberam injeção bilateral de AAV2/1-ASM ou AAV2/2-ASM tiveram desempenho significativamente maior ($p<0,001$) do que murganhos ASMKO tratados com AAV2/1- β gal tanto no teste de aceleração como no teste de oscilação (Figura 11). Os murganhos injetados bilateralmente com AAV2/1-ASM tiveram desempenho comparável aos murganhos de tipo selvagem em ambos os testes.

Uma maneira para determinar se a hASM gerada por AAV é funcionalmente ativa dentro do SNC de ASMKO é por avaliação da sua influência na patologia de armazenamento de colesterol - um defeito metabólico secundário da doença NPA. Em todos os murganhos tratados com AAV (com exceção de AAV2/1- β gal) a correção da patologia de armazenamento de colesterol coincidiu com regiões que eram positivas para a imunomarcação para hASM, indicando que cada vetor de serótipo é capaz de gerar um produto transgénico funcional. Como previamente demonstrado, a correção do metabolismo anormal de colesterol também ocorreu em regiões anatomicamente ligadas ao local de injeção, e também em regiões que não marcaram positivamente para hASM, sugerindo que o nível necessário de hASM para correção da patologia de armazenamento de colesterol é mínimo. Consistente com os nossos resultados histoquímicos e bioquímicos de hASM, os murganhos tratados com os serótipos 1 e 8 demonstraram uma redução marcada da patologia de armazenamento de

colesterol. Os murganhos tratados com os serótipos 2, 5 e 7 também apresentaram uma redução da patologia de armazenamento de colesterol, mas não tanto quanto os murganhos tratados com os serótipos 1 e 8.

Ao passo que as alterações da patologia de armazenamento de colesterol são ilustrativas, uma medição mais direta da atividade enzimática de hASM é através da análise dos níveis de esfingomielina, o substrato primário que se acumula nos tecidos de mamíferos com a doença de Niemann-Pick. Tecidos cerebrais de murganhos que receberam injeções bilaterais de AAV serótipos 1 e 2 foram avaliados quanto a níveis de esfingomielina (SPM) (o procedimento de homogeneização do tecido para deteção de SPM não é compatível com a deteção de hASM). Uma redução significativa ($p<0,01$) do teor tecidual de SPM no cerebelo foi observada em murganhos tratados com os serótipos 1 e 2 (Figura 12). Os níveis de teor tecidual de SPM eram também significativamente reduzidos nos cortes 2, 3 e 4 (cada corte estando a 2 mm do próximo) em murganhos injetados com o serótipo 1 mas não em murganhos injetados com o serótipo 2.

Os murganhos ASMKO que receberam injeções intracerebelares bilaterais de AAV serótipos 1 e 2 codificando a hASM apresentaram uma redução significativa do armazenamento de esfingomielina no cerebelo. Como observado com a acumulação de armazenamento de colesterol, uma redução significativa do armazenamento de esfingomielina também ocorreu em regiões fora do cerebelo em murganhos ASMKO bilateralmente tratados com AAV1.

Em geral, esses resultados indicam que é preferível AAV1 do que os serótipos 2, 5, 7 e 8, em termos de sua capacidade relativa de iniciar a expressão enzimática, corrigir a patologia de armazenamento no cérebro, prevenir a neurodegeneração (por exemplo, por prevenção da morte de células de Purkinje) e melhorar o resultado funcional motor. Ademais, o DCN pode ser explorado como um local de injeção para maximizar a expressão enzimática no SNC.

Para avaliar a distribuição da expressão transgénica após injeção dos vetores AAV no DCN, G93A SOD1 (murganho mutante SOD1^{G93A}, chamado aqui de murganho SOD1) foram injetados com vetores AAV recombinantes codificando a proteína verde fluorescente (GFP). Um grupo de murganhos foi injetado com AAV serótipo 1 codificando a proteína verde fluorescente (AAV1-GFP) enquanto outro grupo foi injetado com AAV serótipo 2 codificando a proteína verde fluorescente (AAV2-GFP).

Os murganhos foram injetados bilateralmente no DCN com os vetores AAV recombinantes usando métodos similares aos descritos acima. A dose foi de cerca de 2,0 e10 gc/ml injetada por local. Os murganhos foram sacrificados cerca de 110 dias após o nascimento e seus cérebros e medulas espinais foram analisados quanto à marcação de GFP.

Observou-se distribuição de proteína verde fluorescente nas regiões do tronco cerebral (ver a Figura 14) e da medula espinal (ver a Figura 15) após administração ao DCN de AAV codificando a proteína verde fluorescente (GFP). A marcação de GFP foi observada também no DCN assim como nos bulbos olfatórios, córtex cerebral, tálamo, tronco cerebral, córtex cerebelar e medula espinal. Todas essas regiões

recebem projeções de e/ou enviam projeções para o DCN (ver a Figura 16).

A especificação é melhor entendida à luz dos ensinamentos das referências citadas na especificação. As formas de realização da especificação providenciam uma ilustração das formas de realização da invenção e não devem ser entendidas como limitativas do âmbito da invenção. O perito na técnica reconhece prontamente que muitas outras formas de realização são abrangidas pela invenção. Todas as publicações, patentes e sequências biológicas citadas nesta revelação são incorporadas por referência na sua totalidade. Na medida em que o material incorporado por referência contradiga ou seja inconsistente com a presente especificação, a presente especificação substituirá tal material. A citação de quaisquer referências neste documento não significa uma admissão de que tais referências representem uma técnica anterior da presente invenção.

Salvo indicação em contrário, todos os números expressando quantidades de ingredientes, culturas de células, condições de tratamento e assim por diante usados na especificação, incluindo reivindicações, devem ser entendidos como sendo modificados em todos os casos pelo termo "cerca de". Em conformidade, salvo indicação em contrário, os parâmetros numéricos são aproximações e podem variar dependendo das propriedades desejadas que pretendem ser obtidas pela presente invenção. Salvo indicação em contrário, o termo "pelo menos" precedendo uma série de elementos, deve ser entendido como referindo-se a cada elemento da série. Os peritos na técnica reconhecerão, ou serão capazes de determinar usando não mais do que experimentação de rotina,

muitos equivalentes das formas de realização específicas da invenção aqui descrita. Tais equivalentes destinam-se a ser englobados pelas seguintes reivindicações.

As modalidades preferenciais da presente invenção são divulgadas abaixo e são chamadas de modalidade E1 até modalidade E32.

E 1. Um método compreendendo: a administração de uma composição compreendendo um vetor AAV que codifica uma molécula biologicamente ativa em um local no sistema nervoso central comprometido por uma doença de um mamífero, em condições nas quais os referidos vetores AAV injetados transduzem células localizadas em um local distal no sistema nervoso central e a referida molécula biologicamente ativa codificada é traduzida.

E 2. O método de E 1, em que a molécula biologicamente ativa traduzida é então expressa.

E 3. O método de E 1, em que o mamífero tem uma doença de armazenamento lisossomal ou metabolismo anormal de colesterol.

E 4. O método de E 3, em que a doença de armazenamento lisossomal é a doença A de Niemann-Pick.

E 5. O método de E 1, em que o mamífero é humano.

E 6. O método de E 1, em que local distal é contralateral ao local de administração.

E 7. O método de E 1, em que o local de administração se encontra numa região do SNC selecionada do grupo consistindo da medula espinal, tronco cerebral, hipocampo, corpo estriado, medula oblonga, ponte de Varólio, mesencéfalo, cerebelo, tálamo, hipotálamo, córtex cerebral, lobo occipital, lobo temporal, lobo parietal e lobo frontal.

E 8. O método de E 1, em que o local de administração se encontra no hipocampo e o local distal se encontra numa região do cérebro selecionada do grupo consistindo do giro denteado contralateral e CA3 contralateral, e septo mediano e córtex entorrinal.

E 9. O método de E 1, em que o local de administração se encontra numa região do cérebro selecionada do grupo consistindo do corpo estriado e cerebelo, e o local distal se encontra numa região do cérebro selecionada do grupo consistindo de substância negra e medula oblonga.

E 10. O método de E 9, em que o local de administração é nos núcleos cerebelares profundos do cerebelo.

E 11. O método de E 1, em que o vetor AAV tem um capsídeo de AAV serótípico 1.

E 12. O método de E 3 ou 4, em que o vetor AAV tem um capsídeo de AAV serótípico 1.

E 13. O método de E 10, em que o vetor AAV tem um capsídeo de AAV serótípico 1.

E 14. O método de E 1, em que o vetor AAV é AAV1 ou AAV2/1.

E 15. O método de E 3 ou 4, em que o vetor AAV é AAV1 ou AAV2/1.

E 16. O método de E 10, em que o vetor AAV é AAV1 ou AAV2/1.

E 17. O método de E1, compreendendo adicionalmente a administração de uma composição em um segundo local no SNC do mamífero, em que a composição compreende um vetor AAV compreendendo um polinucleotídeo que codifica um produto que é uma molécula biologicamente ativa.

E 18. O método de E 17, em que o segundo local de administração é contralateral ao primeiro local de administração.

E 19. O método de E 2, em que a molécula biologicamente ativa é uma hidrolase lisossomal.

E 20. O método de E 19, em que a hidrolase lisossomal é qualquer uma das hidrolases lisossomais listadas na Tabela 1.

E 21. O método de E 20, em que a hidrolase lisossomal é a esfingomielinase ácida.

E 22. O método de E 1, em que o local de administração é nos núcleos cerebelares profundos e o local distal é a medula espinal.

E 23. O método de E 1, em que a distância entre o local de administração e o local distal é de pelo menos 2 mm.

E 24. O método de E 1, em que a concentração do vetor AAV na composição é de pelo menos 5 X 10¹² gp/ml.

E 25. Um método compreendendo: a administração de uma composição compreendendo um vetor AAV que codifica uma molécula metaloendopeptidase em um local no sistema nervoso central de um mamífero com a doença de Alzheimer, em condições nas quais os referidos vetores AAV injetados transduzem células localizadas em um local distal no sistema nervoso central e a referida metaloendopeptidase codificada é expressa.

E 26. O método de E 25, em que a metaloendopeptidase é selecionada do grupo consistindo em neprilisina, insulisia e timet oligopeptidase.

E 27. O método de E 1 ou 25, em que o vetor AAV é selecionado do grupo consistindo em AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 e AAV8.

E 28. O método de E 25, em que a distância entre o local de administração e o local distal é de pelo menos 2 mm.

E 29. O método de E 25, em que a concentração do vetor AAV na composição é de pelo menos 5 X 10¹² gp/ml.

E 30. O método de E 29, em que o AAV é selecionado do grupo consistindo em AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 e AAV8.

E 31. O método de E 29, em que o AAV é um vetor AAV recombinante.

E 32. O método de E 29, em que o vetor AAV recombinante é selecionado do grupo consistindo em vetores dos serótipos AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 e AAV2/8.

Lisboa, 6 de setembro de 2016

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição compreendendo um vetor viral adeno-associado (AAV) que codifica uma molécula biologicamente ativa, em que o vetor AAV é um vetor de serótipo AAV2/7 ou AAV2/8, para utilização em um método de tratamento de uma doença de armazenamento lisossomal num mamífero, em que o método compreende a administração da composição num local de administração no sistema nervoso central do mamífero, em que o vetor transduz uma célula localizada num local distal no sistema nervoso central, e em que a molécula biologicamente ativa codificada é traduzida.
2. A composição da reivindicação 1, em que a distância entre o local de administração e o local distal é de pelo menos 2 mm.
3. A composição de qualquer uma das reivindicações precedentes, em que local distal é contralateral ao local de administração.
4. A composição de qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a doença de armazenamento lisossomal é a doença A de Niemann-Pick.
5. A composição de qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o mamífero é humano.
6. A composição de qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a molécula biologicamente ativa traduzida é expressa.

7. A composição da reivindicação 6, em que a molécula biologicamente ativa é uma hidrolase lisossomal.
8. A composição da reivindicação 7, em que a hidrolase lisossomal é qualquer uma das hidrolases lisossomais listadas na Tabela 1.
9. A composição da reivindicação 8, em que a hidrolase lisossomal é a esfingomielinase ácida.
10. A composição de qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a concentração do vetor AAV na composição é de pelo menos 5×10^{12} gp/ml.
11. A composição de qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o método compreende adicionalmente a administração de uma composição em um segundo local de administração no sistema nervoso central do mamífero, em que a composição compreende um vetor AAV compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma molécula biologicamente ativa.
12. A composição da reivindicação 11, em que o segundo local de administração é contralateral ao primeiro local de administração.
13. Uma composição compreendendo um vetor viral adeno-associado (AAV) que codifica uma metaloendopeptidase, em que o vetor AAV é um vetor de serótipo AAV2/7 ou AAV2/8, para utilização em um método de tratamento da doença de Alzheimer num mamífero, em que o método compreende a administração da composição num local de administração no sistema nervoso central do mamífero,

em que o vetor transduz uma célula localizada num local distal no sistema nervoso central, e em que a metaloendopeptidase codificada é expressa.

14. A composição da reivindicação 13, em que a metaloendopeptidase é selecionada do grupo consistindo em neprilisina, insulisinase e timet oligopeptidase.
15. A composição da reivindicação 13 ou 14, em que a distância entre o local de administração e o local distal é de pelo menos 2 mm.
16. A composição de qualquer uma das reivindicações 13 a 15, em que a concentração do vetor AAV na composição é de pelo menos 5×10^{12} gp/ml.
17. A composição de qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o local de administração é nos núcleos cerebelares profundos do cerebelo.

Lisboa, 6 de setembro de 2016

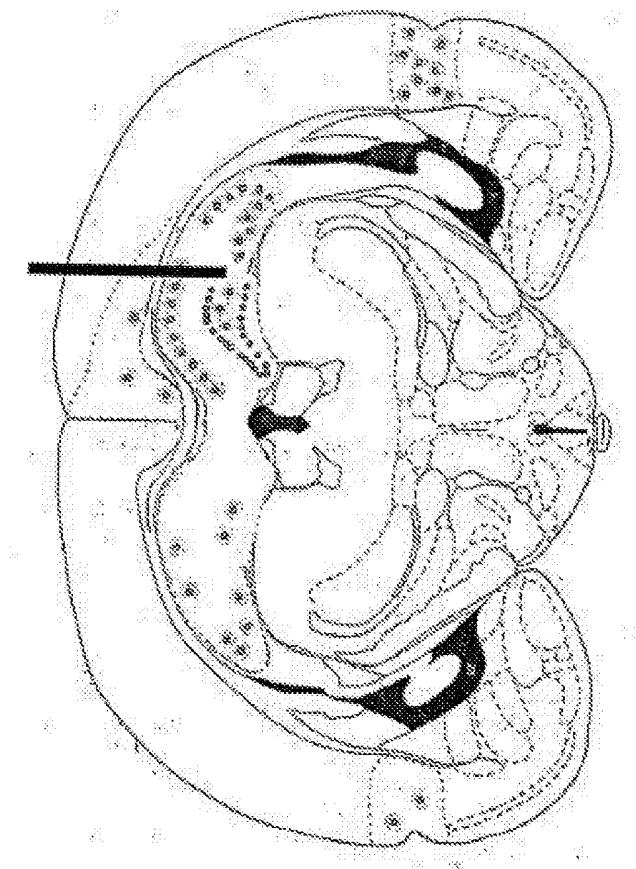


FIG. 1A

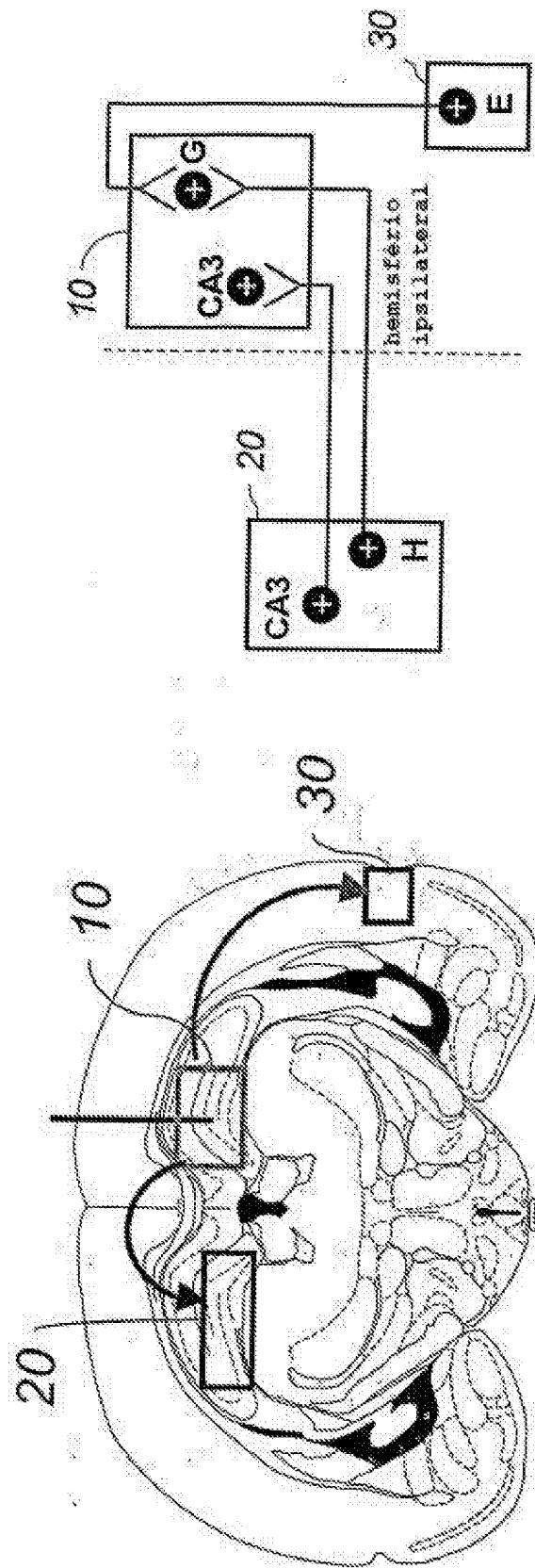


FIG. 1C

FIG. 1B

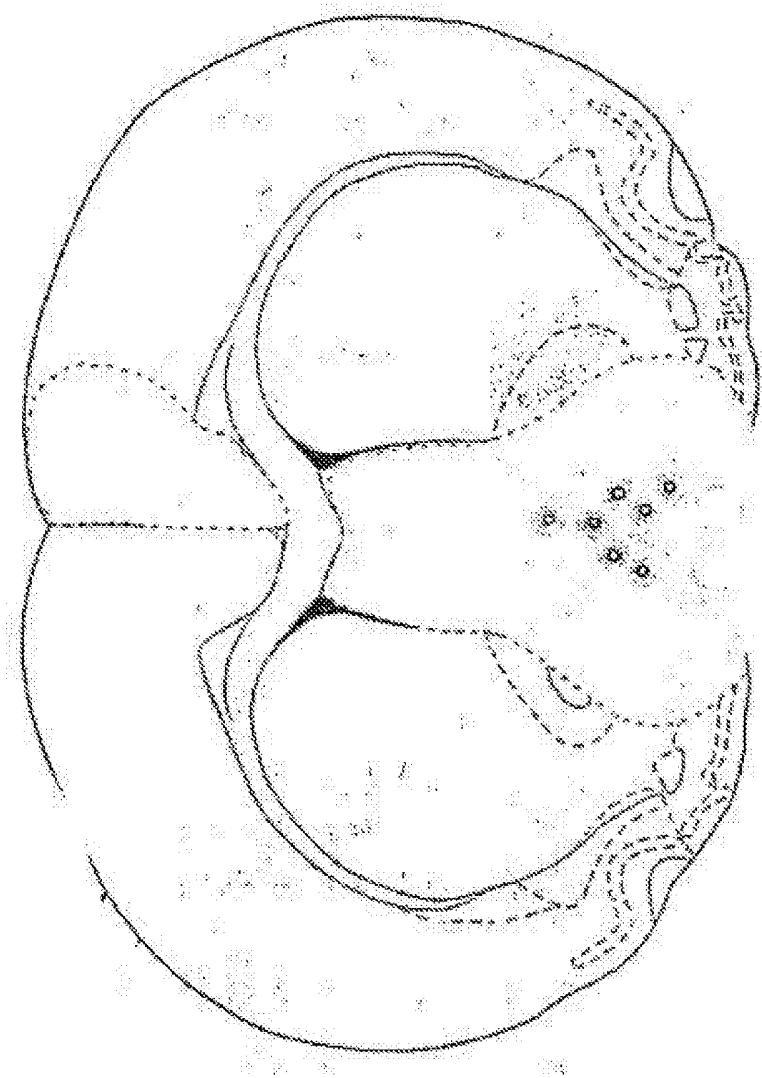


FIG. 2A

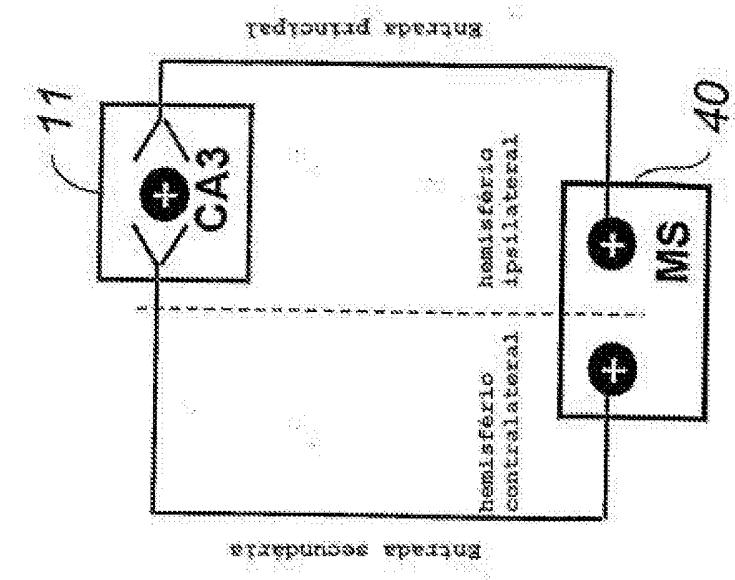


FIG. 2C

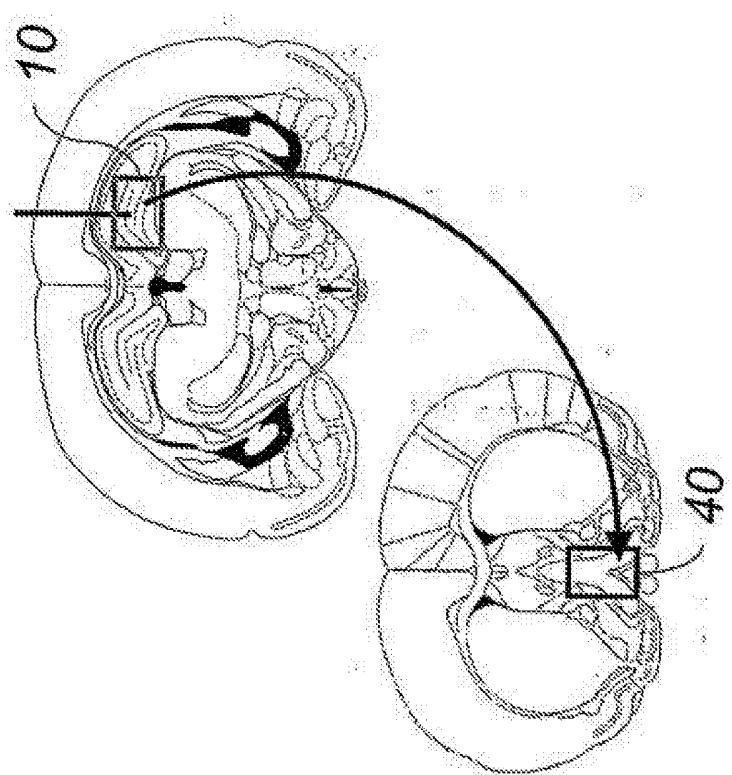
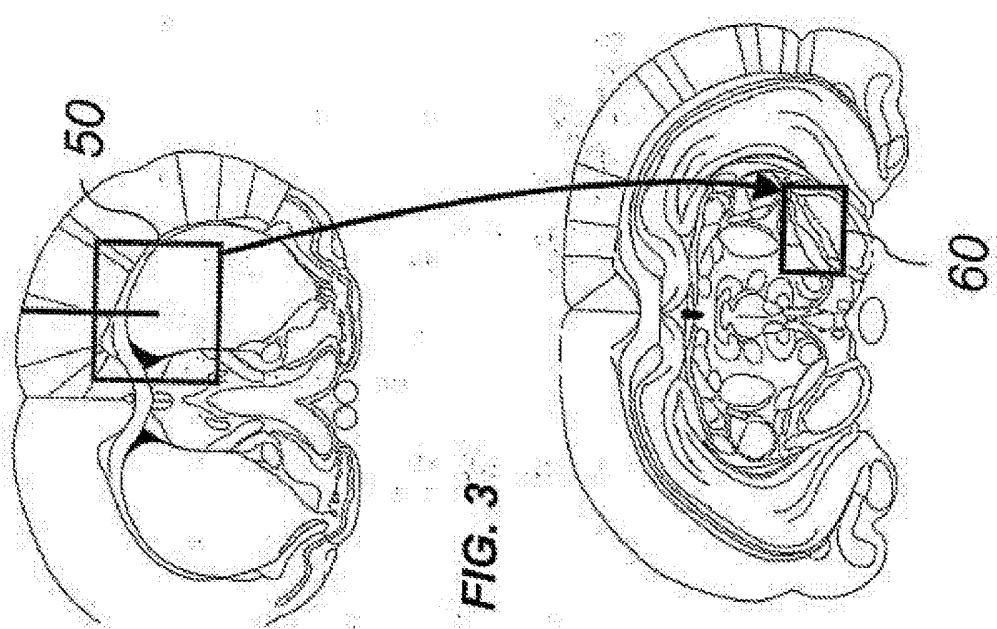
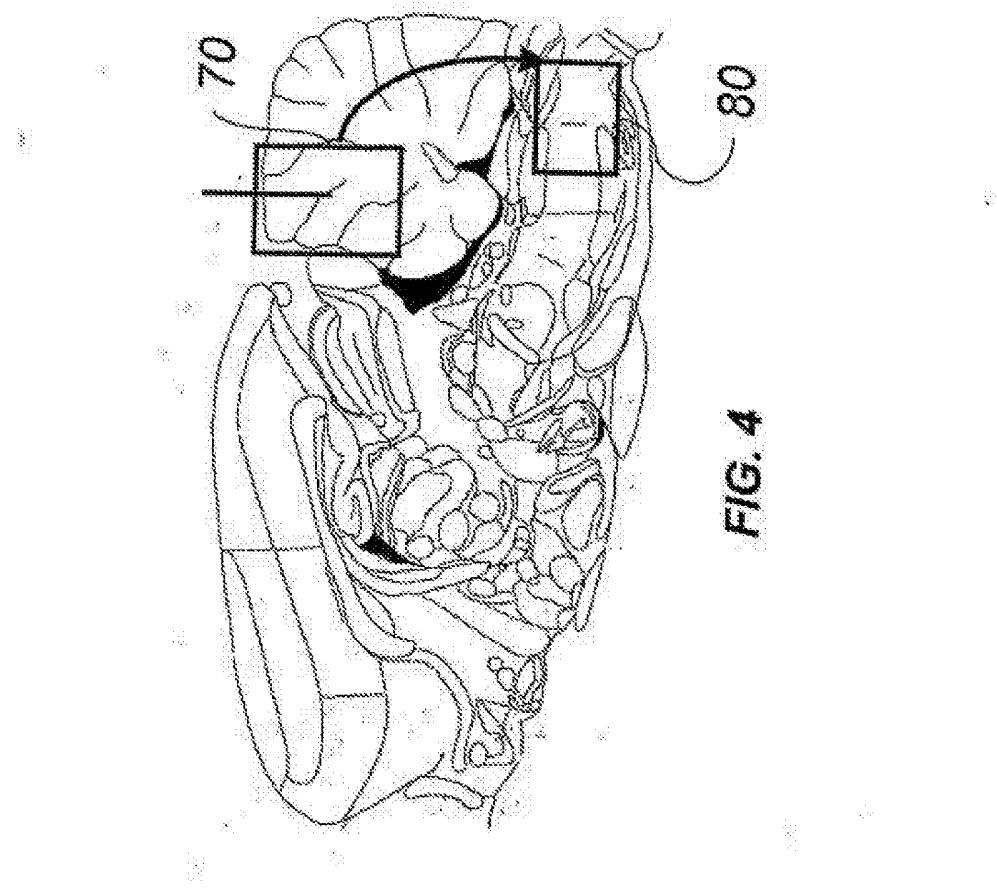


FIG. 2B



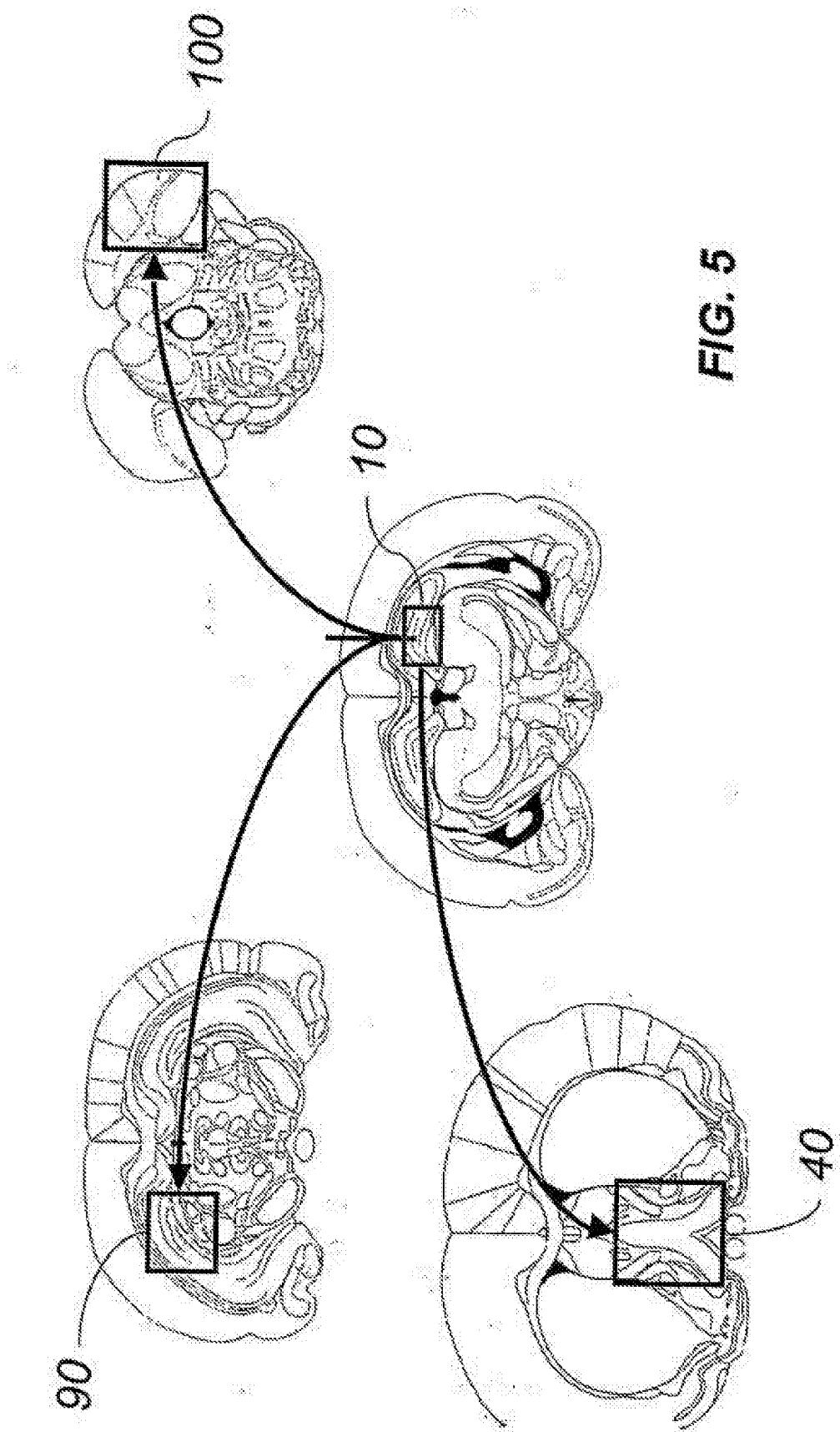
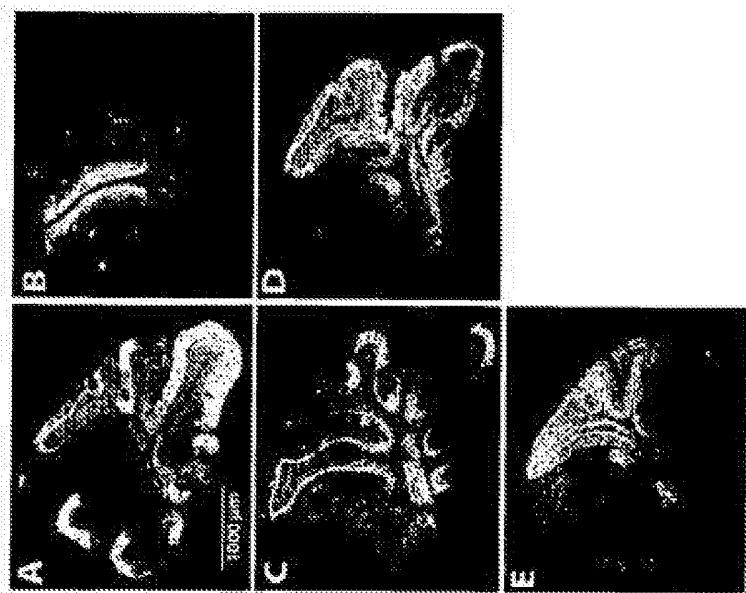


Figura 6



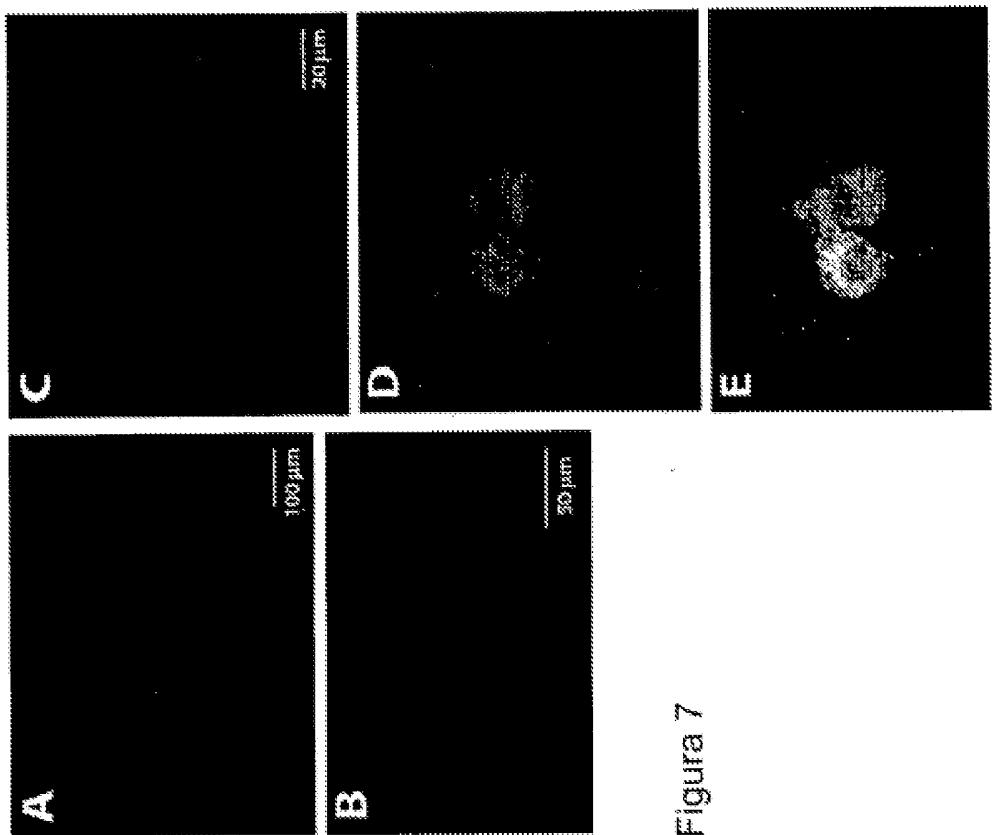


Figura 7

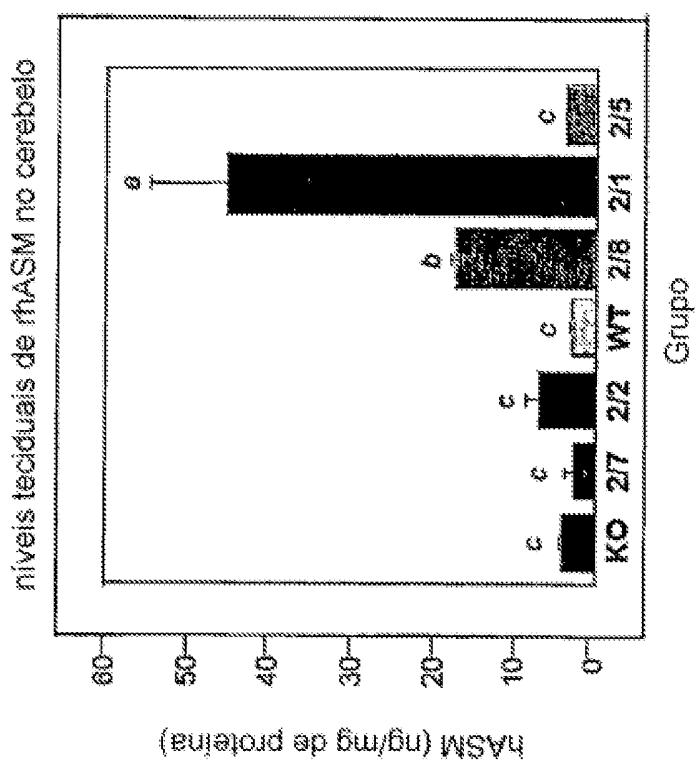


Figura 8

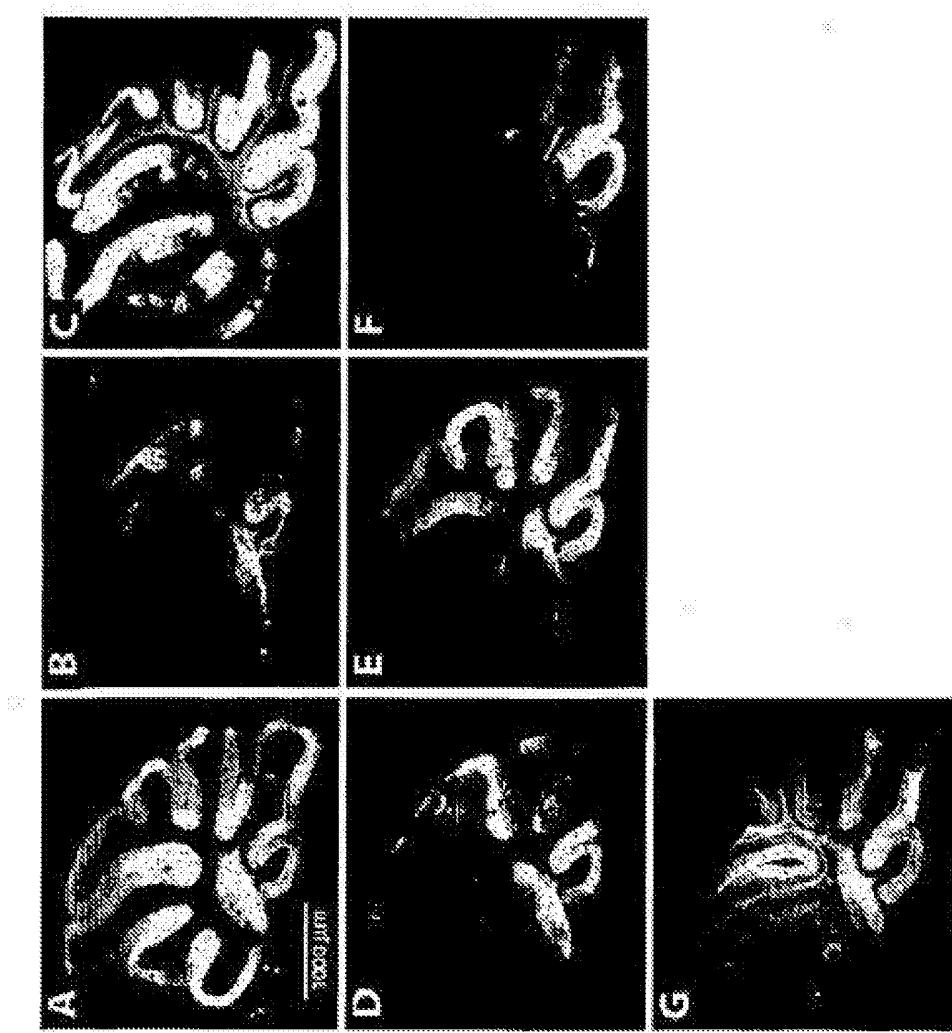


Figura 9

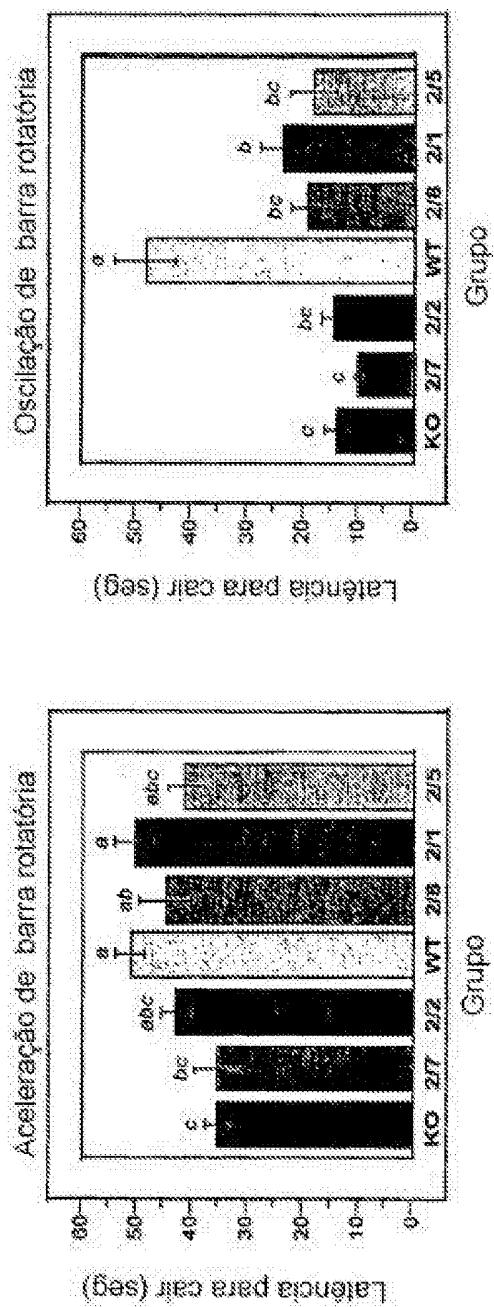
**FIGURA 10**

Figura 3

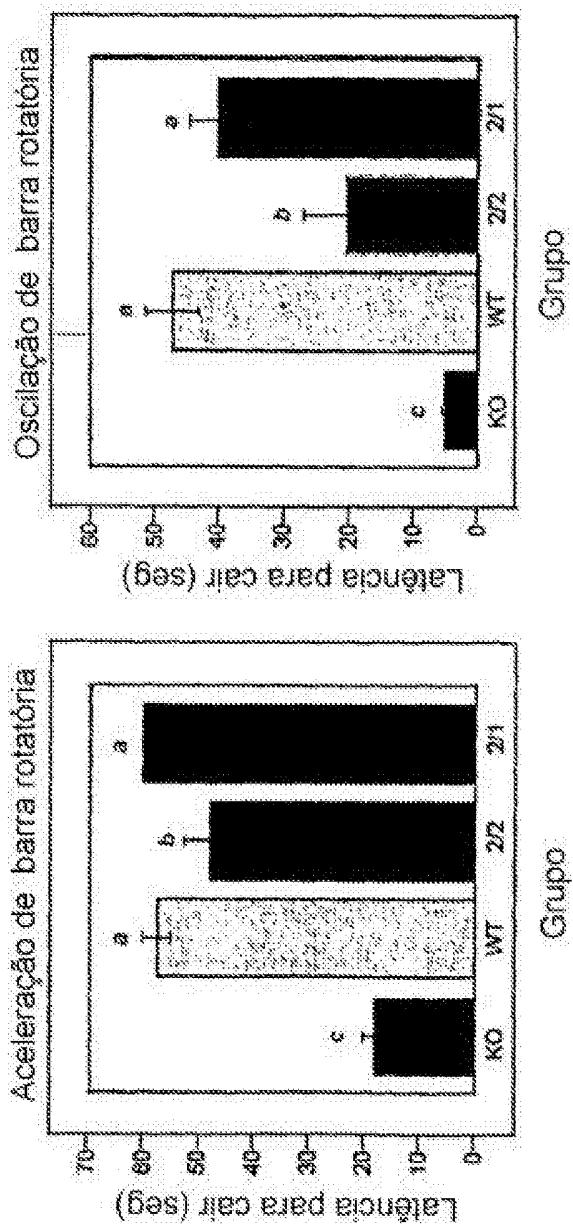


FIGURA 11

Figura 8

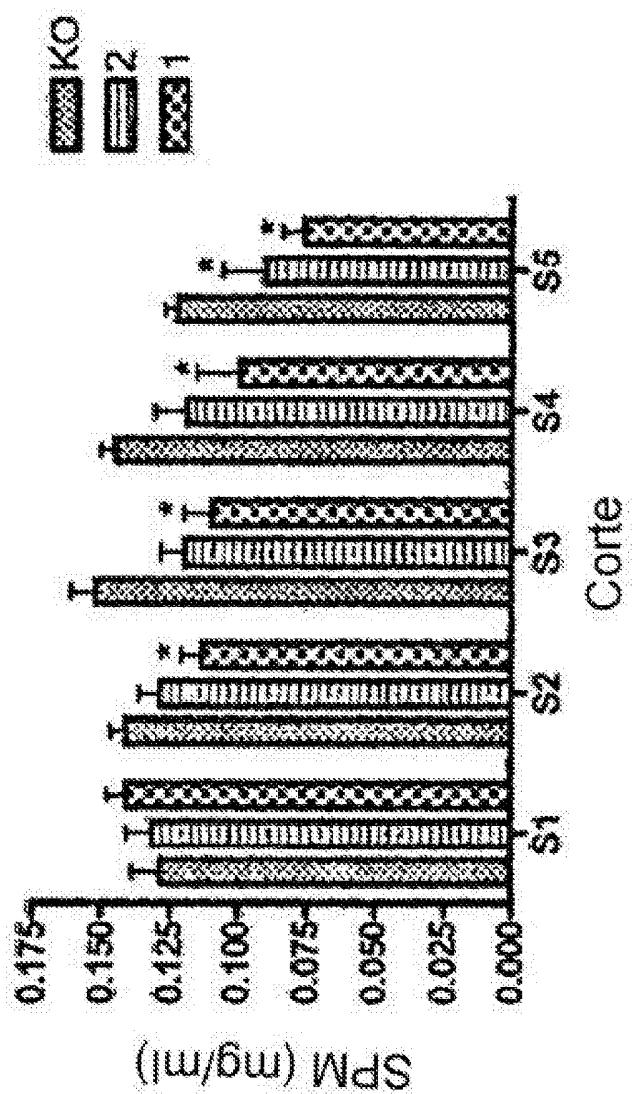


FIGURA 12

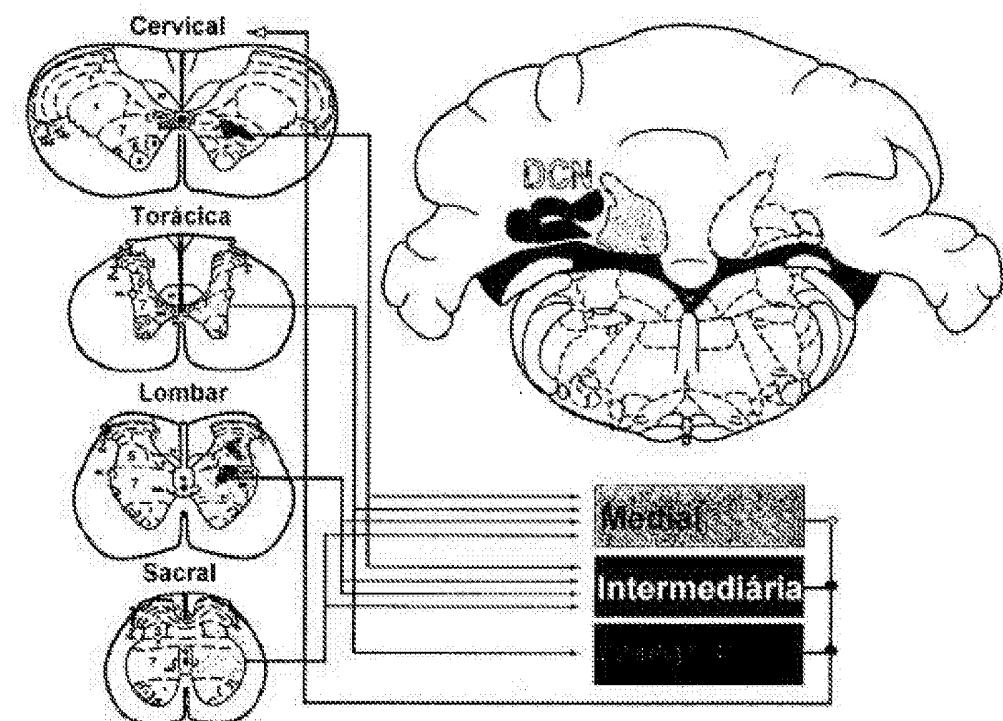
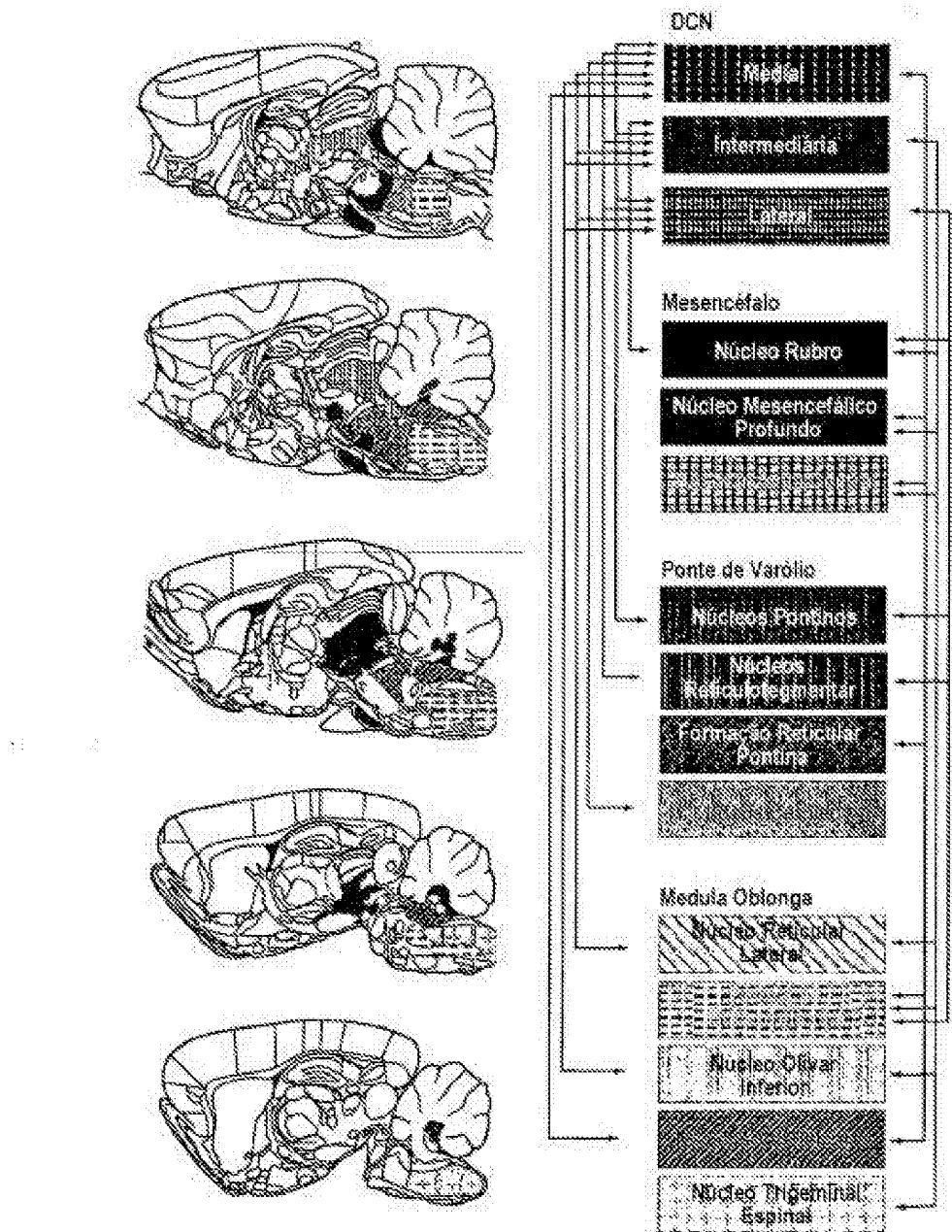
Figura 13A

Figura 13B

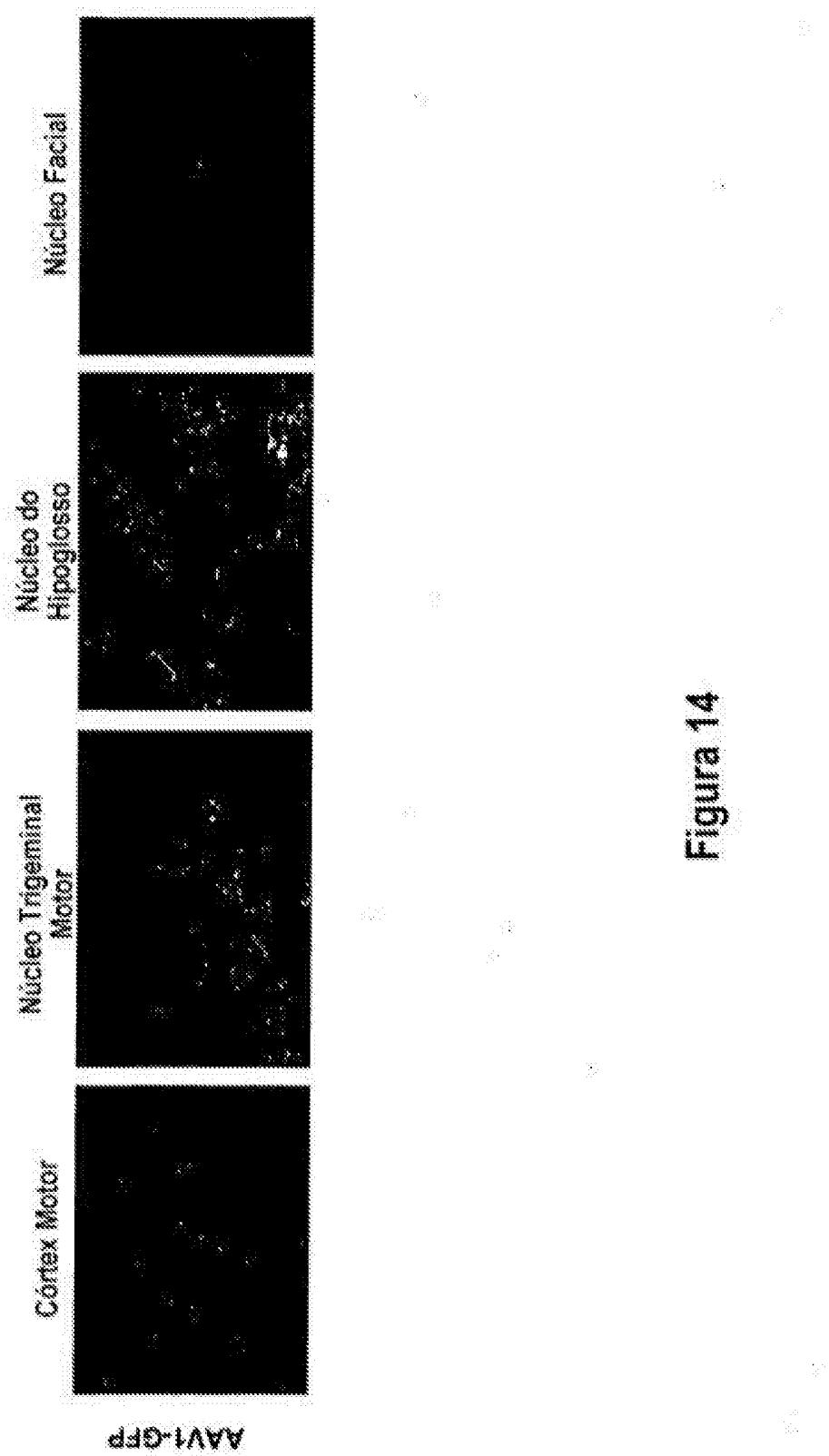


Figura 14

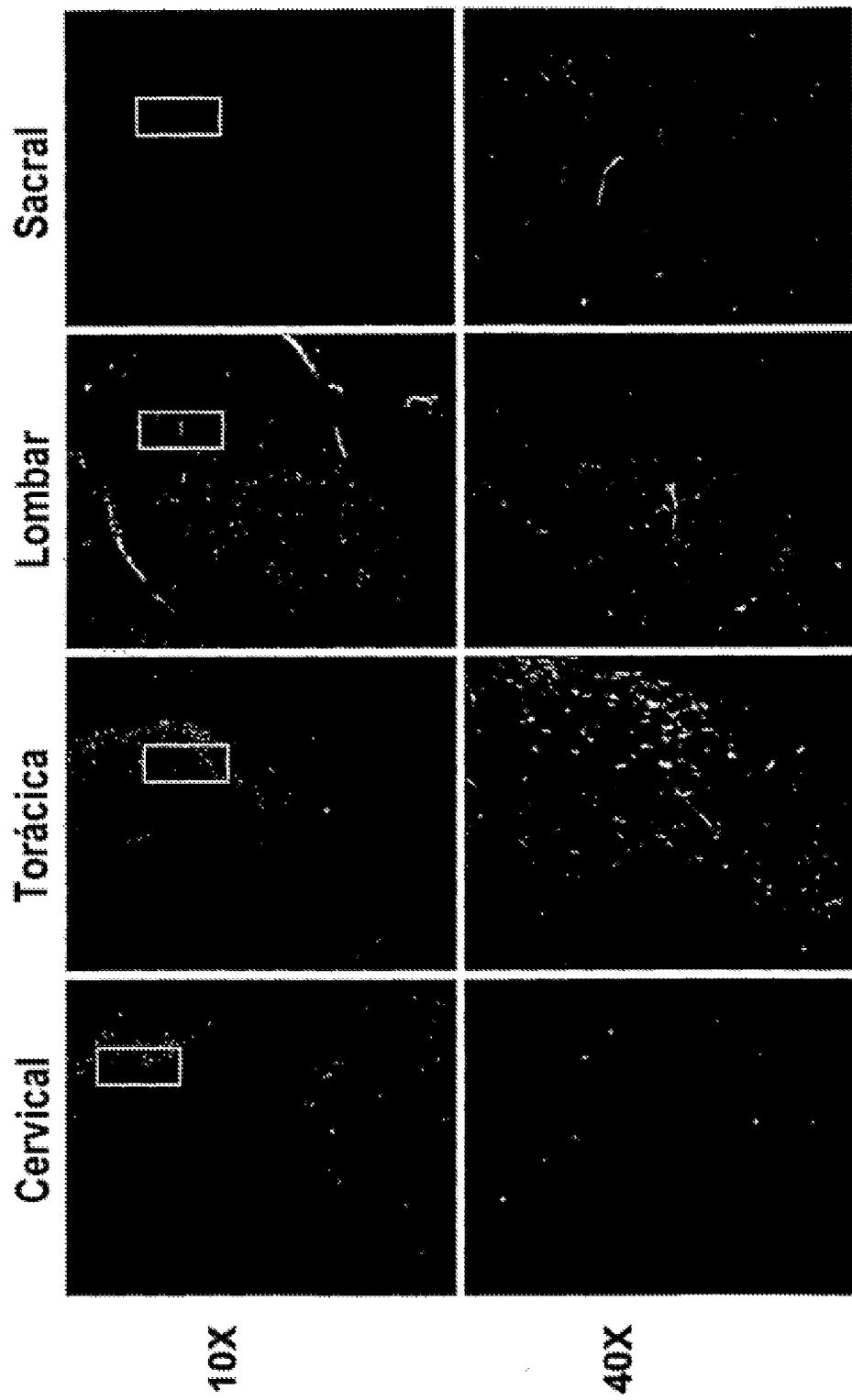


Figura 15

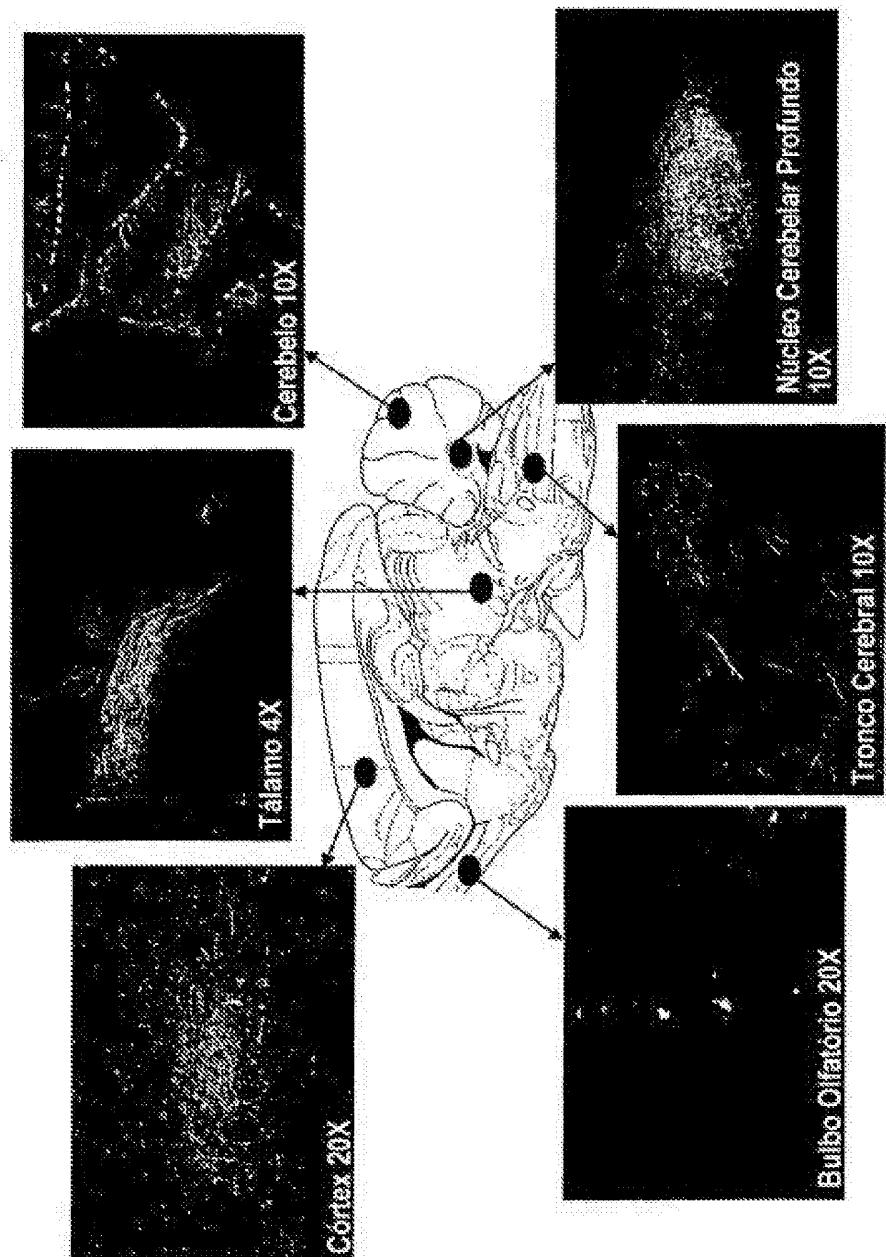


Figura 16