



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 799**

51 Int. Cl.:
A61K 38/47 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98956290 .5**
86 Fecha de presentación : **29.10.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **1027069**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2000**

54 Título: **Terapia génica para la enfermedad de Gaucher.**

30 Prioridad: **29.10.1997 US 63527 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73 Titular/es: **GENZYME CORPORATION**
One Mountain Road
Framingham, Massachusetts 01701, US

72 Inventor/es: **Yew, Nelson, S.;**
Ziegler, Robin, J. y
Cheng, Seng, H.

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 268 799 T3

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

ES 2 268 799 T3

DESCRIPCIÓN

Terapia génica para la enfermedad de Gaucher.

5 La presente solicitud es una continuación en parte de la Solicitud Estadounidense de Patente con Serial No. 60/063.527 presentada el 29 de octubre de 1997, cuya divulgación se incorpora aquí por referencia.

Antecedentes de la invención

10 Las enfermedades por almacenamiento lisosomal son un grupo de más de 40 desórdenes que son el resultado de defectos en los genes que codifican a las enzimas que descomponen a los productos de desecho de los glicolípidos o de los polisacáridos dentro de los lisosomas de las células. Los productos enzimáticos, por ejemplo azúcares y lípidos, se reciclan entonces en nuevos productos. Cada uno de estos desórdenes resulta de un rasgo recesivo enlazado con X o de un rasgo autosómico heredado que afecta los niveles de enzimas en el lisosoma. Generalmente, no existe actividad biológica o funcional de las enzimas afectadas en las células y tejidos de los individuos afectados. La Tabla 1 provee una lista de enfermedades representativas por almacenamiento y el defecto enzimático asociado con las enfermedades. En tales enfermedades la deficiencia en la función enzimática crea una deposición sistemática progresiva de sustrato lipídico o de carbohidratos en los lisosomas de las células del organismo, causando eventualmente pérdida de la función orgánica y la muerte. La etiología genética, las manifestaciones clínicas, la biología molecular y la posibilidad de enfermedades por almacenamiento lisosomal se detallan en Scriver y colaboradores, eds., *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7th Ed., Vol. II, McGraw Hill, (1995).

TABLA I

25 *Enfermedades por almacenamiento lisosomal y defectos enzimáticos asociados*

Enfermedad	Defecto Enzimático
Enfermedad de Pompe	ácido α -glucosidasa (maltasa ácida)
MPSI* (Enfermedad de Hurler)	α -L-iduronidasa
MPSII (Enfermedad de Hunter)	iduronato sulfatasa
MPSIII (Síndrome Sanfilipo)	heparán N-sulfatasa
MPS IV (Síndrome de Morquio A)	Galactosa-6-sulfatasa
MPS IV (Síndrome de Morquio B)	ácido β -galactosidasa
MPS VII (Enfermedad de Sly)	B-glucuronidasa
Enfermedad de la célula-I	N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa
Enfermedad de Schindler	α -N-acetilgalactosaminidasa (α -galactosidasa B)
Enfermedad de Wolman	lipasa ácida
Enfermedad por almacenamiento de ésteres de colesterol	lipasa ácida
Enfermedad de Farber	ceramidasa ácida lisosomal
Enfermedad de Niemann-Pick	ácido esfingomielinasa
Enfermedad de Gaucher	β -glucosidasa (glucocerebrosidasa)
Enfermedad de Krabbe	galactosilceramidasa
Enfermedad de Fabry	α -galactosidasa A
Gangliosidosis GM1	ácido β -galactosidasa
Galactosialidosis	β -galactosidasa y neuraminidasa
Enfermedad de Tay-Sach	hexosaminidasa A
Enfermedad de Sandhoff	hexosaminidasa A y B
*MPS = mucopolisacaridosis	

Como representante de la clase de enfermedades por almacenamiento lisosomal, la Enfermedad de Fabry es un desorden recesivo heredado enlazado a X, causado por una deficiencia en la enzima lisosomal α -galactosidasa A. La ausencia de esta hidrolasa lisosomal resulta en una deposición progresiva del glicoesfingolípido globotriasilceramida (GL3), o la galactosil-(α 1->4)-galactosil-(β 1->4)-glucosil-(β 1->1')-ceramida, en la mayoría de tejidos de los tejidos del cuerpo. Los depósitos birrefringentes de GL3 se encuentran principalmente en el endotelio vascular. La acumulación progresiva en el endotelio de GL3, conduce a isquemia y a infarto en órganos tales como el riñón, el corazón o el cerebro, causando dolor muy agudo, falla del riñón, enfermedad cardíaca y cerebrovascular. La edad promedio de muerte para un individuo afectado de complicaciones renal, cardíaca y/o cerebral de la enfermedad vascular, es 41 años. No existen tratamientos efectivos actualmente disponibles para esta enfermedad (Ver, por ejemplo, Desnick y colaboradores, en Scriver y colaboradores, eds. *The Molecular Basis of Inherited Disease*, 7th Ed., Capítulo 89, páginas 2741-2784, McGraw Hill (1995)).

La α -galactosidasa A humana (α -D-galactósido galactohidrolasa; α -gal A; EC 3.2.1.22) es una exoglicosidasa lisosomal codificada por un gen sobre Xq22. Un ADNc de hígado humano que codifica para α -galactosidasa A fue aislado de una genoteca de expresión λ gt11 (Calhoun y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 82:7364-7368 (1985)). El ADNc aislado codifica la secuencia madura de aminoácidos de α -galactosidasa A pero no contenía la secuencia completa del péptido señal de la forma precursora (Bishop y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 83:4859-4863 (1986)). Este clon parcial de ADNc fue utilizado entonces para construir un vector *E. coli* de expresión de con la secuencia de codificación para la α -galactosidasa A bajo el control del promotor *trp* (Hantzopoulos y colaboradores, *Gene* 57:159-169 (1987)). Se aisló posteriormente un clon genómico que transportó al promotor y al primer exón de la proteína que incluye al péptido señal completo (Quinn y colaboradores, *Gene* 58:177-188 (1987)). Además, los clones de ADNc de longitud completa, aislados de fibroblastos humanos se obtuvieron y utilizaron para obtener la expresión transitoria de la α -galactosidasa A en células COS (Tsuji y colaboradores, *Eur. J. Biochem.* 165:275-280 (1987)). Recientemente, se ha elaborado un ratón transgénico inactivado de Fabry que demuestra una deficiencia en esta actividad enzimática (Ohshima y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 94:2540-2544 (1997) que muestra una carencia completa de actividad de α -galactosidasa A). El análisis lipídico del hígado y los riñones de los ratones inactivados reveló una marcada acumulación de GL3 con el tiempo, indicando la similitud del proceso patofisiológico en los ratones mutantes y en pacientes con la enfermedad de Fabry. *Id.* Por lo tanto, los ratones inactivados de Fabry proveen un excelente modelo para la enfermedad humana.

De Duve sugirió primero que el reemplazo de la enzima lisosomal perdida con una enzima exógena biológicamente activa puede ser una aproximación viable para el tratamiento de las enfermedades por almacenamiento lisosomal. De Duve, *Fed. Proc.* 23:1045 (1964). A partir de ese momento, diferentes estudios han sugerido que la terapia de reemplazo enzimático puede ser benéfica para el tratamiento de diferentes enfermedades por almacenamiento lisosomal. El mejor éxito se ha mostrado con individuos con enfermedad de Gaucher tipo I, quienes han sido tratados con enzima exógena (β -glucocerebrosidasa), preparada a partir de placenta (Ceredase[®]) o, más recientemente, en forma recombinante (Cerezyme[®]). Se ha sugerido que el reemplazo enzimático puede también ser beneficioso para tratar la enfermedad de Fabry, así como otras enfermedades por almacenamiento lisosomal. Ver, por ejemplo, Dawson y colaboradores, *Ped. Res.* 7(8):684-690 (1973) (*in vitro*) y Mapes y colaboradores, *Science* 169:987 (1970) (*in vivo*). Se han reportado ensayos clínicos de la terapia de reemplazo enzimático para pacientes con Fabry utilizando infusiones de plasma normal (Mapes y colaboradores, *Science* 169:987-989 (1970)); de α -galactosidasa A purificada a partir de placenta (Brady y colaboradores, *N. Eng. J. Med.* 279:1163 (1973)); o de α -galactosidasa A purificada a partir de bazo o de plasma (Desnick y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 76:5326-5330 (1979)) demostrada la efectividad bioquímica del reemplazo enzimático directo para la enfermedad de Fabry. Estos estudios indican el potencial para eliminar, o reducir significativamente, el almacenamiento patológico de glicolípido por medio de reemplazo enzimático repetido. Por ejemplo, en un estudio (Desnick y colaboradores, *supra.*), la inyección intravenosa de enzima purificada resultó en una reducción transitoria en los niveles en plasma del sustrato lipídico almacenado, globotriasilceramida.

Sin embargo, hasta la fecha, la efectividad bioquímica y clínica del reemplazo enzimático en la enfermedad de Fabry, así como en otras enfermedades por almacenamiento lisosomal, no se ha demostrado debido a la carencia de suficiente enzima humana para dosis adecuadas y evaluación a largo plazo.

Por lo tanto, existe la necesidad en el arte de métodos para proveer cantidades suficientes de enzimas lisosomales biológicamente activas, tales como α -galactosidasa A humana, para células con deficiencia. Adicionalmente, existe la necesidad de nuevas composiciones de vectores que permitan una transferencia eficiente de genes que codifiquen enzimas lisosomales, tales como α -galactosidasa A, para células con deficiencia y al mismo tiempo dirijan la expresión del gen transferido. Recientemente, las aproximaciones recombinantes han intentado dirigir estas necesidades, ver, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.658.567 publicada el 19 de agosto de 1997 sobre Terapia recombinante con alfa-galactosidasa A para la enfermedad de Fabry: patente estadounidense No. 5.580.757 publicada el 3 de diciembre de 1996 sobre Clonación y Expresión de α -galactosidasa A Biológicamente Activa como Proteína de Fusión; Bishop, D.F. y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA. 83:4859-4863, (1986); Medin, J.A. y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA. 93:7917-7922, (1996); Novo, F.J., *Gene Therapy*. 4:488-492, (1997); Ohshima, T. y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA. 94:2540-2544, (1997); y Sugimoto Y. y colaboradores, *Human Gene Therapy*. 6:905-915, (1995). Además, en la Solicitud Estadounidense de Patente aprobada con Serial No. 08/466.597, presentada el 6 de junio de 1995; se mostró que los vectores de expresión retroviral que contienen un gen que codifica β -glucocerebrosidasa humana infectan a células madre hematopoyéticas antólogas, que cuando se transplanta nuevamente a paciente con Gaucher proveen una producción sostenida de enzima biológicamente activa al paciente.

Hasta la fecha, sin embargo, no existe una composición de un vector que haya probado ser capaz de transducción y de expresión sostenida del gen de la α -galactosidasa A humana, o la mayoría de los otros genes que codifican las enzimas lisosomales para las células que son deficientes en esta. La presente invención satisface estas necesidades y provee además ventajas relacionadas.

5

Resumen de la invención

Por lo tanto, la presente invención provee vectores recombinantes virales y no virales que comprenden un transgén que codifica a una enzima lisosomal humana biológicamente activa, que son capaces de infectar y/o transfección y de expresión sostenida del transgén de la enzima lisosomal humana biológicamente activa en células de mamífero deficientes en ella.

10

En particular, la presente invención provee el Uso de un vector seleccionado del grupo de los adenovirus, virus adeno asociados (VAA), vacunas, virus del herpes, bacteriófagos, cósmidos, vectores de hongos para la preparación de un medicamento para tratar la enfermedad por almacenamiento lisosomal, en donde la enfermedad por almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Gaucher en donde el vector comprende y expresa a un transgén que codifica a una β -glucosidasa humana biológicamente activa, el vector es admitido *in vivo* por las células objetivo, el transgén se expresa allí dentro y se produce la enzima biológicamente activa *in vivo*.

15

La presente invención provee además un método para suministrar una enzima lisosomal humana biológicamente activa a las células deficientes en ella, que comprende introducir dentro de las células un vector que contiene y expresa a un transgén que codifica a la enzima lisosomal humana biológicamente activa, en donde el vector es admitido por las células, el transgén se expresa y se produce la enzima biológicamente activa. Las células pueden ser infectadas y/o transfectadas por el vector, dependiendo de si el vector es un vector viral y/o un plásmido o similar.

20

En una modalidad preferida, la presente invención provee una producción sostenida de β -glucosidasa humana biológicamente activa en células de individuos con la enfermedad de Gaucher que son deficientes en dicha enzima.

25

En otro aspecto adicional, la invención también provee un método de suministrar una enzima lisosomal humana biológicamente activa de otras células distantes deficientes en ella, en donde las células transfectadas y/o infectadas que hospedan al vector segregan la enzima biológicamente activa que luego es admitida por las otras célula deficientes. En particular, la enzima es β -glucosidasa humana y las células son aquellas de un individuo con la enfermedad de Gaucher.

30

En un aspecto adicional más, la enzima biológicamente activa β -glucosidasa se segrega dentro de la circulación de un individuo (por ejemplo, un individuo con la enfermedad de Gaucher).

35

La presente invención también provee un vector adenoviral suprimido de E1 recombinante y un vector plásmido de expresión de recombinante los cuales contienen y expresan a un transgén que codifica β -glucosidasa.

40

La presente invención provee además un método para suministrar una β -glucosidasa humana biológicamente activa a las células de un individuo con la enfermedad de Gaucher que comprende la introducción dentro de las células de un individuo con la enfermedad de Gaucher de una cantidad de un vector de acuerdo con la presente invención, efectivo para infectar y para la expresión sostenida del transgén de la β -glucosidasa humana biológicamente activa en células deficientes en ella.

45

La presente invención provee además un método para suministrar una β -glucosidasa humana biológicamente activa a las células de un individuo con la enfermedad de Gaucher que comprende la introducción dentro de las células de un individuo con la enfermedad de Gaucher de una cantidad de un vector de la invención efectiva para transfectar y la expresión sostenida de la β -glucosidasa humana biológicamente activa en células deficientes en ella.

50

Otras características y ventajas de la presente invención se harán claras a partir de la siguiente descripción detallada así como de las reivindicaciones.

55

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra al vector plásmido de expresión pCFA-hAGA.

La Figura 2 muestra al vector adenoviral de expresión Ad2/CEH α -gal.

60

La Figura 3 muestra la incorporación de α -galactosidasa A producida a partir de Ad2/CEH α -gal por las células de Fabry. La Figura 3A muestra la incorporación de α -galactosidasa A expresada en fibroblastos (GMO2775) infectados con Ad2/CEH α -gal. La Figura 3B muestra la incorporación de la α -galactosidasa A expresada en las células de músculo esquelético (SkMC) infectadas con Ad2/CEH α -gal.

65

La Figura 4 muestra la distribución en el tejido de la α -galactosidasa A en ratones normales vs. Ratones inactivados de Fabry.

ES 2 268 799 T3

La Figura 5 muestra la distribución en el tejido de α -galactosidasa A después de administración intranasal, intravenosa e intramuscular del plásmido.

La Figura 6 muestra la distribución en el tejido de α -galactosidasa A después de la administración del vector Ad2/CEH α -gal/CEH α -gal a ratones inactivados de Fabry. La Figura 6A muestra la distribución después de una inyección viral dentro de la vena de la cola de ratones hembra inactivados de Fabry. La Figura 6B muestra la distribución después de inyección viral en el cuadrante derecho del músculo del grupo de ratones hembra de Fabry.

La Figura 7 muestra la expresión con el transcurso del tiempo de la α -galactosidasa A después de la inyección intravenosa de Ad2/CEH α -gal en ratones C57BL/6n. La Figura 7A muestra la expresión de α -galactosidasa A con el transcurso del tiempo. La Figura 7B muestra la persistencia de la α -galactosidasa A con relación al día 3.

La Figura 8 muestra los niveles de α -galactosidasa A en sangre entera después de la inyección intravenosa de Ad2/CEH α -gal en ratones C57BL/6n y BALB/c(nu/nu). La Figura 8A muestra la expresión de α -galactosidasa A con el transcurso del tiempo. La Figura 8B muestra la persistencia de la α -galactosidasa A con relación al día 3.

La Figura 9 muestra los niveles de α -galactosidasa A en tejidos de ratones Fabry después de la inyección intravenosa de una dosis de bajo nivel ($1,65 \times 10^{10}$ partículas) de Ad2/CEH α -gal. La Figura 9A muestra una expresión de α -galactosidasa A con el transcurso del tiempo. La Figura 9B muestra la persistencia de la α -galactosidasa A con relación al día 3.

La Figura 10 muestra los niveles de α -galactosidasa A en tejidos de ratones Fabry después de la inyección intravenosa de una dosis de alto nivel ($1,65 \times 10^{11}$ partículas) de Ad2/CEH α -gal. La Figura 10A muestra una expresión de α -galactosidasa A con el transcurso del tiempo. La Figura 10B muestra la persistencia de la α -galactosidasa A con relación al día 3.

La Figura 11 muestra los niveles de GL3 en los tejidos de un ratón Fabry después de la inyección intravenosa de dosis de alto y bajo nivel de Ad2/CEH α -gal con el transcurso del tiempo.

La Figura 12 muestra el efecto de DSG sobre los niveles de α -galactosidasa A en ratones después de la administración repetida del vector adenovirus.

La Figura 13 muestra el efecto de DSG sobre los niveles de anticuerpo antiadenovirus en ratones después de la administración repetida del vector adenovirus.

La Figura 14 muestra el efecto del anticuerpo MR1 dirigido a CD154 sobre los niveles de α -galactosidasa A en tejidos de ratón después de la administración repetida del vector adenovirus.

Descripción detallada de la invención

La presente invención provee vectores virales y no virales recombinantes que comprenden un transgén que codifica a una enzima lisosomal humana biológicamente activa, que son capaces de infectar y/o de transfectar y de expresión sostenida del transgén para la enzima lisosomal humana biológicamente activa en células de mamífero deficientes de la misma.

En particular, la presente invención provee el Uso de un vector seleccionado del grupo de los adenovirus, virus adeno asociados (VAA), vacunas, virus del herpes, bacteriófagos, cósmidos, vectores de hongos para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad por almacenamiento lisosomal, en donde la enfermedad por almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Gaucher en donde el vector contiene y expresa a un transgén que codifica a una β -galactosidasa humana biológicamente activa, el vector es admitido *in vivo* por las células objetivo, el transgén se expresa allí dentro y se produce la enzima biológicamente activa *in vivo*.

La presente invención provee además un método para suministrar una enzima lisosomal humana biológicamente activa a las células deficientes en ella, que comprende introducir dentro de las células un vector que contiene y expresa a un transgén que codifica a la enzima lisosomal humana biológicamente activa, en donde el vector es admitido por las células, el transgén se expresa y se produce la enzima biológicamente activa. Las células pueden ser infectadas y/o transfectadas por el vector, dependiendo de si el vector es un vector viral y/o un plásmido o similar.

En otro aspecto adicional, la invención provee un método de suministrar una enzima lisosomal humana biológicamente activa de otras células distantes deficientes en ella, en donde las células transfectadas y/o infectadas que hospedan al vector segregan la enzima biológicamente activa que luego es admitida por las otras célula deficientes.

Los vectores que pueden utilizarse la presente invención incluyen virus, tales como los adenovirus, virus adeno asociados (VAA), vacunas, virus del herpes, bacteriófagos, cósmidos, plásmidos, vectores de hongos y otros vehículos para recombinación típicamente utilizados en el arte que han sido descritos para expresión en una variedad de huéspedes eucariotas y procariotas, y que pueden ser utilizados para terapia génica así como para la simple expresión de la proteína.

ES 2 268 799 T3

Los polinucleótidos/transgenes se insertan en los genomas de vectores utilizando métodos conocidos en el estado del arte. Los transgenes se definen aquí como moléculas de ácidos nucleicos o genes estructurales que codifican a una proteína particular en la presente invención, a una enzima lisosomal humana y a los ácidos nucleicos que codifican a dichas enzimas. Las enzimas lisosomales representativas de acuerdo con la presente invención se suministran en la Tabla I anterior. Las referencias relacionadas con el aislamiento y la caracterización de las enzimas lisosomales en la Tabla I se pueden encontrar en Scriver y colaboradores, *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 7^o Ed., vol. II, páginas 2427-2879, McGraw Hill (1995).

A manera de ejemplo, con el propósito de insertar el transgén dentro del vector, se pueden poner en contacto al transgén y al ácido nucleico del vector, bajo condiciones adecuadas, con una enzima de restricción para crear extremos complementarios sobre cada molécula que puedan aparearse entre ellos y unirse juntos con una ligasa. Alternativamente, los enlazadores sintéticos de ácido nucleico se pueden ligar a los terminales del polinucleótido restringido. Estos enlazadores sintéticos contienen secuencias de ácido nucleico que corresponden a un sitio particular de restricción en el ácido nucleico del vector. Adicionalmente, un oligonucleótido que contiene un codón de terminación y un sitio apropiado de restricción, se pueden ligar por inserción dentro de un vector que contiene, por ejemplo, algo o todo de lo siguiente: un gen marcador seleccionable, tal como el gen de la neomicina por selección de transfectantes estables o transitorios en células de mamífero; las secuencias del reforzador/promotor del gen inmediato temprano de CMV humano para niveles altos de transcripción; las señales de terminación de la transcripción y de procesamiento del ARN del SV40 para la estabilidad del ARNm; los orígenes de replicación del poliovirus SV40 y ColE1 para una replicación episomal apropiada; sitios versátiles de clonación múltiple; y los promotores del ARN de T7 y SP6 para transcripción *in vitro* del ARN sentido y antisentido. Se conocen bien otros medios disponibles en el estado del arte.

Como se lo utiliza aquí, “expresión” se refiere al proceso por medio del cual se transcriben en el ARNm los polinucleótidos/transgenes y luego se traducen en péptidos, polipéptidos, o proteínas. Si el polinucleótido se deriva del ADN genómico, la expresión puede incluir el empalme del ARNm, si se selecciona un huésped eucariota apropiado. Los elementos reguladores requeridos para la expresión incluyen secuencias de promotores para unir a la ARN polimerasa y a las secuencias de iniciación de la transcripción para la unión al ribosoma. Por ejemplo, el vector bacterial de expresión incluye a un promotor tal como el promotor *lac* y para la iniciación de la transcripción a la secuencia Shine-Dalgarno y al codón de inicio AUG (Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2da Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989), o Ausubel y colaboradores, *Current Protocols in Molecular Biology* (Greene Assoc., Wiley Interscience, NY, NY, 1995). En forma similar, un vector eucariota de expresión, ya sea un virus o un plásmido, incluye a un promotor homólogo o heterólogo para la ARN polimerasa II, a una señal de poliadenilación secuencia abajo, al codón de inicio AUG, y al codón de terminación para la separación del ribosoma. Tales vectores se pueden obtener comercialmente o armarse por medio de las secuencias descritas en los métodos bien conocidos en el arte, por ejemplo, los métodos descritos anteriormente para la construcción de vectores en general. Los vectores de expresión son útiles para producir células que expresen a la proteína codificada por el polinucleótido/transgén.

Las preparaciones del transgén que codifican a una enzima lisosomal humana, por ejemplo α -galactosidasa A, se pueden incorporar en un vector adecuado para suministro a las células de un individuo, por ejemplo, un individuo con Fabry, utilizando métodos que son bien conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, Finkel y Epstein, *FASEB J.* 9:843-851 (1995); Feldman y Steg, *Cardiovascular Res.* 32:194-207 (1996).

Se puede introducir el plásmido desnudo de ADN con ácido nucleico desnudo en células de músculo, por ejemplo, por medio de inyección directa dentro del tejido (Wolf y colaboradores, *Science* 247:1465 (1989)).

Los transportadores Lipídicos- de Complejos Lipídicos- de Ácido Nucleico se pueden asociar con ácidos nucleicos desnudos (por ejemplo, ADN de plásmido) para facilitar el paso a través de las membranas celulares. Los lípidos catiónicos, aniónicos o neutros se pueden utilizar para este propósito. Sin embargo, se prefieren los lípidos catiónicos debido a que ellos han mostrado asociarse mejor con el ADN que, generalmente, tienen una carga negativa. Los lípidos catiónicos también han mostrado que median el suministro intracelular del ADN del plásmido (Felgner y Ringold, *Nature* 337:387 (1989)). La inyección intravenosa de complejos de plásmido-lípido catiónico en ratones ha mostrado resultar en la expresión del ADN en el pulmón (Brigham y colaboradores, *Am. J. Med. Sci.* 298:278 (1989)). Ver también, Osaka y colaboradores, *J. Pharm. Sci.* 85(6):612-618 (1996); San y colaboradores, *Human Gene Therapy* 4:781-788 (1993); Senior y colaboradores, *Biochemica et Biophysica Acta.* 1070:173-179 (1991); Kabanov y Kabanov, *Bioconjugate Chem.* 6:7-20 (1995); Remy y colaboradores, *Bioconjugate Chem.* 5:647-654 (1994); Behr, J-P., *Bioconjugate Chem.* 5:382-389 (1994); Behr y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86:6982-6986 (1989); y Wyman y colaboradores, *Biochem.* 36:3008-3017 (1997).

Los catiónicos son conocidos por aquellos ordinariamente entrenados en la técnica. Los lípidos catiónicos representativos incluyen a aquellos divulgados, por ejemplo, en la patente estadounidense No. 5.283.185; y por ejemplo, en la patente estadounidense No. 5.767.099.

En una modalidad preferida, el lípido catiónico es el carbamato de colesteril espermina N⁴ (GL-67) divulgado en la patente estadounidense No. 5.767.099. Lípidos adicionales preferidos incluyen al carbamato de colesteril espermidina N⁴ (GL-53) y al carbamato de 1-(N⁴-espermid)-2,3-dilaurilglicerol (GL-89).

Los vectores basados en Adenovirus-Adenovirus para el suministro de transgenes son bien conocidos en el arte y se pueden obtener comercialmente o construirse por medio de métodos estándar de biología molecular. Los vectores adenovirales recombinantes que contienen genes exógenos para transferencia, generalmente se derivan del adenovirus tipo 2 (Ad2) y del adenovirus tipo 5 (Ad5). Ellos se pueden derivar también de otros serotipos no oncogénicos. Ver, por ejemplo, Horowitz, "Adenoviridae and their Replication" en *VIROLOGY*, 2da ed., Fields y colaboradores Eds., Raven Press Ltd., Nueva York, 1990.

Los vectores adenovirales de la presente invención son incapaces de replicación, tienen expresión génica viral mínima y son capaces de expresar un transgén en células objetivo. Los vectores adenovirales son generalmente suministrados por replicación defectuosa por la supresión de los genes de la región E1. Los vectores de replicación defectuosa tal vez producidos en la línea celular 293 (ATCC CRL 1573), una línea celular de riñón embrionario humano que expresan las funciones de E1. La región suprimida E1 puede ser reemplazada por el transgén de interés bajo el control de un promotor adenoviral o no adenoviral. El transgén puede colocarse también en otras regiones del genoma del adenovirus. Ver, Graham y colaboradores, "Adenovirus-based Expression Vectors and Recombinant Vaccines" en *VACCINES: NEW APPROACHES to IMMUNOLOGICAL PROBLEMS*, páginas 363-390, Ellis, Ed., Butterworth-Heinemann, Boston, (1992) para una revisión de la producción de vectores adenovirales de replicación defectuosa.

Las personas capacitadas saben también que se pueden eliminar o reposicionar otras regiones no esenciales del adenovirus dentro del genoma viral para proveer un vector adenoviral adecuado para liberar a un transgén de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.670.488, revela que algunas o todas las regiones E1 y E3 se pueden suprimir, y que los marcos no esenciales de lectura abierta (ORF) de E4 que no se requieren para la propagación del virus *in vitro* también se pueden suprimir. Otros vectores adenovirales representativos los divulgan, por ejemplo, Rich y colaboradores, *Human Gene Therapy* 4:461 (1993); Brody y colaboradores, *Ann. NY Acad. Sci.* 716:90 (1994); Wilson, *N. Eng. J. Med.* 334:1185 (1996); Crystal, *Science* 270:404 (1995); O'Neal y colaboradores, *Hum. Mol. Genet.* 3:1497 (1994); y Graham y colaboradores, *supra*. En una modalidad preferida de la presente invención, el vector adenoviral es un vector basado en Ad2 suprimido de E1, por ejemplo, como se divulga en la patente estadounidense No. 5.670.488. Otros vectores adenovirales que pueden utilizarse incluyen a aquellos que han sido diseñados para evitar la generación de adenovirus de replicación competente *in vivo* (patente estadounidense No. 5.707.618). Además, los vectores de pseudoadenovirus (PAV), que son suprimidos por genes tempranos y tardíos, como se revela en la patente estadounidense No. 5.670.488, también se contemplan para ser utilizados aquí.

Como se definió anteriormente, un transgén, como el utilizado aquí, es un ácido nucleico o gen estructural que codifica a una enzima lisosomal humana. Además, el transgén es extranjero o no nativo para el adenovirus. Se contempla cualquier ácido nucleico que codifique para una enzima lisosomal humana que pueda ser transcrita en el vector adenoviral. En una modalidad que no hace parte de la invención reivindicada, el transgén codifica a una proteína α -galactosidasa A funcional o biológicamente activa. Una proteína o péptido funcional o biológicamente activo es una proteína o péptido que afecta al mecanismo celular de una célula en la cual se exprese, o a la función de un tejido u organismo. En el caso de la α -galactosidasa A, la enzima rompe al sustrato lipídico globotriasilceramida (galactosil-galactosil-glucosil-ceramida) o GL3.

En los vectores adenovirales de la presente invención, el transgén se enlaza operativamente a las secuencias de control de la expresión, por ejemplo, a un promotor que dirige la expresión del transgén. Como se la utiliza aquí, la frase "operativamente enlazado" se refiere a la relación funcional de un polinucleótido/transgén con secuencias reguladoras y efectoras de nucleótidos, tales como promotores, reforzadores, sitios de detención transcripcionales y de traducción, y otras secuencias de señal. Por ejemplo, en el lanzamiento operativo de un ácido nucleico a un promotor se refiere a la relación física y funcional entre el polinucleótido y el promotor de tal manera que la transcripción del ADN se inicia a partir del promotor por medio de una ARN polimerasa que específicamente reconoce y se enlaza al promotor, y en donde el promotor dirige la transcripción del ARN del polinucleótido.

Las regiones del promotor incluyen secuencias específicas que son suficientes para el reconocimiento de la ARN polimerasa, el lanzamiento y la iniciación de la transcripción. Adicionalmente, las regiones del promotor incluyen secuencias que modulan el reconocimiento, el lanzamiento y la actividad de iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa. Tales secuencias pueden actuar como *cis* o pueden ser sensibles a factores que actúen como *trans*. Dependiendo de la naturaleza de la regulación, los promotores pueden ser constitutivos o regulados. Ejemplos de promotores son los promotores tempranos SP6, T4, T7, SV40, el promotor citomegalovirus (CMV), el promotor inducible por esteroides del virus de tumor mamario de ratón (VTMR), el promotor del virus de leucemia murina de Moloney (VLMM), el promotor de la fosfoglicerato quinasa (FGQ), y similares. Alternativamente, el promotor puede ser un promotor de adenovirus endógeno, por ejemplo el promotor E1a o el promotor tardío principal Ad2 (PTP). En forma similar, aquellos ordinariamente entrenados en el arte pueden construir vectores adenovirales utilizando señales de adición endógenas o heterólogas poli A. En particular, el uso de un promotor/transgén CMV, junto con una región E4 de adenovirus, preferiblemente ORF3, como la revelada en la PCT/US98/07841, presentada el 14 de abril de 1998 e incorporada aquí por referencia, ha mostrado que es preferible proveer una persistencia aumentada de expresión transgénica. También se contemplan el vector suprimido E1, y el E3 parcialmente suprimido que son capaces de proveer expresión persistente de un transgén, como se revela en la PCT/US98/07840, presentada el 14 de abril de 1998.

Otros vectores viales que son usados en la presente invención incluyen a vectores derivados de vacunas, virus del herpes, VAA y retrovirus. En particular, los virus del herpes, especialmente el virus del herpes simple (VHS), tal como aquellos revelados en la patente estadounidense No. 5.672.344, son particularmente útiles para el suministro de un transgén a una célula neuronal, que tiene importancia para aquellas enfermedades por almacenamiento lisosomal en las cuales el defecto enzimático se manifiesta en las células neuronales, por ejemplo en las enfermedades de Hunter, de Hunter y de Tay-Sach.

Los vectores del VAA, tales como aquellos revelados en las patentes estadounidenses Nos. 5.139.941, 5.252.479 y 5.753.500 y en la publicación PCT WO 97/09441, son también útiles ya que estos vectores se integran en los cromosomas del huésped, con una mínima necesidad de repetir la administración del vector.

Los retrovirus pueden encontrar uso también en la presente invención, especialmente para el suministro del transgén a las células que pueden ser removidas de un individuo, infectadas *ex vivo* y administradas nuevamente al individuo para la producción de la enzima biológicamente activa.

Los vectores virales y no virales de la presente invención son útiles para la transferencia de un transgén que codifica a una enzima lisosomal para una célula objetivo. Las células objetivo pueden estar *in vivo* o *in vitro*. El uso de los vectores de la invención *in vitro* permite la transferencia de un transgén a una célula cultivada, y es útil para la producción recombinante del producto transgénico. El uso de los vectores de la invención para liberar a un transgén a una célula *in vivo* es útil para suministrar una enzima biológicamente activa a las células deficientes en ella, por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Gaucher, una célula en la cual la β -glucosidasa está ausente, es insuficiente o no es funcional.

Los vectores de la invención pueden ser dirigidos a células específicas por medio del enlazamiento de una molécula objetivo al vector. Una molécula objetivo es cualquier agente que sea específico para una célula o tipo de tejido de interés, incluido por ejemplo, un ligando, anticuerpo, azúcar, receptor, u otras moléculas enlazantes. La habilidad en los vectores dirigidos vuelve a los vectores de la invención particularmente útiles en el tratamiento de los desórdenes por almacenamiento lisosomal. Por ejemplo, la inclusión de una molécula objetivo, tal como VEGF o un anticuerpo para un receptor de VEGF, puede proveer el objetivo para las células endoteliales vasculares en individuos con la enfermedad de Gaucher.

Además, los vectores virales, especialmente en los vectores adenovirales que han formado un complejo con un anfifilo catiónico, tal como un lípido catiónico como el descrito anteriormente, poliL-lisina (PLL), y dietilaminoetil-dextrano (DEAE-dextrano), proveen una mayor ineficiencia de la infección viral de las células objetivo (Ver, por ejemplo, PCT/US97/21496 presentada el 20 de noviembre de 1997).

Los vectores adenovirales que forman complejo con DEAE-dextrano son particularmente preferidos. Además, ya que la administración repetida puede resultar en una respuesta inmunológica para el vector, limitando por lo tanto su efectividad en el suministro del gen a las células afectadas, el adenovirus y otros vectores virales pueden ser modificados por un polímero, por ejemplo, formando complejo con polietilén glicol (PEG), para reducir la inmunogenicidad viral y permitir la administración repetida del vector (Ver, por ejemplo, PCT/US98/06609 presentada el 3 de abril de 1998). Alternativamente, el vector se puede administrar con un agente inmunosupresor para reducir la respuesta inmunológica a la administración repetida del vector. Además, se pueden utilizar las combinaciones de las anteriores aproximaciones.

La transferencia del transgén a las células objetivo por medio de los vectores de la invención pueden ser evaluada por medio de la medición del nivel del producto transgénico (enzima biológicamente activa) en la célula objetivo. El nivel de producto transgénico en la célula objetivo se correlaciona directamente con la eficiencia de la transferencia del transgén por medio de los vectores de invención. Se puede utilizar cualquier método conocido en el arte para medir los niveles de enzima, tales como ELISA, radioinmunoensayo, ensayos utilizando sustratos enzimáticos fluorescentes y quimioluminiscentes.

Puede hacerse seguimiento a la expresión del transgén por medio de una variedad de métodos conocidos en el arte que incluyen, entre otros, ensayos inmunológicos, histoquímicos y de actividad. Los procedimientos inmunológicos útiles para la detección *in vitro* del producto transgénico en una muestra, incluyen inmunoensayos que emplean un anticuerpo detectable. Tales inmunoensayos incluyen, por ejemplo, ELISA, ensayo microfluorimétrico Pandex, ensayos de aglutinación, citometría de flujo, ensayos de diagnóstico en suero y procedimientos de coloración inmunohistoquímica que son bien conocidos en el arte. Un anticuerpo se puede detectar por diferentes medios bien conocidos en el arte. Por ejemplo, se puede unir directa o indirectamente un marcador detectable al anticuerpo. Los marcadores útiles incluyen, por ejemplo, radionúclidos, enzimas, fluorógenos, cromógenos y etiquetas quimioluminiscentes.

Para los métodos de formación de imágenes *in vivo*, se puede administrar un anticuerpo detectable a un sujeto, y el enlazamiento del anticuerpo al producto transgénico se puede detectar por medio de técnicas de formación de imágenes bien conocidas en el arte. Los agentes adecuados para la formación de imágenes son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, radionúclidos que emiten rayos gama tales como ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{51}Cr y similares, así como iones metálicos paramagnéticos, que se describen en la patente estadounidense No. 4.647.447. Los radionúclidos permiten la formación de imágenes de los tejidos por medio de fotometría de centelleo gama, tomografía de emisión positrónica, tomografía computada de emisión de fotones únicos, y formación de imágenes de cuerpo entero con cámara de rayos

gama, mientras que los iones de los metales paramagnéticos permiten la visualización por medio de la formación de imágenes de resonancia magnética.

La presente invención se ejemplifica utilizando vectores que contienen a un transgén de la α -galactosidasa para liberar α -galactosidasa A biológicamente activa a las células y a los tejidos de individuos con la enfermedad de Fabry. Se ha demostrado la eficacia de esta aproximación utilizando un sistema modelo de ratón, por ejemplo, un ratón inactivado de Fabry. Así, se provee una α -galactosidasa A humana activa a las células de un individuo con la enfermedad de Fabry por medio de introducción a un individuo con Fabry de una cantidad efectiva de los vectores de invención para infectar y/o transfectar y la expresión sostenida del gen humano α -gal A biológicamente activo en células deficientes de la misma. Los vectores de invención pueden ser liberados a las células objetivo en una composición adecuada, ya sea solos, o formando un complejo con un lípido catiónico tal como L67. Los vectores adenovirales preferiblemente forman complejo con DEAE-dextrano. El vector puede ser liberado a las células objetivo por medio de métodos conocidos en el arte, por ejemplo, en forma intravenosa, intramuscular, intranasal, subcutánea, por intubación, lavatorio, y similares.

Los términos transgén que codifica a una α -galactosidasa A incluyen a un ácido nucleico (ADN) o a un gen estructural que codifica a la α -galactosidasa A que, cuando se expresa en células deficientes de un individuo con la enfermedad de Fabry, alivian la deficiencia de α -galactosidasa A en ellas.

Como se lo utiliza aquí, el término cantidad efectiva se refiere a una cantidad que alivia la deficiencia por medio de la producción de α -galactosidasa A biológicamente activa en las células de un individuo con Fabry. La producción de α -galactosidasa A biológicamente activa en individuos con Fabry se puede evaluar por medio del alivio de los síntomas asociados con la enfermedad de Fabry. La cantidad efectiva precisa de vector que va a ser usado en el método de la presente invención la puede determinar alguien normalmente entrenado en el arte considerando por ejemplo, las diferencias individuales en edad, peso, grado de la enfermedad y condición del individuo.

En particular, la presente invención provee tanto una aproximación viral como no viral para liberar β -glucosidasa a las células de individuos con la enfermedad de Gaucher. Se ha construido un vector adenoviral recombinante (pAd2/CEH α -gal) y un vector de plásmido de expresión que expresa a la α -galactosidasa A humana (α -gal) que ejemplifican a la invención y que no son parte de la invención reivindicada. Una línea celular epitelial de las vías respiratorias humanas que fue, o bien infectada, o transfectada con estos vectores expresaron actividad enzimática en niveles superiores a los logarítmicos mayores que los niveles endógenos, con una proporción significativa de la actividad que está siendo secretada en el medio. La α -galactosidasa A secretada ya sea de los fibroblastos infectados (GMO2775) o de las células primarias de músculo esquelético humano (CME) se mostró que eran admitidas por los fibroblastos de Fabry. Esto indica que la enzima puede ser secretada por las células que han admitido al vector *in vivo*, y que la enzima secretada puede ser admitida por las células no transfectadas, corrigiendo así el defecto genético en un gran porcentaje de las células del organismo.

Se han emprendido estudios en ratones utilizando pCFA-hAGA para comparar la eficacia de tres rutas potenciales de suministro - administración intranasal, intravenosa e intramuscular. La instilación intranasal en el pulmón de ADN de plásmido formando complejo con el lípido catiónico GL-67 dio como resultado una expresión de menor nivel (hasta de 1800 pg de α -gal por 100 mg de tejido) en el pulmón. La administración intravenosa de ADN de plásmido formando complejo con el lípido GL-67 también mostró bajos niveles de expresión en el pulmón (hasta 700 pg por 100 mg de tejido). La inyección intramuscular de ADN de plásmido solo, en ausencia de lípido catiónico produjo bajos niveles de expresión (hasta 1200 pg por 100 mg de tejido) en el músculo inyectado. Los experimentos realizados utilizando el vector del adenovirus mostraron niveles muy altos de actividad en todos los tejidos ensayados (hasta 100 μ g por 100 mg de tejido en el hígado, 10 μ g por 100 mg de tejido en la mayoría de los otros órganos). El nivel de enzima analizado en el hígado de ratones normales fue de 400 ng por 100 mg de tejido. Las muestras de tejido de los ratones tratados con el virus fueron analizadas por medio de dos métodos diferentes, un ensayo de actividad y un ensayo de ELISA, con resultados similares.

Además, la administración intravenosa de vectores virales a ratones con Fabry ha mostrado que resulta en una disminución en el sustrato GL3 acumulado en una amplia variedad de tejidos en animales tratados. Se ha mostrado que pequeñas cantidades de enzimas lisosomales son normalmente secretadas y que estas pueden ser recapturadas por células distantes a través de receptores de la manosa-6-fosfato. En realidad, los resultados presentados muestran que la α -galactosidasa A recolectada de los sobrenadantes de las células transfectadas con vectores virales y no virales que codifican a la enzima, puede ser internalizada por las células con Fabry. Estos resultados sugieren además que la transferencia génica de α -galactosidasa A a un órgano apropiado como depósito puede facilitar la reversión del defecto bioquímico y el almacenamiento de GL3 en los tejidos afectados de los pacientes con Fabry.

La presente invención se ilustra además por medio de los siguientes ejemplos.

Los *Ejemplos* no hacen parte de la invención reivindicada.

65

Ejemplo 1

*Construcción del Vector*5 *pCFA-hAGA*

Este vector plásmido de expresión utiliza al promotor inmediato temprano del citomegalovirus para manejar la expresión del ADNc de la α -galactosidasa A humana. Se incluyó un intrón híbrido después del promotor para suministrar sitios de empalme para mejorar la expresión. La señal de poliadenilación se tomó del gen para la hormona de crecimiento bovino. El replicón ColE1 del pUC se utilizó como columna vertebral para la replicación en *E. coli*. El gen de resistencia a la kanamicina se utilizó para seleccionar el mantenimiento del plásmido. La construcción del pCFA-hAGA es análogo a la construcción del vector pCF1 que contiene a un transgén CFTR revelado, por ejemplo, en la patente estadounidense No. 5.783.565, cuya divulgación se incorpora aquí por referencia. En el vector pCFA-hAGA, se sustituye el transgén de la α -galactosidasa A por el transgén CFTR en pCF1.

15 *Ad2/CEH α -gal*

El vector adenoviral de expresión con E1 suprimido que utiliza la columna vertebral viral del serotipo Ad2 se construyó de acuerdo con la patente estadounidense No. 5.670.488, cuya divulgación se incorpora aquí por referencia. La región E1 del genoma viral se suprimió para permitir espacio a un casete de expresión. La supresión de la región E1 hace también al virus incapaz de replicación. El promotor E1a del adenovirus se utilizó para conducir la expresión del ADNc de la α -galactosidasa A humana. El intrón híbrido se incluyó después del promotor. La señal de poliadenilación se tomó del virus SV40. (Figura 2).

25 Ejemplo 2

Incorporación de la α -galactosidasa A humana producida a partir de Ad2/CEH α -gal por medio de fibroblastos de Fabry

Células primarias humanas se infectaron con Ad2/CEH α -gal en los siguientes MOI (línea celular de fibroblastos de Fabry GMO2775: 0, 2, 4, 6 y 8 μ U α -gal/ μ g de proteína; la línea celular de músculo esquelético CME: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 μ U α -gal/ μ g de proteína). Tres días después de la infección se recolectó el medio acondicionado de cultivo y se filtró para remover partículas de virus. El medio filtrado acondicionado se aplicó a los fibroblastos no infectados de Fabry (GMO2775). Después de una incubación de cinco horas, se removió el medio, se lavaron las células con PBS, y se recogieron en 0,5 ml de amortiguador para lisis. Los fibroblastos de los donantes normales (GMO2770B) y de Fabry que no habían sido expuestos a un medio acondicionado se recogieron y se analizaron como controles. Los lisados celulares se analizaron utilizando el sustrato fluorescente 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido (4- μ - α -gal). (Figuras 3A y 3B). Los ensayos mostraron que las células primarias humanas infectadas con Ad2/CEH α -gal secretaron α -galactosidasa A biológicamente activa que fue admitida por los fibroblastos de Fabry.

40 Ejemplo 3

Distribución en el tejido de α -galactosidasa A en ratones normales vs. ratones inactivados de Fabry

Los ratones normales (C57BL/6n) y los inactivados de Fabry (suministrados por el Dr. Robert Desnick, Escuela de Medicina del Monte Sinaí, Nueva York, NY) se analizaron por los niveles de α -galactosidasa A utilizando el ensayo de actividad con 4- μ - α -gal. Se llevó a cabo una perfusión corporal completa al momento del sacrificio y se recogieron los órganos y se almacenaron a -80°C. Los tejidos se homogenizaron en el amortiguador del ensayo y se pasaron a través de diferentes ciclos de congelación-descongelación. Los ratones de Fabry mostraron niveles significativamente reducidos de actividad de α -galactosidasa A cuando se los compara con ratones normales en todos los órganos analizados (Figura 4).

Ejemplo 4

55 *Distribución en el tejido de α -galactosidasa A después de administración intranasal e intravenosa de pCFA-hAGA*

pCFA-hAGA, formando complejo con el lípido catiónico GL-67 (carbamato de colesterol spermina N⁴), divulgada, por ejemplo, en la patente estadounidense No. 5.783.565, incorporada aquí por referencia, se administró a ratones C57BL/6n. Se analizaron los niveles de α -gal en homogenizados de tejido por medio de un ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA) específico para α -galactosidasa humana. Las instilaciones intranasales se realizaron utilizando 100 μ l del complejo GL-67:DOPE(1:2)pCFA-hAGA en una relación 0,6mM:3,6mM de lípido:ADN. Ver, por ejemplo, la Publicación Internacional No. WO 96/18372 (anfífilos catiónicos y plásmidos para el suministro intracelular de moléculas terapéuticas, por ejemplo, GL-67); Fasbender, A.J. y colaboradores, *Am. J. Physiol.* 269(1) Pt 1: L45-51 (1995); Zabner, J. y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 270(32):18997-19007 (1995). Los animales se sacrificaron 2 días después de la instilación. Se llevaron a cabo inyecciones intravenosas con 100 μ l del complejo GL-67:DOPE:DMPE-PEG(1:2:0.005): pCFA-hAGA en una relación 4mM:4mM de lípido:ADN en la vena de la cola. Estos animales se sacrificaron 2 días después de la administración.

ES 2 268 799 T3

Se suministraron inyecciones intramusculares de 100 μg de pCFA-hAGA desnudo en 50 μl en el cuadrante derecho del grupo muscular. Estos animales se sacrificaron 5 días después de la administración. La enzima se descartó en los tejidos originalmente transfectados por medio de las formulaciones escogidas lípido/ADN y las rutas de suministro (Figura 5).

5 Ejemplo 5

Distribución en el tejido de α -galactosidasa A en ratones inactivados de Fabry después de la administración de Ad2/CEH α -gal

10 Se inyectó el virus en la vena de la cola de ratones hembra inactivados de Fabry con una dosis de 5×10^9 IU en 260 μl . Los ratones se sacrificaron después de 3 días. Se utilizó ELISA para detectar los niveles de actividad de α -galactosidasa A en diferentes órganos. Las inyecciones intravenosas de virus resultaron en niveles altos de α -galactosidasa A en todos los órganos analizados (10-100 veces). La amplia distribución de actividad enzimática hace de ésta una terapia prometedora para la Enfermedad de Fabry (Figura 6A).

15 El virus se inyectó en el cuadrante derecho del grupo muscular de ratones hembra inactivados de Fabry en una dosis de $9,5 \times 10^8$ IU en 50 μl . Estos ratones se sacrificaron después de 5 días. Se utilizó ELISA para detectar los niveles de α -galactosidasa A en diferentes órganos. Las inyecciones intramusculares de virus resultaron en niveles significativos de enzima en el sitio de la inyección, así como niveles moderados de enzima en hígado y en bazo, indicando que las células infectadas en el sitio de la inyección secretaron enzima que fue admitida por las células de otros tejidos (Figura 6B).

25 Ejemplo 6

Expresión de la α -galactosidasa A con el transcurso del tiempo después de la inyección intravenosa de Ad2/CEH α -gal en ratones C57BL/6n

30 El presente experimento mostró la persistencia de niveles significativos de enzima activa durante algún tiempo después de la administración del vector. El virus se inyectó en la vena de la cola de los ratones C57BL/6n. La dosis suministrada fue de 5×10^9 IU en un volumen de 260 μl . Los órganos se recogieron después de 3, 14 y 28 días. Se utilizó ELISA para detectar los niveles de α -galactosidasa A en homogenizados de tejido (Figuras 7A y 7B). El día 28, los niveles de enzima habían caído 5-10 veces a partir de los niveles del día 3, sin embargo los niveles eran aún significativamente más altos que los niveles de tipo silvestre.

35 Ejemplo 7

Niveles de α -galactosidasa A en sangre entera después de inyección intravenosa de Ad2/CEH α -gal en ratones C57BL/6n y BALB/c(nu/nu)

40 El virus se inyectó en la vena de la cola de ratones C57BL/6n o BALB/c(nu/nu). La dosis suministrada fue de 5×10^9 IU en un volumen de 260 μl . Se recogió la sangre después de 3, 14 y 28 días. Se utilizó ELISA para detectar los niveles de α -galactosidasa A en sangre entera (Figuras 8A y 8B). La presencia de α -galactosidasa A en sangre indicó la secreción de enzima dentro del torrente sanguíneo a partir de los sitios de la infección. Los niveles de enzima cayeron ~ 10 veces después de 14 días. El patrón similar en ratones desnudos y normales implica que esta disminución no es debida a una respuesta inmunológica.

Ejemplo 8

50 *Lapso de tiempo corto mostrando la reducción de los niveles de GL3 en ratones con Fabry a los cuales se les suministró en forma intravenosa Ad2/CEH α -gal*

55 Los ratones hembra con Fabry entre 3 y 8 meses de edad ($n = 2$ para cada grupo) se inyectaron a través de la vena de la cola con una dosis alta de ($1,65 \times 10^{11}$ partículas) o una dosis baja ($1,65 \times 10^{10}$) de Ad2/CEH α -gal en 0,25 ml de PBS/sacarosa al 5%. Los ratones se sacrificaron a los 3, 7 ó 14 días después de la inyección ($n = 4$ por período de tiempo por dosis). Dos ratones hembra naive con Fabry (3 meses y 8 meses de edad) se sacrificaron el día 3 como referencia para los niveles de GL3 en ratones no tratados. Se recolectó una muestra de sangre al momento del sacrificio para medir la actividad de la α -galactosidasa A. Después del sacrificio, a los animales se les introdujo PBS y se recolectaron diferentes órganos. Los órganos se dividieron en dos partes, una para analizar la actividad de la α -galactosidasa A a través de un ELISA específico para α -galactosidasa A humana, y la otra se la extrajo y se la analizó por GL3 utilizando un ensayo específico tipo ELISA para GL3. Los datos se normalizaron con respecto al peso de la muestra de tejido.

60 La actividad de la α -galactosidasa A con el transcurso del tiempo en tejidos muestreados después de la administración de una dosis baja y de una dosis alta de Ad2/CEH α -gal se muestran en las Figuras 9A y 10A, respectivamente. La persistencia de la actividad de la α -galactosidasa A con relación al día 3 para cada dosis se muestra en las Figuras 9B y 10B, respectivamente. Este estudio mostró que la dosis alta del vector produjo un incremento de muchas veces

en la actividad de la α -galactosidasa A en todos los tejidos analizados, con relación a los ratones naive, que persistió hasta por 14 días. Hubo un modesto incremento en la actividad de α -galactosidasa A en la dosis menor.

En forma concurrente con el incremento en los niveles de α -galactosidasa A en los tejidos analizados, hubo una disminución significativa en los niveles de GL3 en todos los tejidos en las dosis altas del vector (Figura 11). La menor caída de los niveles de GL3 después de la dosis más baja del vector se cree que es un artefacto basado en la edad de los animales analizados. Los estudios con baja dosis utilizaron ratones más jóvenes que tienen menores cantidades de GL3 almacenado que los ratones mayores. Por ejemplo, los estudios en la Escuela de Medicina del Monte Sinaí en Nueva York han mostrado que los ratones con Fabry acumulan GL3 en sus tejidos con el tiempo. A los tres meses, los niveles de GL3 están significativamente por encima de lo normal, subiendo aproximadamente al doble del nivel a los 3 meses en ratones de 5 meses de edad. Entre 5-11 meses, los niveles de GL3 se estabilizan, estando el nivel de GL3 para los 5 meses aproximadamente al 80% del máximo. Todos los estudios con alta dosis se realizaron en ratones de 5-7 meses de edad, así los niveles iniciales de GL3 no variarían tanto en este grupo.

15 Ejemplo 9

Administración repetida de adenovirus a ratones después de inmunosupresión utilizando desoxiespergualina (DSG)

Debido a la administración repetida de un vector adenoviral que contiene al gen de la α -galactosidasa A se pueden requerir niveles sostenidos de α -galactosidasa A en individuos tratados, se pueden utilizar diferentes inmunosupresores para inhibir una respuesta inmunológica al vector adenovirus administrado. Tales respuestas inmunológicas pueden inhibir la efectividad del virus nuevamente administrado. El presente experimento muestra el efecto del agente inmunosupresor DSG sobre la administración repetida del adenovirus.

Se trataron dos grupos de cuatro ratones BALB/c con 1×10^{11} partículas de Ad2/CFTR-16 (un vector con E1 suprimido, y con E3 parcialmente suprimido, capaz de expresión transgénica persistente como se revela en la PCT/US98/07840 presentada el 14 de abril de 1998, cuya divulgación se incorpora aquí por referencia) a través de una inyección en la vena de la cola (dosis alta). Dos grupos de cuatro ratones recibieron 1×10^{10} partículas del virus (dosis baja). Un grupo dado recibió cada uno dosis de 20 mg/kg de DSG por medio de inyección IP en los días 1 a 5 con relación a la administración del virus. Este régimen de tratamiento se repitió después de 28 días. El día 56 los ratones recibieron la misma dosis de virus, esta vez utilizando Ad2/CEH α -gal. El día 56, dos grupos adicionales de ratones recibieron 1×10^{11} ó 1×10^{10} partículas de Ad2/CEH α -gal sin ningún tratamiento previo. Se recolectó sangre de estos animales los días -1, 27 y 55 con relación a la administración inicial de virus. Tres días después de que recibieron el virus Ad2/CEH α -gal, se sacrificaron los animales y se recolectaron los órganos. Los homogenizados de tejido se analizaron por la expresión de α -galactosidasa A utilizando un ELISA específico para α -galactosidasa A humana. Los anticuerpos hechos de adenovirus se titularon a partir de muestras de plasma. Con ambos niveles de dosis de virus, los niveles de α -galactosidasa A fueron superiores en los ratones a los que se les dio DSG después de aquellos que no recibieron DSG (Figura 12), indicando que el DSG fue beneficioso para la obtención de expresión transgénica por administración viral repetida. Igualmente, el DSG inhibió el título del anticuerpo antiadenovirus en los ratones (Figura 13).

40 Ejemplo 10

Eficacia de la administración repetida de adenovirus en ratones después de inmunosupresión con un anticuerpo (MR1) anti-CD154 (Ligando CD40)

El anticuerpo MR1, obtenido de PharMingen (Catálogo No. 090205), reacciona con gp39 (Ligando CD40-CD154), una molécula accesoria expresada sobre los linfocitos T activados. Noelle y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6550 (1992); Roy y colaboradores, *J. Immunol.* 151:2497 (1993). Se requiere gp39 para montar una respuesta inmunológica; por lo tanto la inhibición con MR1 inhibe las respuestas inmunológicas. En realidad, el anticuerpo para gp39 (Ligando CD40; CD154) ha mostrado que inhibe tanto la respuesta inmunológica celular como humana, facilitando la administración repetida de adenovirus a las vías respiratorias del ratón. Ver, Scaraiia y colaboradores, *Gene Therapy* 4:611(1997); WO 98/08541, incorporada aquí por referencia.

El presente experimento se diseñó para mostrar la efectividad de MR-1 en la inhibición de una respuesta inmunológica a la administración repetida de adenovirus en ratones.

A dos grupos de tres ratones BALB/c se les administró 1×10^{11} partículas de Ad2/CEH α -gal a través de una inyección en la vena de la cola. Un grupo de ratones recibió 500 μ g de anticuerpo anti-CD154 MR1 a través de inyección intraperitoneal en los días -1, 1, 4, 7 y 14 con relación a la administración del virus. Veintiocho días después de la primera administración del virus, los ratones recibieron una segunda inyección de 1×10^{11} partículas de virus, esta vez utilizando Ad2/CEH α -gal/CEH α -gal. Un tercer grupo de tres ratones recibió únicamente la inyección de Ad2/CEH α -gal el día 28. Tres días después de la segunda inyección del virus los animales fueron sacrificados y se recogieron los órganos. Los homogenizados de tejido se analizaron por la expresión de Ad2/CEH α -gal utilizando el ELISA. Como se muestra en la Figura 14, este experimento mostró que era posible obtener niveles altos de expresión del transgén de α -galactosidasa A con una segunda administración de adenovirus seguida de inmunosupresión a corto plazo con anticuerpo MR1.

REIVINDICACIONES

5 1. El uso de un vector seleccionado del grupo de adenovirus, virus adeno asociados (VAA), vacunas, virus del herpes, bacteriófagos, cósmidos, vectores de hongos para la preparación de un medicamento para tratar la enfermedad por almacenamiento lisosomal, en donde la enfermedad por almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Gaucher en donde el vector comprende y expresa a un transgén que codifica a una β -glucosidasa humana biológicamente activa, el vector es admitido *in vivo* por las células objetivo, el transgén se expresa allí dentro y se produce la enzima biológicamente activa *in vivo*.

10 2. El uso de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el adenovirus forma complejo con DEAE-dextrano.

3. El uso de acuerdo a las reivindicaciones 1-2, en donde las células que recogen al vector secretan a dicha enzima que es admitida por otras células deficientes en dicha enzima.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

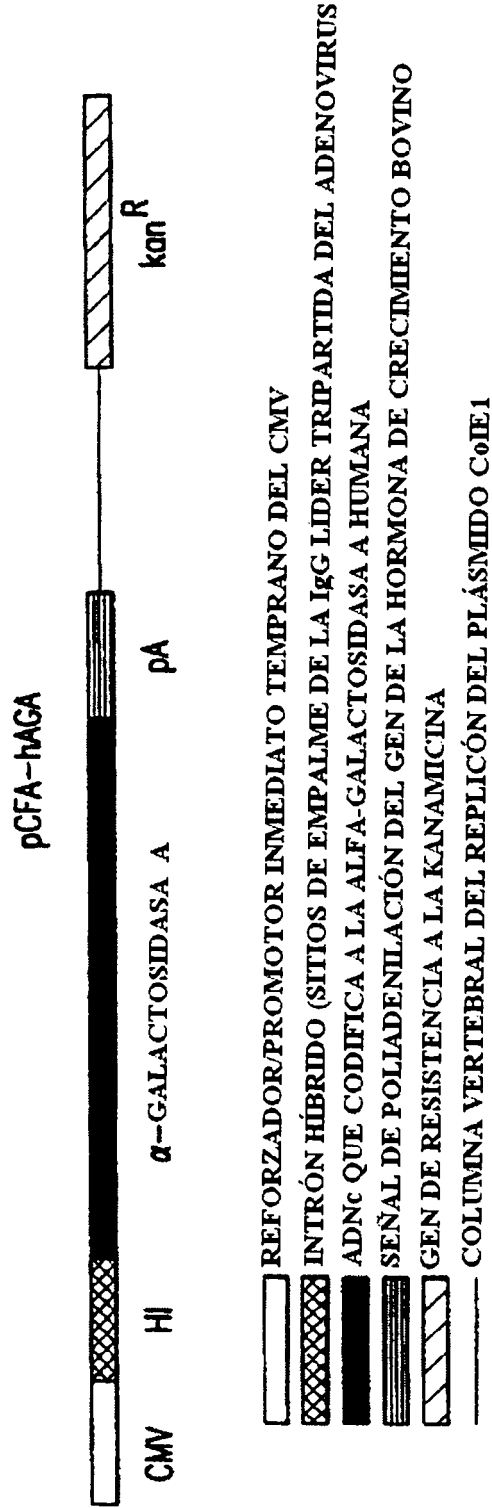


FIG.1

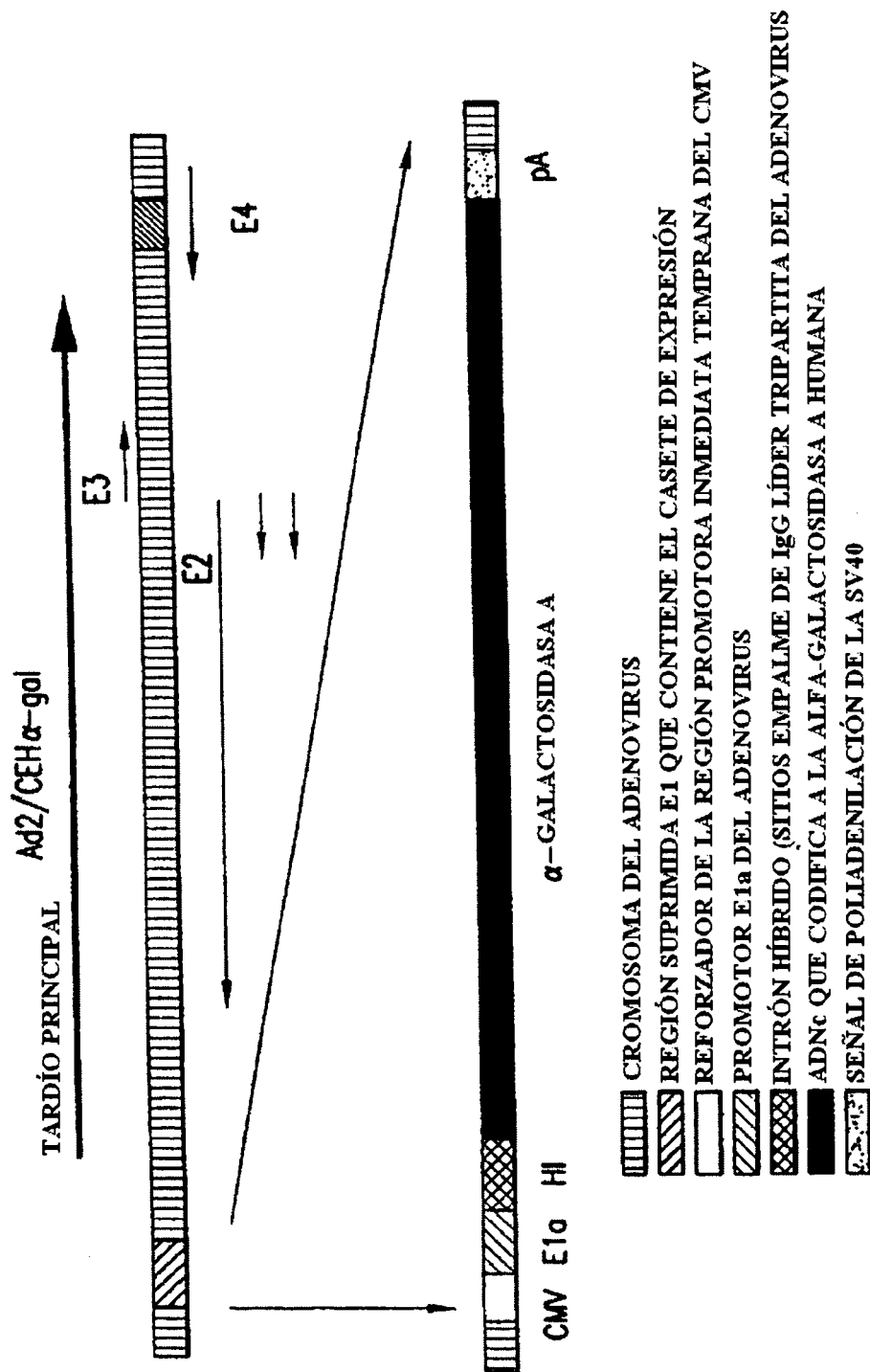


FIG.2

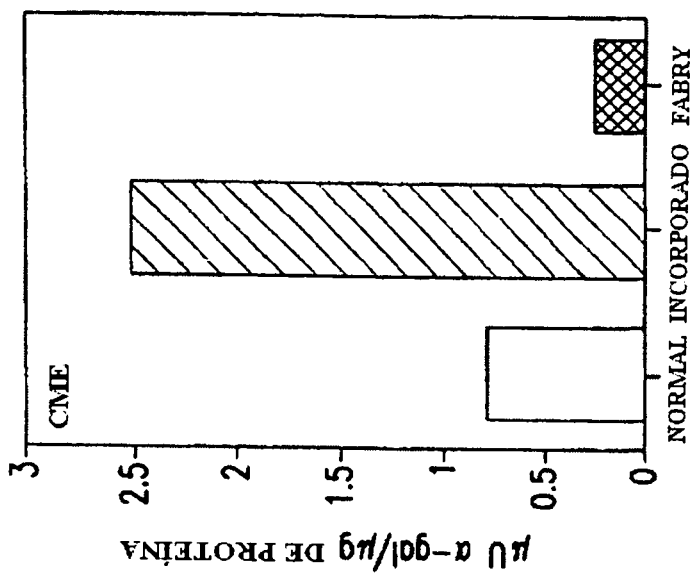


FIG.3B

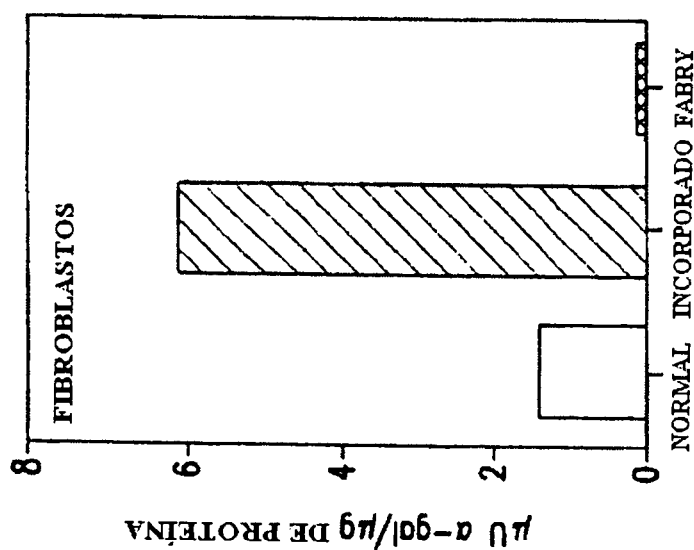


FIG.3A

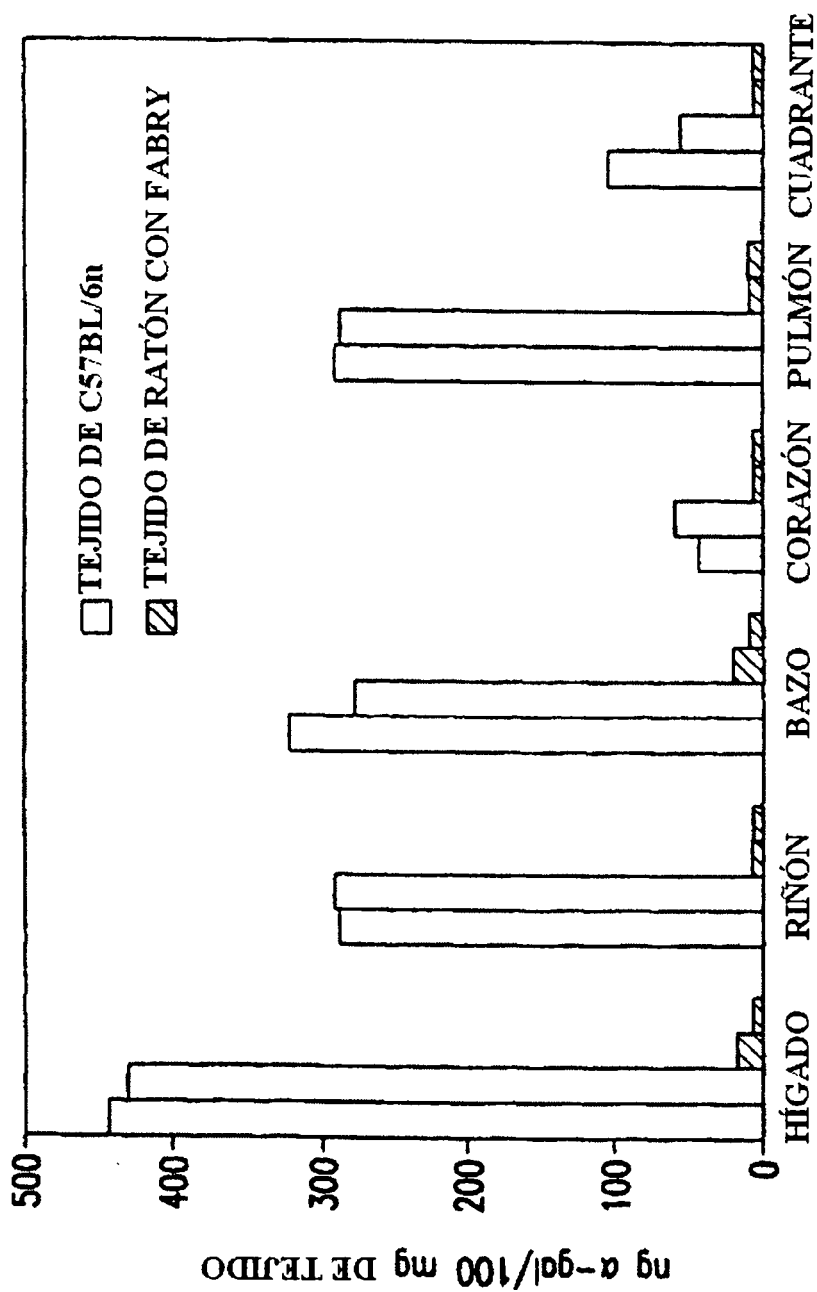


FIG.4

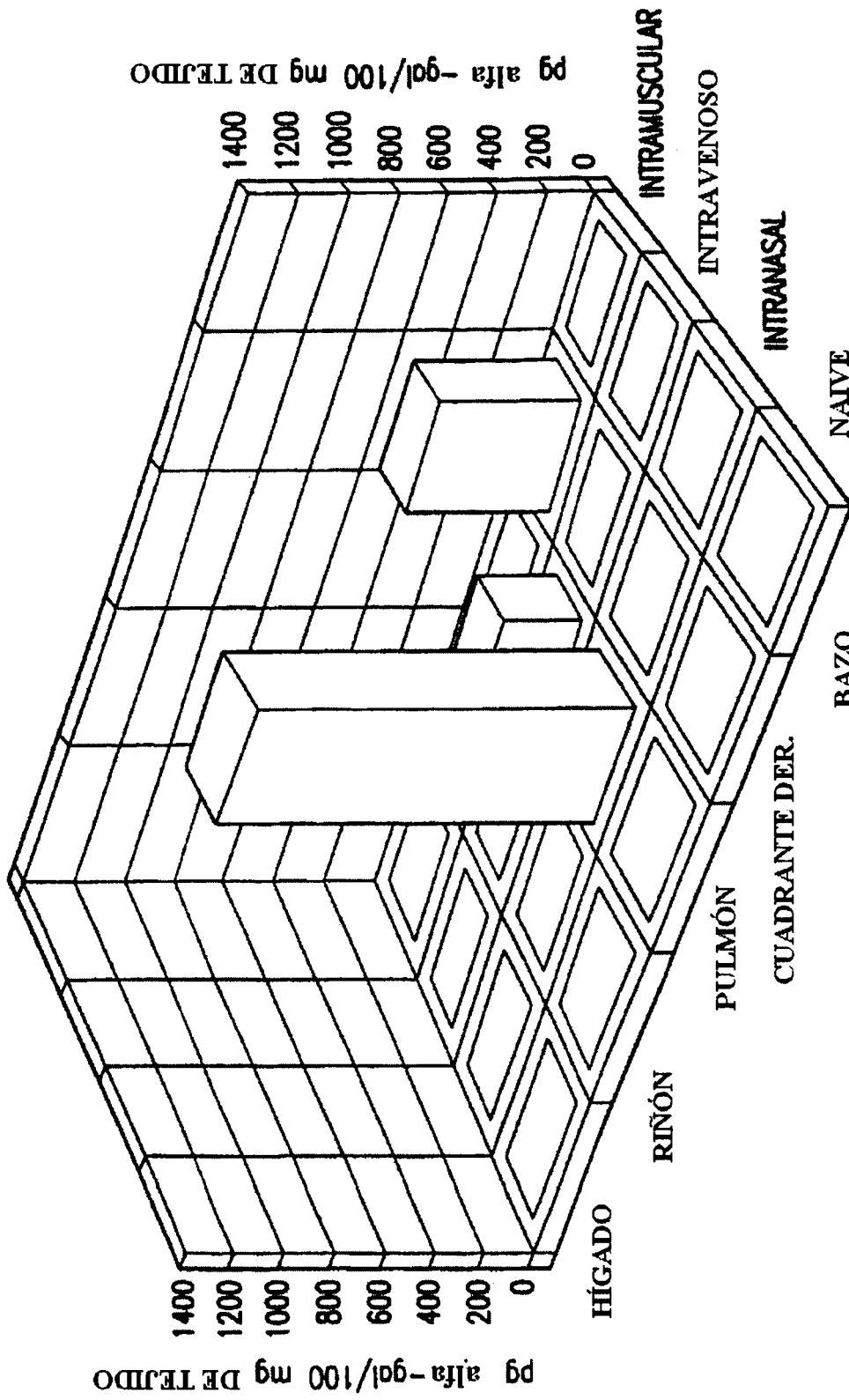


FIG.5

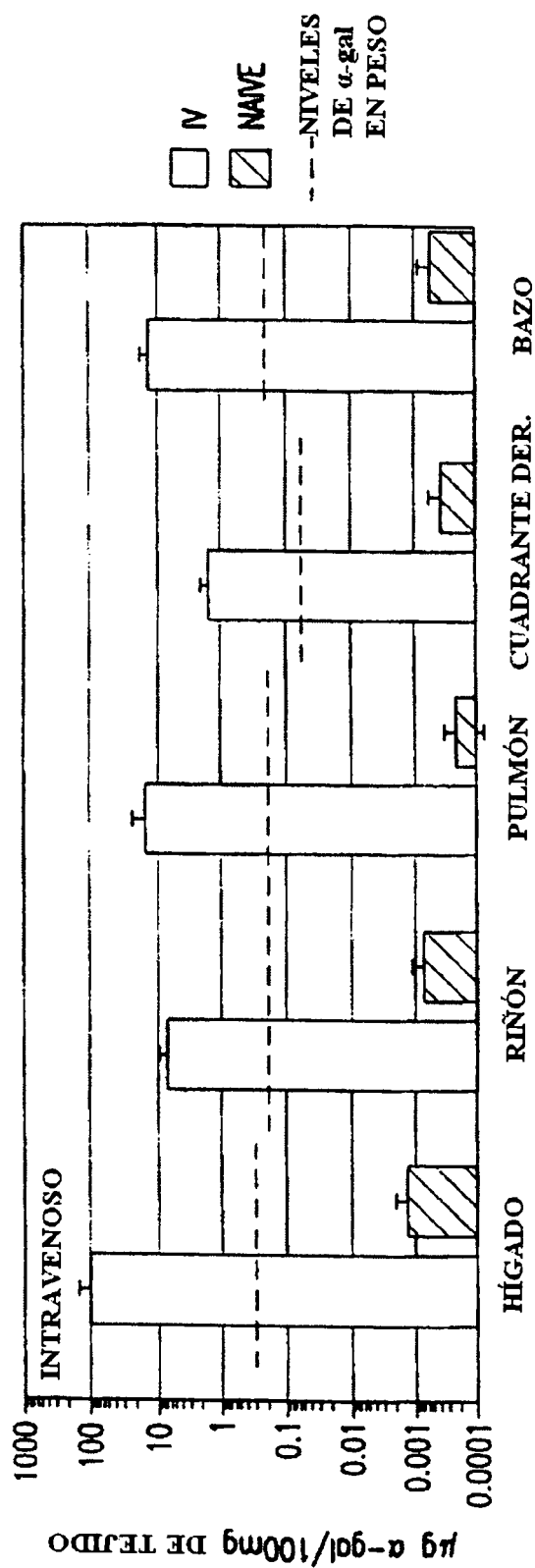


FIG.6A

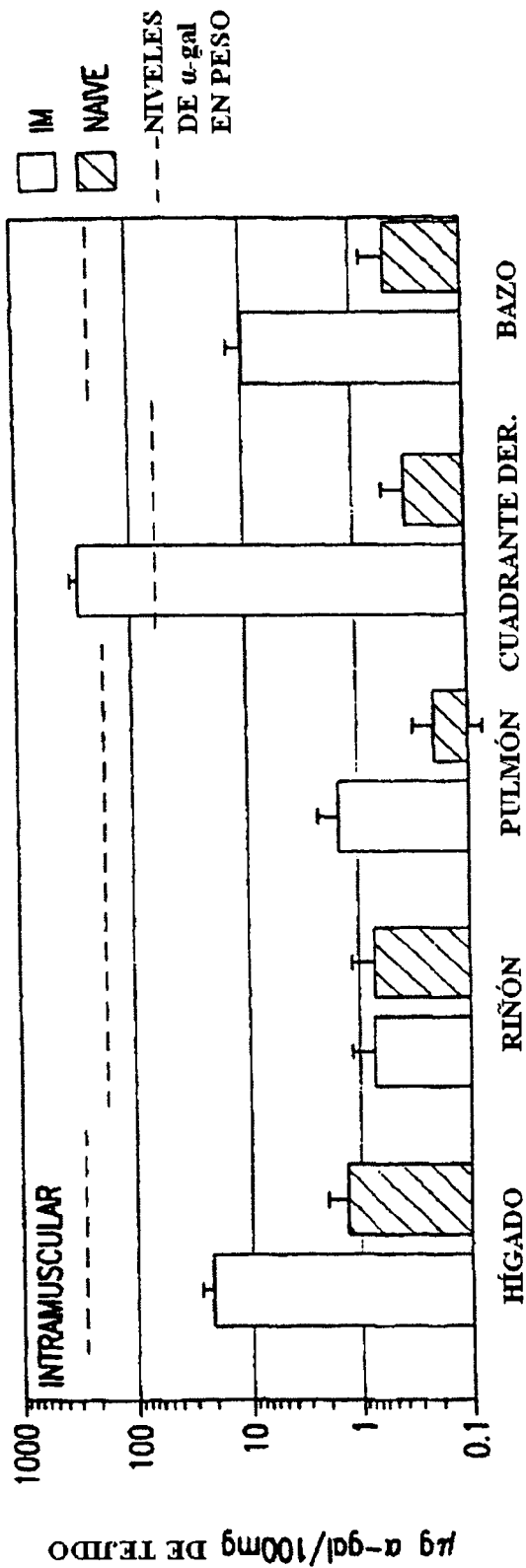


FIG.6B

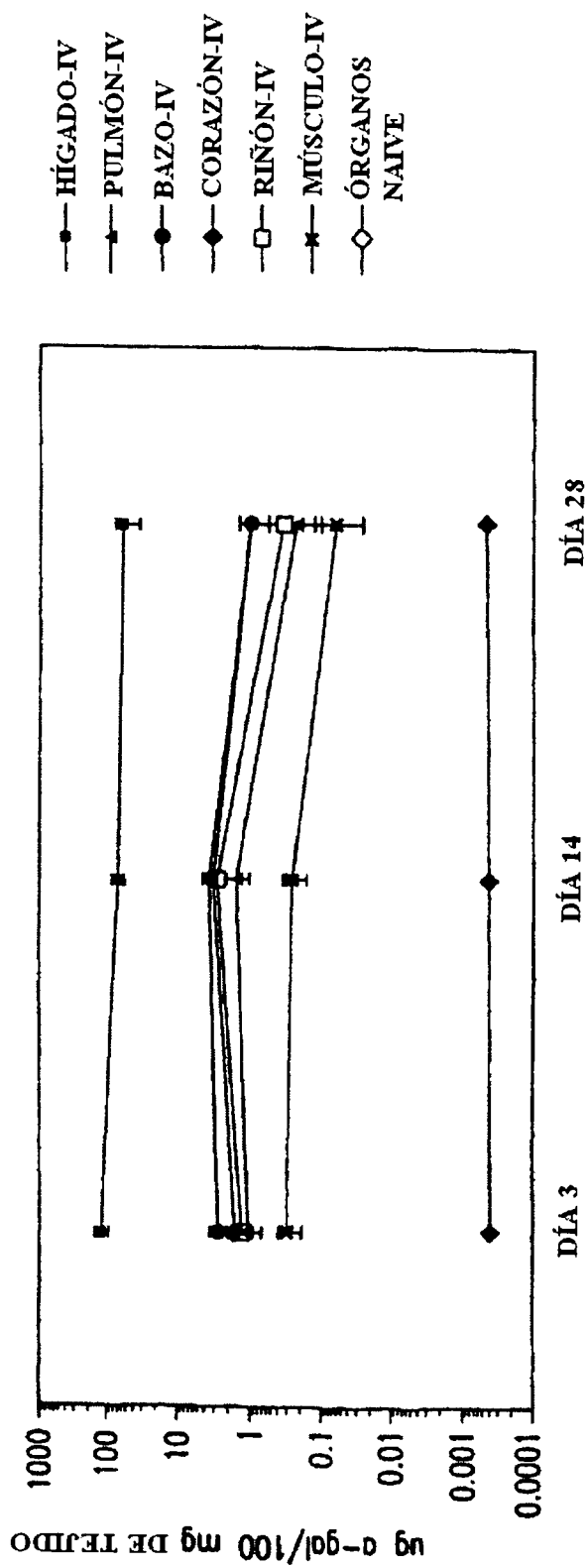


FIG.7A

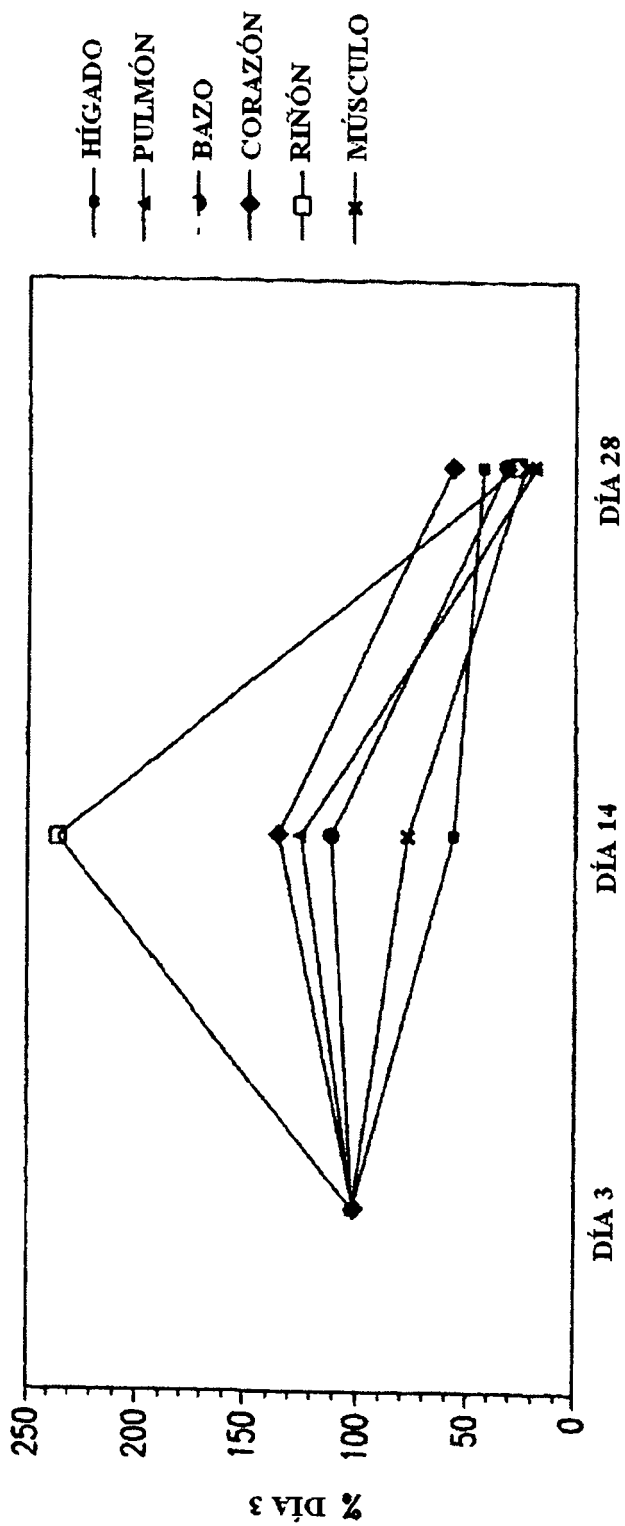


FIG.7B

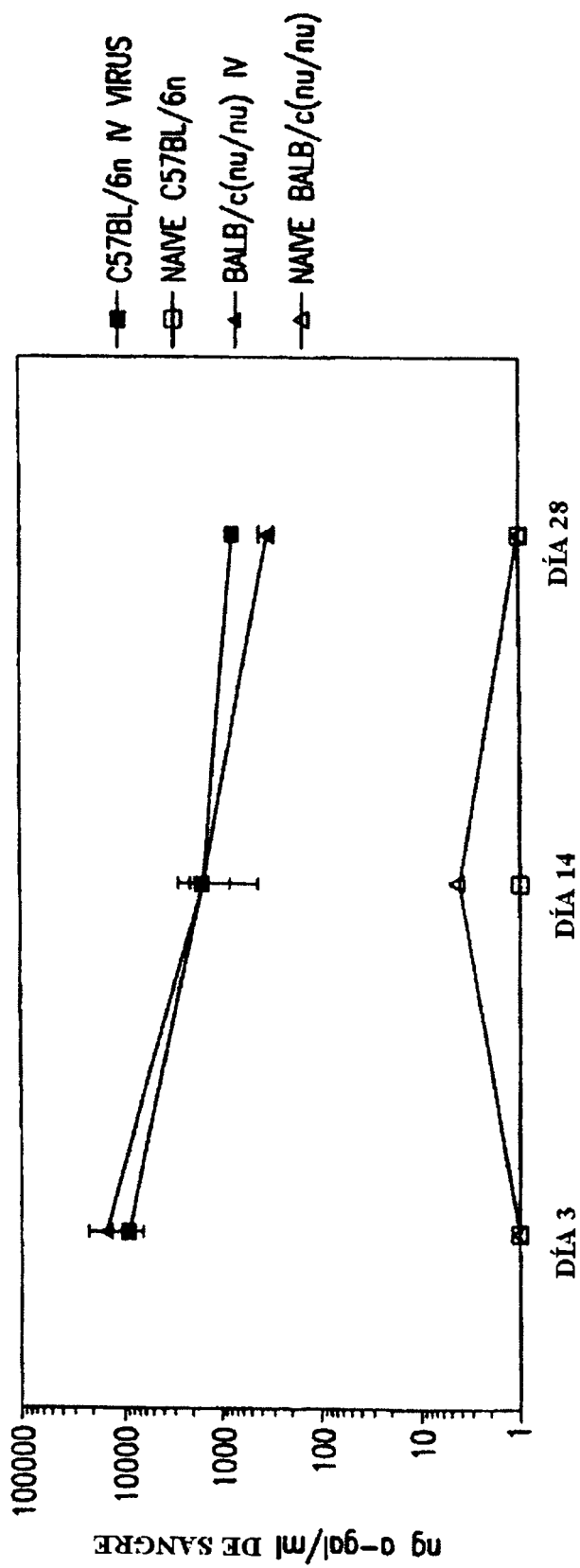


FIG.8A

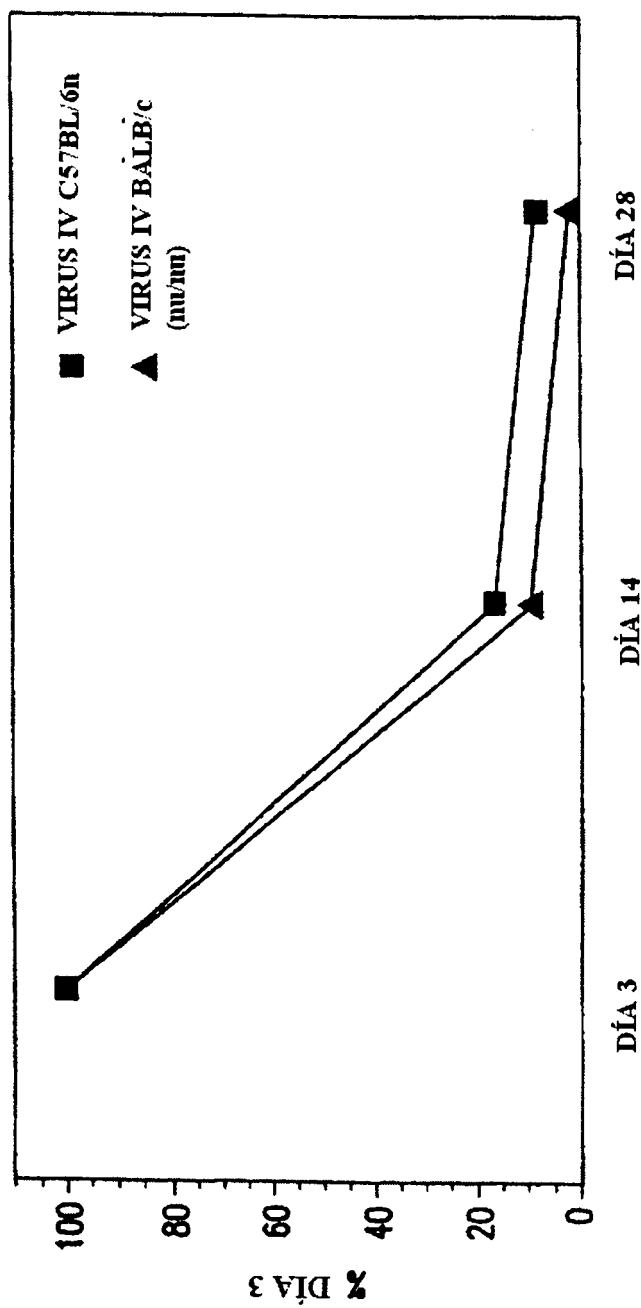


FIG.8B

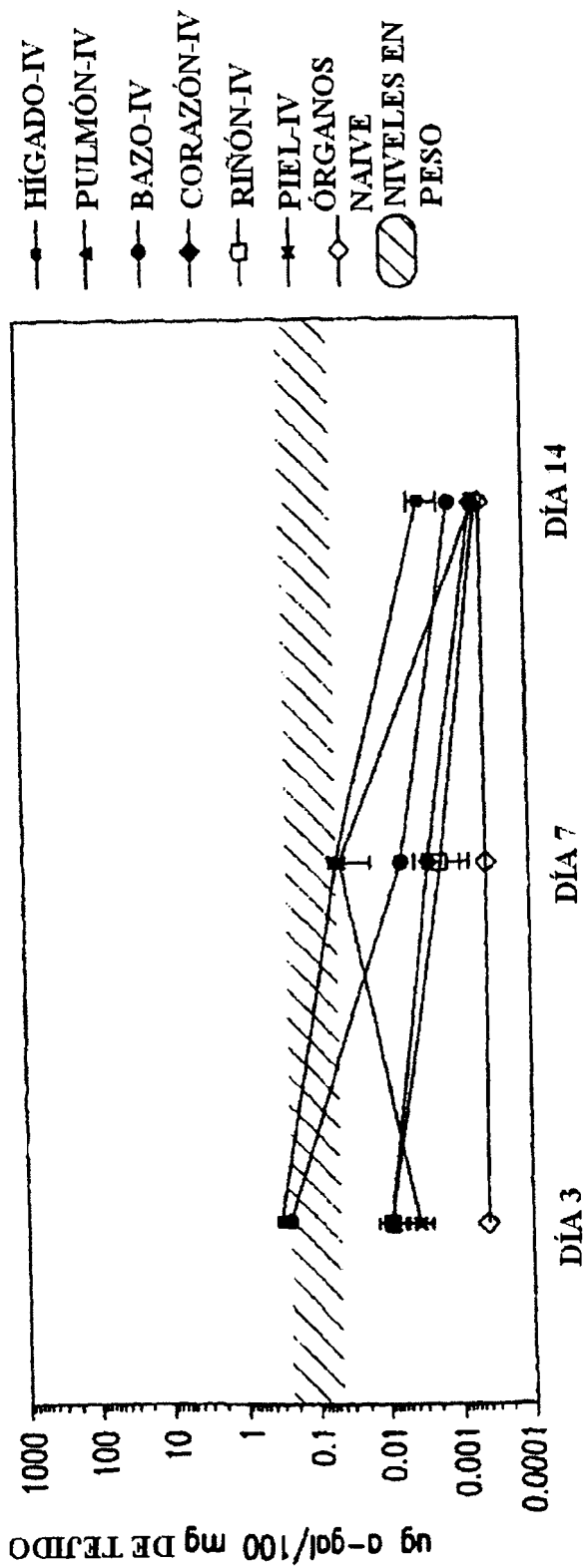


FIG.9A

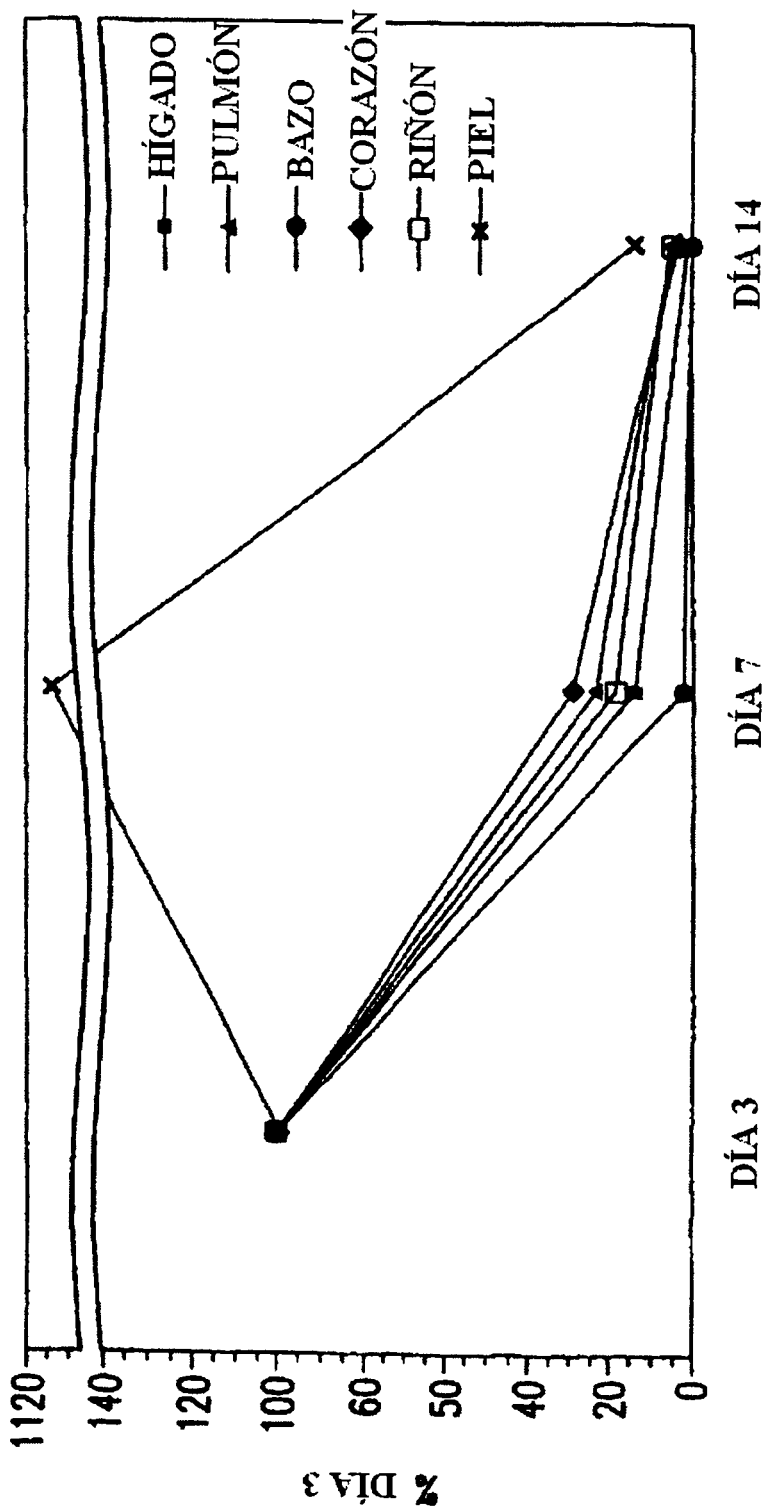


FIG.9B

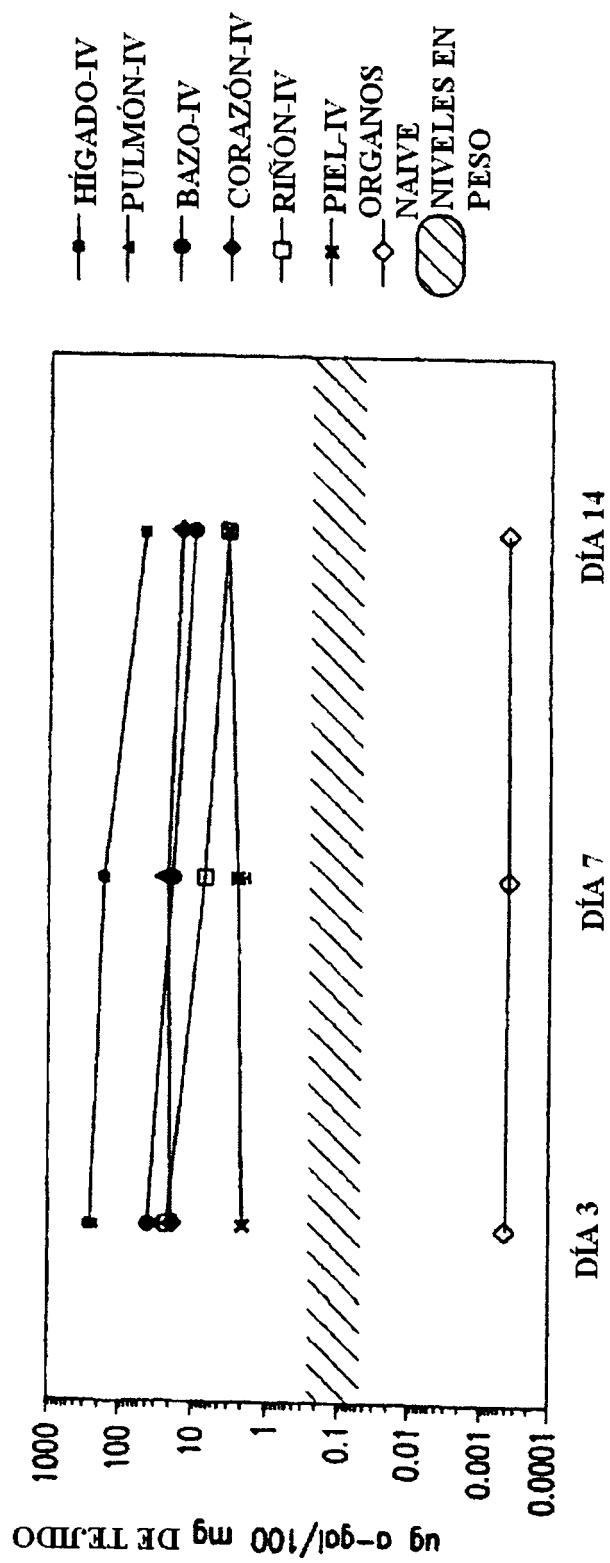


FIG.10A

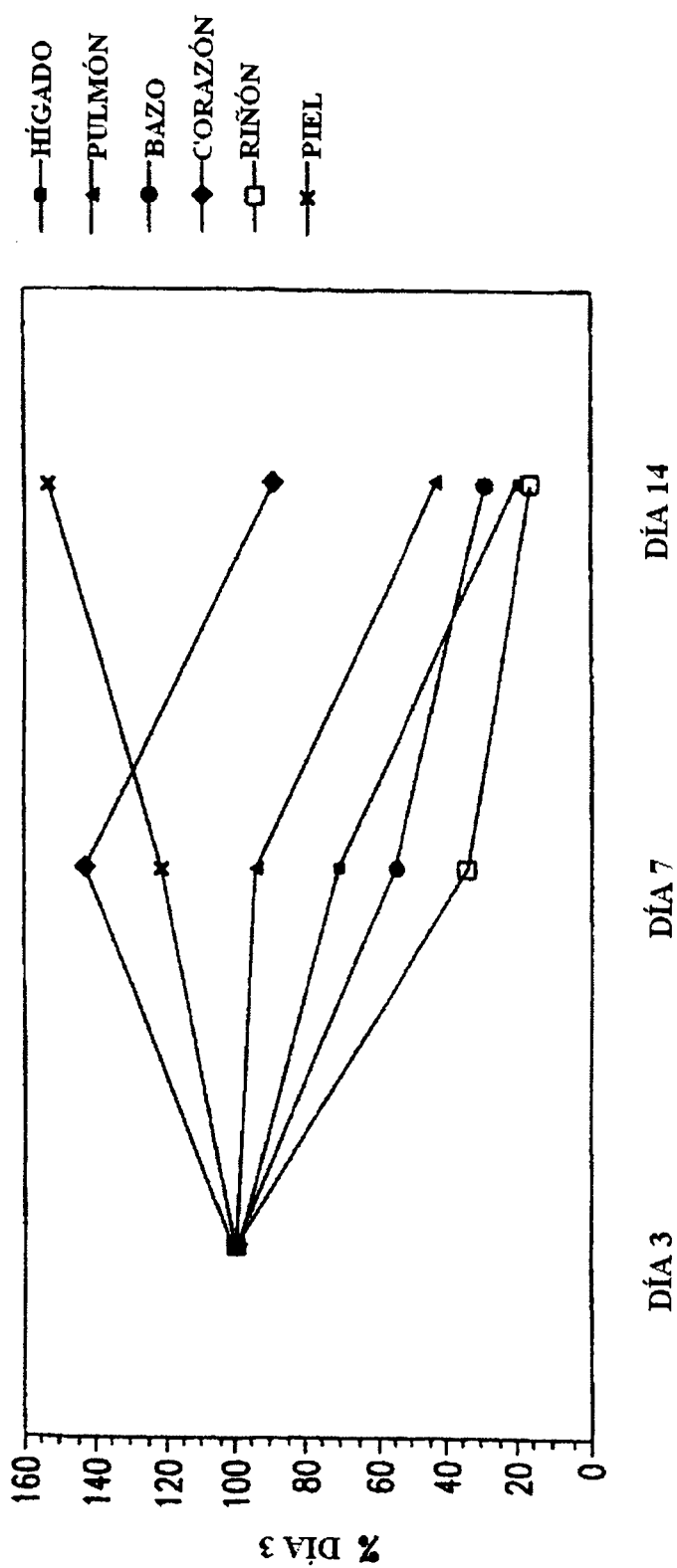


FIG.10B

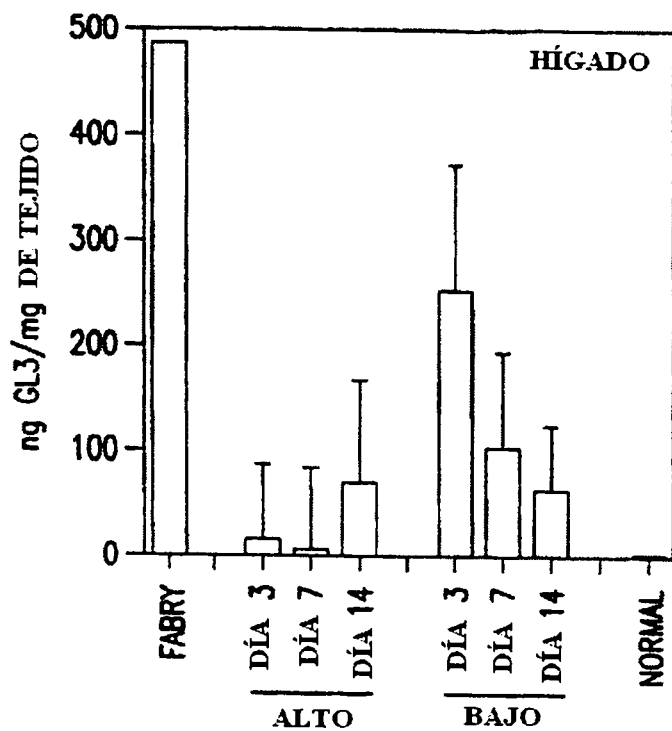


FIG.11A

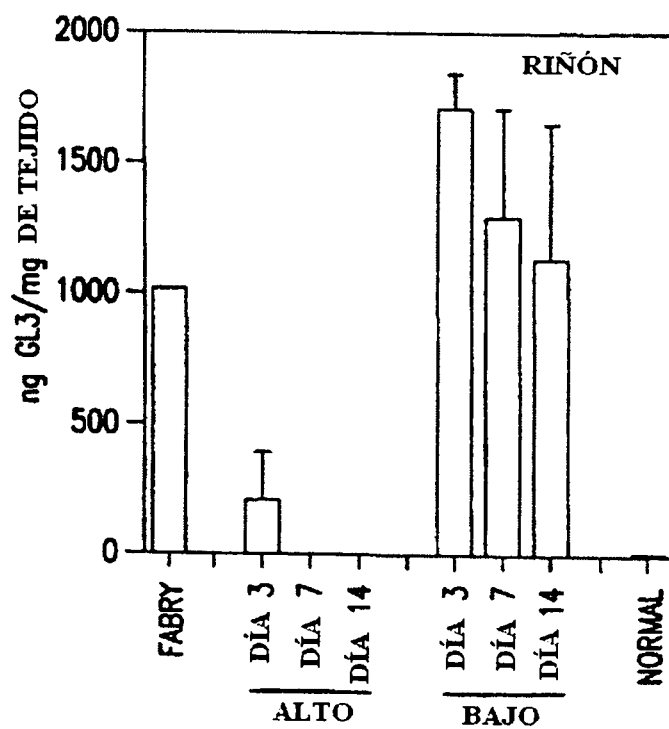


FIG.11B

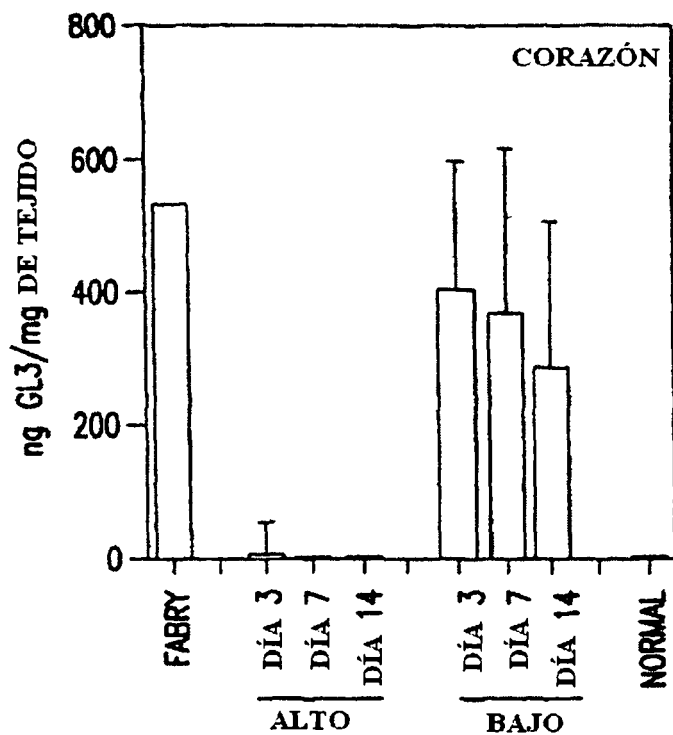


FIG.11C

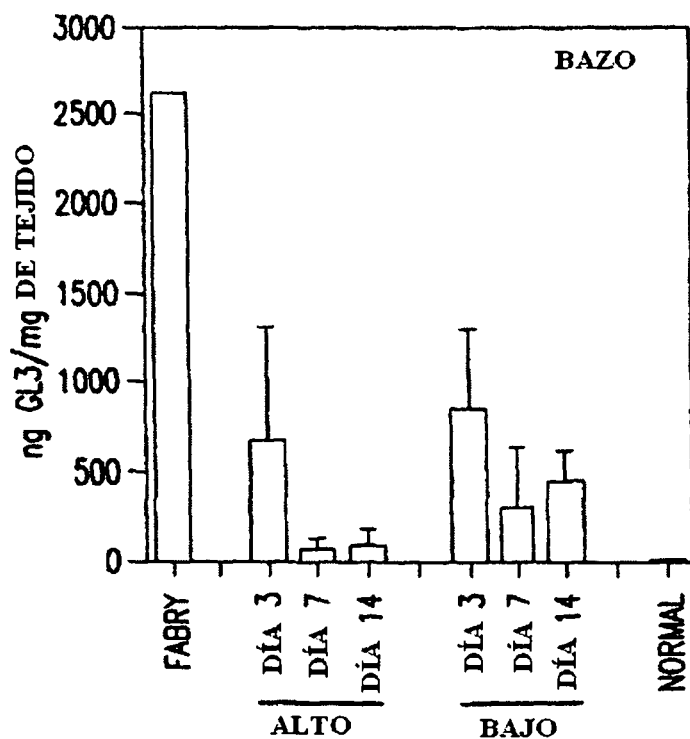


FIG.11D

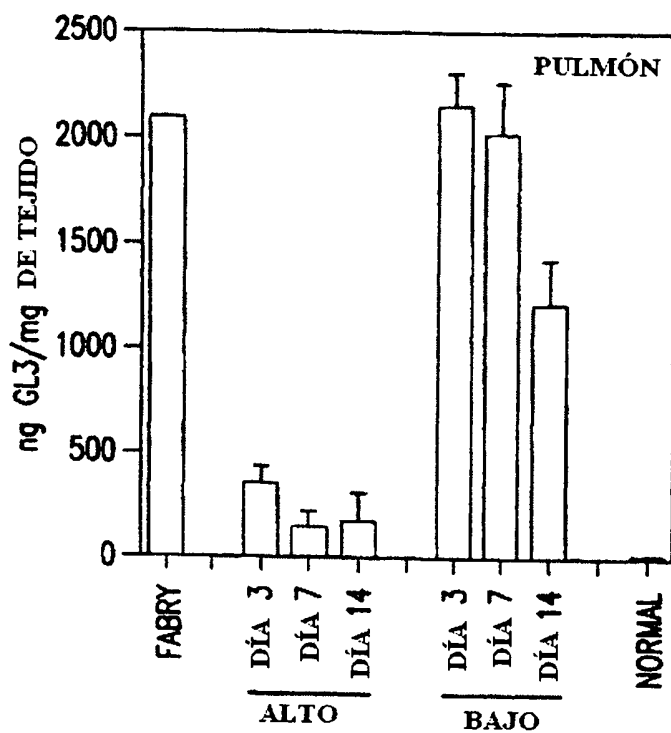


FIG.11E

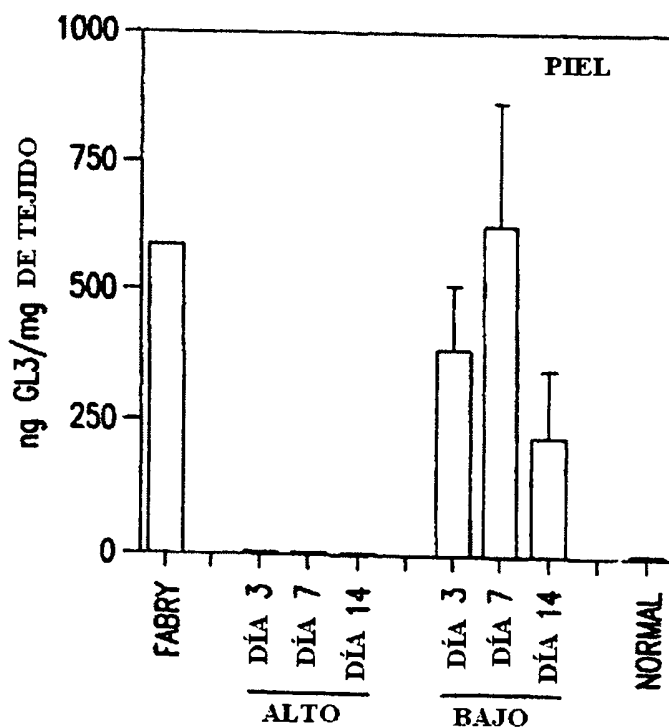


FIG.11F

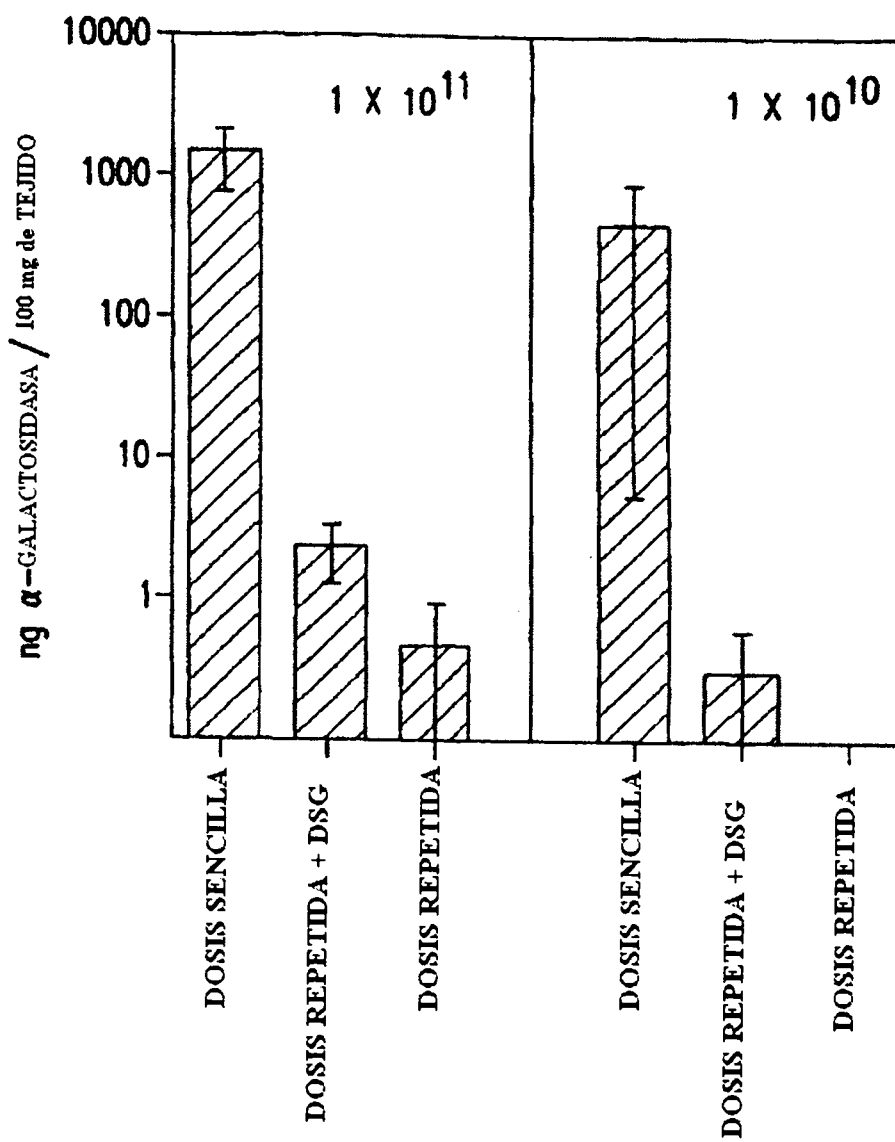


FIG.12

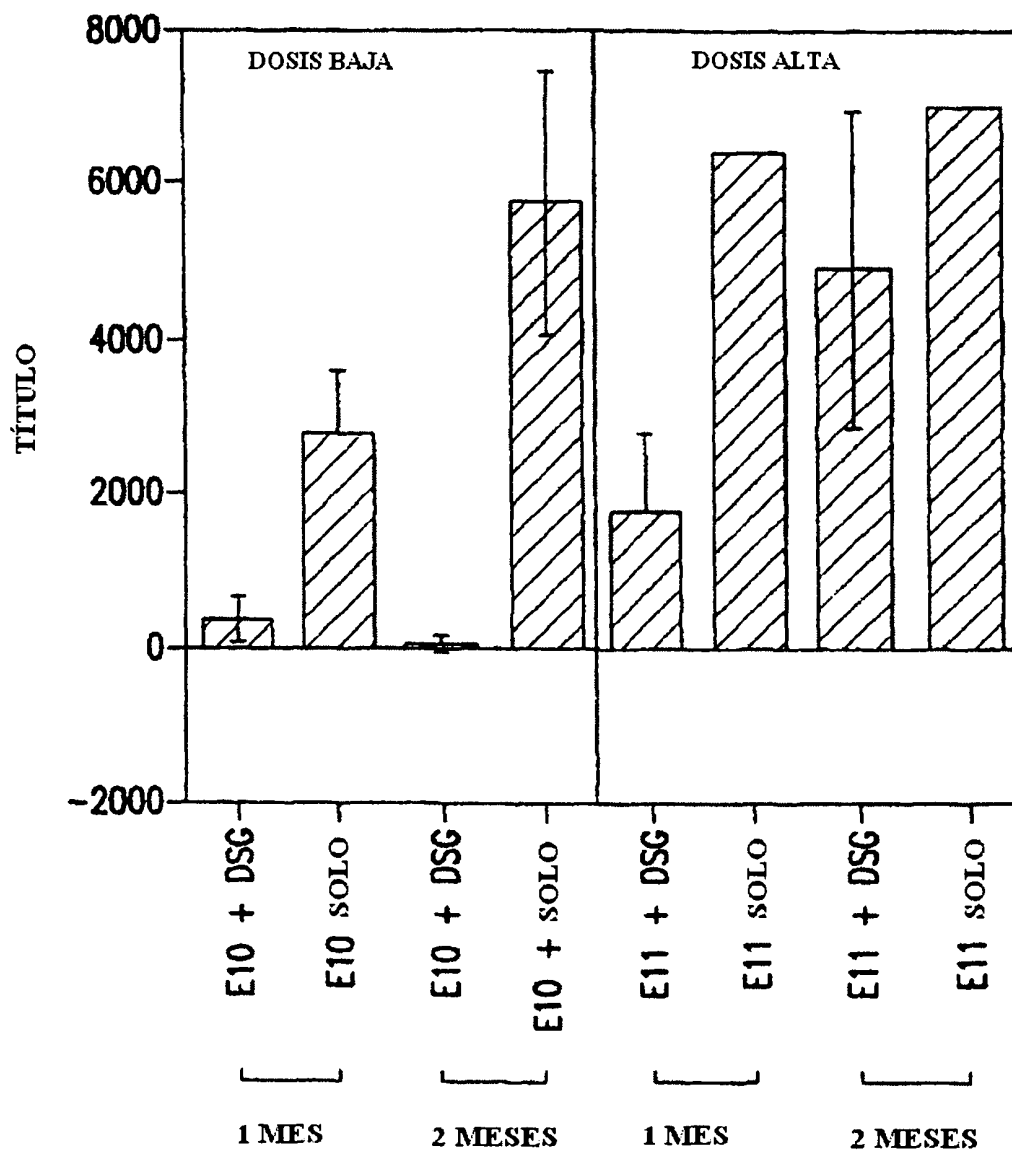


FIG.13

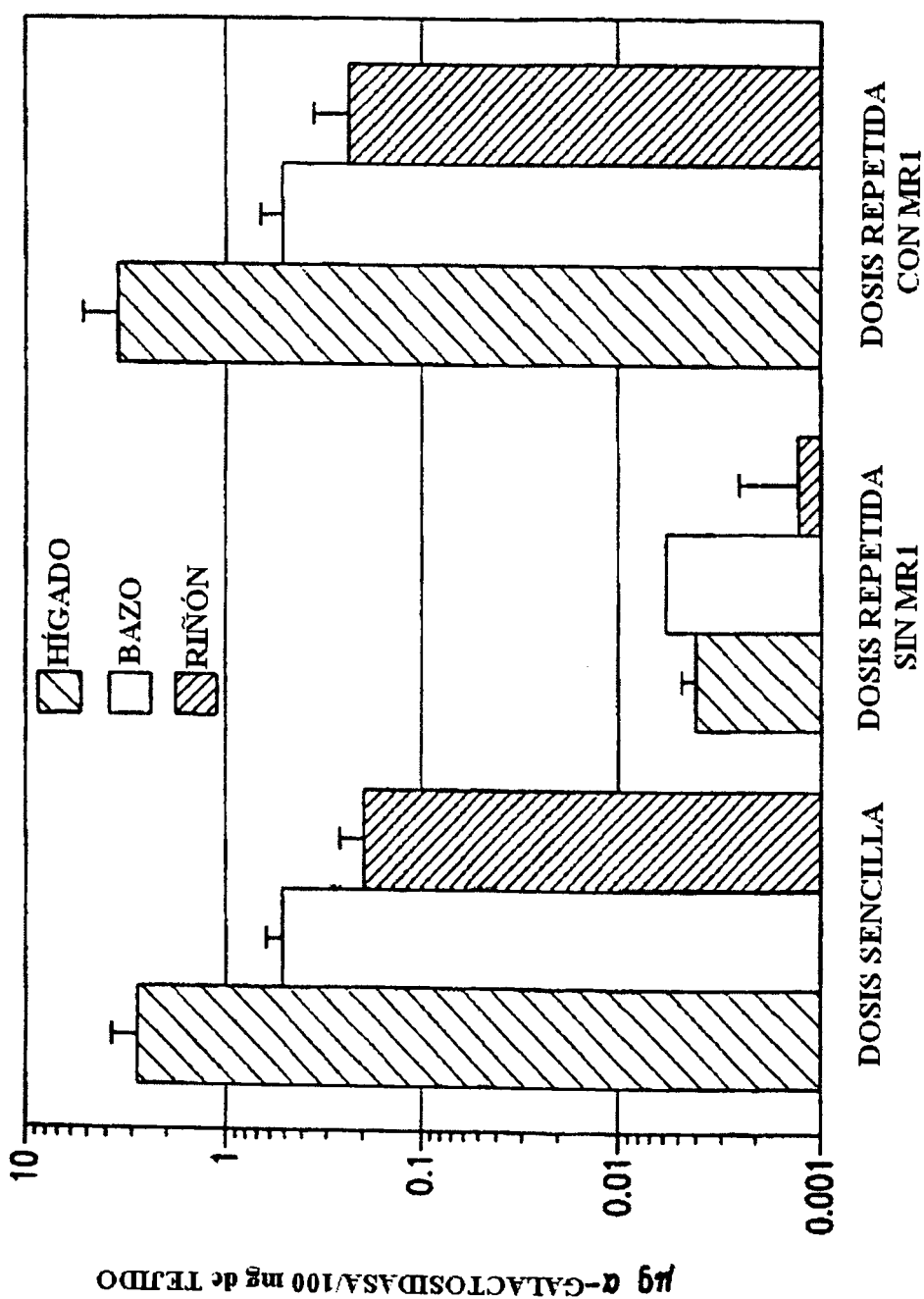


FIG.14