

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 837 826**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2013 PCT/US2013/043443**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13181446**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2013 E 13797749 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2020 EP 2861733**

54 Título: **Terapia metabólica para el estrés oxidativo en el cerebro a través del catabolismo neuronal direccionado del ácido N-acetil-aspártico**

30 Prioridad:

30.05.2012 US 201261653087 P

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

01.07.2021

73 Titular/es:

**ROWAN UNIVERSITY (100.0%)
201 Mullica Hill Road
Glassboro, NJ 08028, US**

72 Inventor/es:

**LEONE, PAOLA y
FRANCIS, JEREMY**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 837 826 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia metabólica para el estrés oxidativo en el cerebro a través del catabolismo neuronal direccionado del ácido N-acetil-aspartático

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un constructo para administración de genes para su uso en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo asociado con el estrés oxidativo. La invención tiene aplicaciones en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención

10 El término "enfermedad neurodegenerativa" abarca un amplio espectro de entidades patológicas fenotípicamente distintas que están conectadas superficialmente por su incidencia dentro del cerebro. El correcto funcionamiento de las redes neuronales del cerebro requiere el mantenimiento estricto de gradientes electroquímicos a través de las membranas celulares. Estos gradientes consumen mucha energía y representan aproximadamente el 20% del presupuesto energético total del cuerpo.

15 La función esencial del cerebro es apoyar la comunicación electroquímica de célula a célula, que se estima que consume el 47% del ATP derivado de la oxidación de la glucosa, con muy pocos sustratos de energía alternativa disponibles. Esta intensa demanda energética impone limitaciones a los aspectos fundamentales de la función cerebral, haciéndola sumamente sensible al compromiso energético. El estrés metabólico impone una gran demanda a esta fuente de energía relativamente restringida, y si el uso de energía continúa excediendo la generación, la función del sistema nervioso pronto se verá comprometida. El estrés oxidativo de esta naturaleza a menudo precede a la muerte neuronal y es un componente de prácticamente todas las enfermedades neurodegenerativas conocidas. Por tanto, la capacidad para minimizar el estrés oxidativo puede resultar eficaz en la progresión de los trastornos neurodegenerativos.

20 El ácido N-acetilaspártico (NAA) es el segundo derivado de aminoácidos neuronales más abundante en el cerebro. El NAA proporciona un índice clínico de integridad metabólica neuronal en casi todo el espectro de enfermedades neurodegenerativas debido a su estrecha asociación con la integridad metabólica neuronal. Las reducciones en los derivados de aminoácidos neuronales de NAA constituyen un marcador de integridad metabólica en casi todo el espectro neuropatológico, lo que sugiere la participación del NAA en un aspecto fundamental de la homeostasis metabólica. Sin embargo, a pesar de más de 50 años de investigación, la función del NAA en el contexto de la enfermedad neurodegenerativa sigue siendo oscura.

30 El ciclo metabólico natural del NAA está estrechamente compartimentado. La evidencia experimental indica que la función del NAA está restringida a un papel en la síntesis de ácidos grasos durante la mielinización en el desarrollo. Esta función depende de la enzima hidrolítica aspartoacilasa (ASP A). LA ASP A escinde el NAA en aspartato y acetato libre. En el cerebro, la ASP A está restringida principalmente a los oligodendrocitos productores de materia blanca, mientras que la síntesis ocurre casi exclusivamente en las neuronas.

35 La escisión de NAA en aspartato y acetato libre proporciona una unidad estructural acetilada que se cree que apoya la síntesis de ácidos grasos durante la mielinización en el desarrollo. Experimentos anteriores sugieren que las mitocondrias tienen un papel central en muchas enfermedades neurodegenerativas. Como el NAA puede ser un donante de acetilo en la vía de síntesis de lípidos de mielina en oligodendrocitos, a través de la actividad catabólica de la enzima ASP A, puede desempeñar un papel en la progresión de enfermedades neurodegenerativas.

40 También se cree que tanto la síntesis de ácidos grasos como de ATP requieren un suministro constante de acetil coenzima A (AcCoA). La inmensa mayoría de AcCoA disponible en el cerebro proviene directamente de la oxidación de la glucosa. Por lo tanto, durante el período intensivo de mielinización en el desarrollo, la escisión de NAA por ASP A en oligodendrocitos desacopla la síntesis de ácidos grasos de la generación de ATP mediante la suplementación de AcCoA.

45 Se cree además que la pérdida de la función de la ASPA da como resultado la desmielinización y la degeneración esponjiforme, lo que conduce a trastornos neurodegenerativos como la leucodistrofia pediátrica heredada de la enfermedad de Canavan (CD). La CD es la única enfermedad con patología conocida asociada con niveles anormalmente elevados de NAA en el cerebro. Otros trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (AD) también han sido objeto de mucha investigación. A pesar de los avances en la terapia, el Alzheimer sigue siendo una enfermedad debilitante y ninguna terapia actual trata el defecto básico de dicha afección. Aunque las enfermedades neurodegenerativas son invariablemente multifactoriales, la identificación de una respuesta al estrés común sería de considerable beneficio terapéutico.

55 La capacidad de redirigir los recursos metabólicos de funciones no esenciales probablemente forma la base para mantener la integridad celular frente al estrés patológico. Si la actividad de ASPA aumentara en las neuronas, podría lograrse un nuevo suplemento energético escindiendo concentraciones milimolares de NAA en su fuente para apoyar la síntesis de ATP. El estado de la técnica en este momento no ha descrito el uso de NAA como fuente para

la síntesis de ATP. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de explorar dicha fuente celular alternativa de AcCoA como fuente alternativa para la cascada de síntesis de ATP.

5 Moffett et al. "N-acetylaspartate in the CNS: From neurodiagnostics to neurobiology", Prog Neurobiol. 2007 Feb;81(2):89-131. Epub 2007 Jan 5. describe que las enfermedades y trastornos en donde disminuyen los niveles de NAA en el cerebro incluyen isquemia cerebral, lesión cerebral, cáncer de cerebro, esclerosis múltiple y enfermedad de Alzheimer, entre otras. Las reducciones regionales en la concentración de NAA y la relación NAA-creatina se encuentran en pacientes individuales y en grupos de pacientes que dan positivo en la prueba de demencia clínica. Los pacientes con enfermedad de Alzheimer muestran constantemente una reducción del 15-20% en NAA/Cr (o concentración de NAA) en la sustancia gris de la circunvolución cingulada posterior. Sin embargo, 10 Moffett et al. no proporciona un tratamiento exitoso de la enfermedad de Alzheimer empleando tal terapia génica el gen ASPA.

Sumario de la invención

15 La presente divulgación aborda las necesidades de la técnica anterior al proporcionar un método novedoso para producir AcCoA en neuronas. La presente invención proporciona un constructo para administración de genes que comprende un vector y un ácido nucleico que codifica aspartoacilasa (ASPA) para su uso en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo asociado con el estrés oxidativo, en donde el trastorno es la enfermedad de Alzheimer.

20 La presente divulgación se refiere a una expresión dirigida de ASPA en neuronas usando vectores virales recombinantes. La presente divulgación se refiere a un método novedoso para tratar trastornos cerebrales y lesiones cerebrales asociadas con tejidos deficientes en energía. La presente divulgación se refiere a un método para aliviar la deficiencia de energía en tejidos locales aumentando el catabolismo de NAA en neuronas. El catabolismo de NAA a nivel celular se logra mediante la enzima ASPA como un proceso de producción de energía que puede apoyar la síntesis de ATP al suministrar al menos un sustrato limitante de tasa como AcCoA.

25 La presente divulgación se refiere a métodos para expresar ASPA en neuronas, mediante métodos virales o no virales, para complementar el metabolismo oxidativo. En otro aspecto, la expresión de ASPA en neuronas proporciona una medida profiláctica para resistir el estrés oxidativo en los respectivos niveles celulares y tisulares de pacientes con riesgo de desarrollar una amplia gama de afecciones neurológicas clínicamente relevantes causadas por estrés metabólico y oxidativo.

30 La presente divulgación se refiere a métodos de tratamiento para cualquier afección neurodegenerativa o lesión del cerebro o del sistema nervioso central que incluye, pero no se limita a, la enfermedad de Alzheimer. En otro aspecto más, se describen métodos para tratar sujetos que padecen o están en riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa. Dichos métodos incluyen seguir los pasos de direccionar hacia las neuronas para la expresión extrafisiológica de ASPA mediante la administración de cantidades terapéuticamente efectivas de un ADN de ASPA o un constructo para administración que contiene vectores virales recombinantes y al menos un ADN endógeno o exógeno aislado que codifica la enzima ASPA o una proteína que regula la actividad intra y extracelular de ASPA.

35 La presente divulgación se refiere a nuevos métodos celulares para promover la síntesis extrafisiológica de ATP mejorando o potenciando la actividad de ASPA en células neurales que no contienen ASPA.

Breve descripción de las figuras

40 La Figura 1 proporciona que la expresión de ASPA en neuronas primarias da como resultado un aumento de los niveles de ATP durante el estrés oxidativo. Las neuronas corticales primarias se sometieron a privación de glucosa y oxígeno en presencia de NAA (10 mM) y se analizaron los niveles de AcCoA y ATP mediante HPLC. Los resultados indicaron que las células transducidas de AAV-ASP A (A) manifestaron cantidades significativamente mayores de ambos metabolitos energéticos (B & C) que los controles negativos de AAV-GFP, lo que sugiere una mayor resistencia al estrés oxidativo.

45 La Figura 2 proporciona la compartimentación natural de la síntesis y el catabolismo de NAA en el cerebro y la relación del metabolismo de NAA con la energía. La síntesis de NAA en las neuronas se basa en los metabolitos del ciclo del TCA, específicamente AcCoA. El NAA es exportado a los oligodendrocitos, que contienen ASPA, para la generación de acetato para apoyar la mielinización (síntesis de ácidos grasos). La presente invención describe el uso de vectores virales para introducir ASPA en neuronas para complementar los niveles celulares de AcCoA mediante la liberación de acetato a partir de moléculas de NAA. Por tanto, la transferencia de ASPA al 50 compartimento neuronal daría como resultado una ganancia neta de ATP.

55 La Figura 3 proporciona una demostración de aplicación general del coste energético de la síntesis de NAA y el potencial de aumento energético de ASPA. Se transfectaron células HEK-293 con casetes de expresión que contenían ADN plasmídico para NAA sintasa (Nat8L), ASPA o ambos. La sobreexpresión de Nat8L da como resultado grandes aumentos en NAA, medido por HPLC, y las correspondientes reducciones tanto en AcCoA como en ATP. La expresión de ASPA en células transfectadas con Nat8L revierte el déficit energético asociado con la síntesis de NAA al aumentar los niveles de AcCoA y ATP.

La Figura 4 representa los efectos de la transducción de ratones 5xFAD con AAV-ASPA sobre la integridad oxidativa. Se transdujeron animales de 6 semanas con AAV-ASPA y se analizaron los cerebros a los 4 meses de edad para NAA y GSH:GSSG en relación con la cirugía simulada, AAV-GFP y controles de tipo salvaje. (A) los niveles de NAA se redujeron significativamente en los cerebros de los animales AAV-ASPA en relación con los controles de AAV-GFP y cirugía simulada a los 4 meses (10 semanas después de las cirugías; n=6) junto con una mejora significativa en GSH: GSSG (B). Nótese la reducción significativa de GSH:GSSG en los controles 5xFAD (simulados y AAV-GFP) en relación con los animales de tipo salvaje. (C) Cromatograma de HPLC representativo que muestra la asociación entre la disminución de NAA y el aumento de GSH en los cerebros AAV-ASPA (línea negra) en comparación con los cerebros AAV-GFP (línea gris).

La Figura 5 proporciona pruebas de memoria en ratones 5xFAD a los 5, 7 y 9 meses de edad. En este escenario, a los ratones se les inyectó AAV-ASPA, AAV-GFP (una proteína fluorescente verde no funcional) o con solución salina fisiológica (Simulacro) a las 6 semanas de edad. A los 5, 7 y 9 meses de edad, los animales se probaron en el laberinto radial de 8 brazos junto con ratones normales no FAD de la misma edad (Tipo Salvaje). El número de entradas en los brazos visitados previamente (entradas repetidas) antes de completar la tarea (visitando todos los brazos) es la variable que se mide. Los ratones normales cometen pocos errores en todos los momentos en relación con los controles 5xFAD AAV-GFP y Simulacro. Los ratones 5xFAD AAV-ASPA mostraron reducciones muy significativas en los recuentos de errores en todas las edades analizadas (grupo rojo), lo que indica mejoras a largo plazo en la memoria.

La Figura 6 proporciona el casete de expresión AAV-ASPA. El mapa del plásmido AAV muestra los componentes del casete del transgén ASPA. Los elementos circunscritos por las ITR se empaquetan en viriones AAV 2 como se muestra.

La Figura 7 proporciona los componentes de cada unidad de ADNs que está empaquetada dentro de la cápside de AAV; el Casete de Transcripción rAAV. Se describe con más detalle la fabricación de rAAV2-NSE- ASPA-WPRE-bGH. En consecuencia, el casete de transcripción de AAV consistía en un promotor de enolasa específica de neurona de rata (NSE) de 1.8 kb que flanqueaba el ADNc de ASPA, en el extremo 5' y el elemento regulador postraducción del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) y secuencias de la hormona del crecimiento bovino poli A (bGHpA) que flanquean el ADNc en el extremo 3', con el casete limitado por secuencias ITR de AAV2. En esta realización, el VAA recombinante se produjo mediante transfección transitoria de células HEK 293 seguida de recolección y purificación que implican cromatografía en columna de afinidad con sulfato de heparina. La formulación final fue como AAV2-NSE-ASPA-WPRE-bGHpA recombinante, en IX solución salina regulada con fosfato.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas

La presente invención proporciona un constructo para administración génica que comprende un vector y un ácido nucleico que codifica aspartoacilasa (ASPA) para su uso en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo asociado con el estrés oxidativo, en donde el trastorno es la enfermedad de Alzheimer.

Preferiblemente, la enfermedad de Alzheimer es una enfermedad hereditaria.

Preferiblemente, el ácido nucleico comprende una secuencia identificada como SEQ ID No: 1.

Preferiblemente, el vector es un vector viral o un vector no viral.

Preferiblemente, el vector viral se selecciona del grupo que consiste en un vector AAV1, un vector AAV2, un vector AAV3, un vector AAV4, un vector AAV5, un vector AAV6, un vector AAV7, un vector AAV8, un vector AAV9, un vector AAV 10 vector, un vector AAV1 1, un vector retroviral, un vector alfaviral; un vector viral de vaccinia; un vector adenoviral y un vector viral del herpes simple.

Preferiblemente, el vector no viral es un lípido, una polilisina, un polímero poliamino sintético, o un plásmido.

Preferiblemente, el ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia identificada como SEQ ID No: 2.

Se contemplan nuevos procesos de producción de energía, mediante los cuales los inventores emplean la conversión catabólica de NAA dependiente de ASPA como vía para generar sustratos limitadores de tasas esenciales para la síntesis de ATP. El catabolismo de NAA a nivel celular aumenta el suministro de sustrato AcCoA que respectivamente soporta la síntesis de ATP en el sitio de interés que genera una fuente adicional de AcCoA para energía metabólica. Se describen métodos para tratar sujetos que lo requieren en donde el método proporciona la expresión de ASPA en neuronas o cualquier otra célula dentro del sistema nervioso que no muestre de forma natural expresión de ASPA.

Se divulgan constructos para administración de terapia génica que contienen un ADN aislado de ASPA (SEQ. ID. No. 1) o ADN para cualquiera de aspartoacilasa; aminoacilasa II; N-acetilaspártato amidohidrolasa; acetil-aspártico desaminasa; acilasa II y virus adenoviral asociado (AAV). También se describen composiciones farmacéuticas y

métodos para tratar, prevenir o reducir los síntomas de enfermedades neurodegenerativas asociadas con la neurodegeneración que conducen a trastornos como la enfermedad de Alzheimer.

5 Se divulgan además composiciones y métodos para el tratamiento de la AD que utilizan la expresión transgénica de ASPA dentro de células que no tienen ASPA o que están patofisiológicamente comprometidas para expresar ASPA en cantidades suficientes. El gen ASPA que se va a expresar en las células huésped es un gen ASPA desnudo, de tipo salvaje o mutado, o está en forma de un constructo para administración de AAV -ASAP. Una ASPA viral o no viral no inmunogénica que contiene constructos para administración que comprenden AAV y un ADN ASPA aislado, se administra a un paciente con riesgo de AD en cantidades terapéuticamente efectivas para tratar o ralentizar la progresión de la desmielinización a nivel neuronal. El ácido nucleico que codifica ASPA está alineado operativamente con un promotor. El promotor es un promotor específico de tejidos o células, por ejemplo un promotor específico de neuronas. Dichos promotores son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el promotor de enolasa específico de neuronas.

15 Los métodos divulgados para aumentar el proceso metabólico se pueden lograr mediante intervenciones genéticas, farmacológicas y dietéticas adicionales que mejorarían la disponibilidad local de ATP a través del direccionamiento de NAA en el cerebro. El aumento del proceso metabólico incluye, por ejemplo, la expresión de ASPA extrafisiológica en neuronas, astrocitos u oligodendrocitos (por ejemplo, la expresión de ASPA en neuronas colinérgicas del cerebro con enfermedad de Alzheimer); expresión de Nat8L extrafisiológico (NAA sintasa) en neuronas, astrocitos u oligodendrocitos; administración de agentes farmacológicos que alteran la expresión de ASPA o NatSL en neuronas, astrocitos u oligodendrocitos; manipulación genética o farmacológica de rutas de señalización que se dirigen a la síntesis o catabolismo de NAA en neuronas, astrocitos u oligodendrocitos; y manipulación de células madre con el fin de modular la síntesis o el catabolismo de NAA (por ejemplo, la expresión ex vivo de ASPA; la síntesis ex vivo de NAA sintasa).

25 La presente invención se puede complementar instituyendo un régimen dietético que se dirija a la síntesis o catabolismo de NAA en neuronas, astrocitos u oligodendrocitos. Dicho régimen puede incluir la administración de anti-oxidantes tales como vitamina E, vitamina C, flavonoides, polifenoles de hierbas, carotenoides adecuados, terapia con cetonas, triheptanoína, ácido succínico y acetato de calcio.

30 El ciclo metabólico natural de NAA está estrechamente compartimentado, con síntesis restringida a neuronas y catabolismo por ASPA a oligodendrocitos. El NAA constituye aproximadamente el 1% del peso seco del cerebro de los mamíferos y está presente en cantidades milimolares, estando la inmensa mayoría presente intraneuronalmente. Por lo tanto, la expresión de ASPA en células neurales, neuronas y astrocitos, a través de métodos virales o no virales, tendrá acceso directo a un suministro abundante de sustratos que pueden usarse para suplementar el metabolismo oxidativo en células que se ven afectadas por una amplia gama de patologías neuronales.

35 Los inventores describen un modelo animal en donde un ratón transgénico sin ASPA manifiesta marcadores metabólicos de estrés oxidativo inmediatamente antes de la degeneración progresiva de la sustancia blanca. Los expertos en la materia pueden apreciar que un aumento en los marcadores metabólicos del estrés oxidativo indica que el catabolismo de NAA juega un papel central en el mantenimiento de la integridad metabólica en los oligodendrocitos productores de materia blanca (Francis et. Al. 2012). Los métodos y kits para analizar la concentración de tales marcadores metabólicos se describen como herramientas de diagnóstico para evaluar el riesgo del paciente de desarrollar enfermedades neurodegenerativas como la AD.

40 Si bien la actividad de ASPA está restringida a las células de la materia blanca en el cerebro, la capacidad demostrable de los niveles extrafisiológicos de actividad de ASPA para complementar la síntesis de ATP proporciona estrategias e intervenciones terapéuticas en las células del cerebro. Se divulga el mecanismo de administración de un constructo que contiene ASPA a tejidos y áreas que son nulas de ASPA, están en riesgo de deficiencia de expresión de ASPA, o están en riesgo de experimentar o sufrir estrés oxidativo.

45 Se divulgan métodos de administración de un ácido nucleico que codifica ASPA o un homólogo del mismo funcionalmente mutado a poblaciones específicas de células cerebrales in vivo para la generación de acetato libre que apoyaría respectivamente la síntesis de ATP. Se describen métodos para aumentar la resistencia frente al estrés oxidativo y, posteriormente, la muerte celular provocada por el estrés oxidativo en condiciones neurológicas degenerativas asociadas a la desmielinización.

50 Se describen células recombinantes que se transforman con la expresión de un ácido nucleico que codifica ASPA o un homólogo funcionalmente mutado del mismo con al menos 75%, 85%, 90% o 95% de homología. El ácido nucleico que codifica la ASPA se introduce en las células hospedadoras de interés mediante administración directa o mediante un constructo que comprende AAV y un ácido nucleico que codifica la ASPA (SEQ ID No: 1) o un fragmento funcional del mismo en forma salvaje o un homólogo funcionalmente mutado, en donde el ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos de (SEQ ID No: 2) o está operativamente enlazado a un promotor. Las células recombinantes se aíslan y preparan para su administración a un sujeto o se hacen crecer y cultivan in vitro para uso futuro. Las células adecuadas incluyen una célula de mamífero, preferiblemente neuronas humanas, astrocitos, oligodendrocitos u oligodendrocitos deficientes en ASPA. Se describen métodos para producir AcCoA celular mediante la adopción de medidas que incluyen (a) el cultivo de células huésped que se transforman con la

expresión de ácido nucleico que codifica ASPA a través de un mecanismo de administración, (b) el aislamiento de una población de células que muestran una elevación en la concentración de ASPA y (c) la administración de dicha población de células en un portador farmacéuticamente aceptable a un paciente con riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa como la AD. El mecanismo de suministro puede incluir el suministro de un constructo que consta de AAV y un ácido nucleico que codifica ASPA (SEQ. ID. No: 1) o un fragmento funcional del mismo, y en donde el ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos de (SEQ. ID. No: 2) o un péptido unido operativamente a un promotor en condiciones que promueven la expresión de dicha ASPA.

El virus adenoasociado (AAV) es un parvovirus de ADN monocatenario, que se integra en el genoma del huésped durante la fase latente de infectividad. El AAV se considera un virus dependiente porque requiere funciones auxiliares del adenovirus o del virus del herpes para poder replicarse. En ausencia de cualquiera de estos virus auxiliares, el VAA puede infectar células, desencadenarse en el núcleo e integrar su genoma en el cromosoma de la célula huésped, pero no puede replicarse ni producir nuevas partículas virales. Se describe que los AAV son útiles como vectores transductores, en parte, porque ninguno de los serotipos conocidos se ha relacionado con ninguna enfermedad humana. Esta característica hace que los AAV sean distintos de los parvovirus autónomos, que pueden causar una variedad de trastornos humanos. Los serotipos adecuados incluyen, entre otros, AAV tipo 1, AAV tipo 2, AAV tipo 3 (incluidos los tipos 3 A y 3B), AAV tipo 4, AAV tipo 5, AAV tipo 6, AAV tipo 7, AAV tipo 8, AAV tipo 9, AAV tipo 10, AAV tipo 11, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV ovino. En una realización más preferida, dichos vectores son un vector AAV1, un vector AAV2, un vector AAV3, un vector AAV4, un vector AAV5, un vector AAV6, un vector AAV7, un vector AAV8, un vector AAV9, un vector AAV 10, o un vector AAV1 1.

La presente invención también contempla el uso de otros vectores virales o no virales y constructos para administración que pueden facilitar la administración del gen ASPA al tejido o área de interés. Los constructos para administración descritos en este documento incluyen, "constructo vector", "vector de expresión" y "vector de transferencia de genes" o cualquier otro constructo de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen de interés y que puede transferir secuencias de genes a células diana. Por tales razones, cualquier constructo para administración para los propósitos de la presente invención incluye constructos virales o no virales que no provocan una respuesta inmunogénica, tienen un amplio rango de hospedadores, un excelente perfil de seguridad y la duración de la expresión del transgén en hospedadores infectados, puede ser un candidato para los mecanismos de administración aquí descritos. Otros vectores virales incluyen, pero no se limitan a, un vector retroviral, un vector alfaviral; un vector viral de vaccinia; un vector adenoviral y un vector viral del herpes simple. En otra realización, el vector no viral incluye, pero no se limita a, un lípido, una polilisina, un poliamino polímero sintético, o un plásmido.

Como se usa en el presente documento, los términos "transferencia de genes", "suministro de genes" y "transducción de genes" se refieren a métodos o sistemas para insertar de forma fiable una secuencia de nucleótidos particular (por ejemplo, ADN) en células diana. Este mecanismo puede incluir no solo ADN desnudo o aislado de tipo salvaje para ASPA, sino también cualquier homólogo del mismo con al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% de homología.

Como se usa en este documento, el término "terapia génica" se refiere a un método de tratamiento de un paciente en donde las secuencias de ácido nucleico se transfieren a las células de un paciente de manera que se restaura la actividad y/o la expresión de una molécula, polipéptido, proteína o enzima particular o iniciado.

El término "ácido nucleico" como se usa en este documento se refiere a una secuencia de ADN o ARN. Los ácidos nucleicos pueden, por ejemplo, ser monocatenarios o bicatenarios. El término incluye secuencias tales como cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN. El término "molécula de ADN recombinante" se refiere a una molécula de ADN que se compone de segmentos de ADN unidos mediante técnicas de biología molecular. El término "elemento regulador" se refiere a un elemento genético que puede controlar la expresión de secuencias de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor es un elemento regulador que facilita el inicio de la transcripción de una región codificante unida operativamente. Otros elementos regulatorios son señales de empalme, señales de terminación, etc.

Los expertos en la técnica pueden apreciar que los inventores divulgan métodos de tratamiento que pueden usarse en el manejo de diversos trastornos neurodegenerativos. Estas enfermedades pueden ser afecciones hereditarias y/o esporádicas que se caracterizan por una disfunción progresiva del sistema nervioso y, a menudo, están asociadas con atrofia de las estructuras centrales o periféricas afectadas, desmielinización y formación de placas dentro del sistema nervioso. Incluyen enfermedades como la enfermedad de Alzheimer y otras demencias, Cáncer de Cerebro, Enfermedades Nerviosas Degenerativas, Encefalitis, Epilepsia, Trastornos Cerebrales Genéticos, Malformaciones de la Cabeza y el Cerebro, Hidrocefalia, Accidente Cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, Esclerosis Múltiple, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA o Enfermedad de Lou Gehrig), Enfermedad de Huntington, Enfermedades Priónicas, Lesión Cerebral Traumática y otras. Los tejidos patofisiológicos afectados por tal condición incluyen, pero no se limitan a, la corteza cerebral; sustancia blanca intracraneal, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, tronco encefálico y cerebelo.

La enfermedad de Alzheimer manifiesta una disminución de la integridad de las redes neuronales que participan en el aprendizaje y la memoria y es la principal enfermedad neurodegenerativa relacionada con la edad. Actualmente no existe un tratamiento eficaz para la AD. Además de la edad, los factores de riesgo conocidos para la AD son

pocos, pero las neuronas sensoriales colinérgicas ocupan un lugar destacado en la enfermedad. Estas neuronas sintetizan acetilcolina (ACh) a través de un proceso intensivo en energía que depende de la glucosa, y requiere AcCoA. La síntesis de acetilcolina se reduce en la AD y los defectos colinérgicos preceden a la formación de placa en modelos de ratones β -amiloides mutantes de AD.

- 5 La ACh tiene paralelismos significativos con el NAA en cuanto ambos son derivados acetilados que requieren intermedios del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) para la síntesis. La síntesis de ACh está soportada por el reciclaje de colina y acetato de la hendidura sináptica a través de la acetilcolinesterasa (AChE), que descompone la ACh en los constituyentes colina y acetato para su readsorción por la terminal presináptica. Entonces, el acetato está disponible para la síntesis de AcCoA, que a su vez contribuye tanto a ACh como a ATP.
- 10 Los presentes inventores han generado datos de eficacia en un modelo de ratón de AD familiar mediante la transducción de neuronas colinérgicas con vectores virales adenoasociados que contienen ASPA (AAV-ASPA). Los datos apoyan las demandas energéticas de la síntesis de ACh mediante la provisión de niveles extrafisiológicos de AcCoA (Figura 3). El término "en combinación operable", "en orden operable" o "unido operablemente" se refiere al enlace de secuencias de ácido nucleico de tal manera que una primera molécula de ácido nucleico (por ejemplo, promotor) es capaz de dirigir la transcripción de una segunda secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADNsi).

15 El término "tratar" o "tratamiento" como se usa en este documento se refiere a ejecutar un protocolo, que puede incluir administrar uno o más fármacos a un paciente (humano o de otro tipo), en un esfuerzo por aliviar los signos o síntomas de la enfermedad. El alivio puede ocurrir antes de que aparezcan los signos o síntomas de la enfermedad, así como después de su aparición. Por tanto, "tratar" o "tratamiento" incluye "prevenir" o "prevención" o "tratar profilácticamente" una enfermedad. Además, "tratar" o "tratamiento" no requiere el alivio completo de los signos o síntomas, no requiere una cura y específicamente incluye protocolos que tienen solo un efecto marginal en el paciente.

20 El término "paciente" o "sujeto" que lo requiere se refiere a un sistema biológico al que se puede administrar un tratamiento para el beneficio clínico añadido. Un sistema biológico puede incluir, por ejemplo, un paciente humano, mamíferos como ratones, roedores, perros, gatos y otros animales como peces, pájaros, etc.

25 El tratamiento de defectos en las células o tejidos cerebrales afectados por cualquier enfermedad neurodegenerativa, que implica desmielinización y/o atrofia cerebral, puede revertirse mediante los métodos descritos en este documento. También se ha descrito un tratamiento específico de tejido mediante el cual los tejidos de las células sin ASPA pueden tratarse ex vivo o in vivo para expresar el ácido nucleico que codifica ASPA. En otro aspecto de la presente invención, la expresión de ASPA conducirá a mejorar el catabolismo de NAA y aumentar las concentraciones de AcCoA, un sustrato para la vía metabólica. En realizaciones particularmente preferidas, el AAV-ASPA con un promotor adecuado muestra una excelente expresión en células neuronales de un mamífero, lo que indica la reversión de las manifestaciones neurodegenerativas.

30 Como se define en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente efectiva" o "dosis terapéuticamente efectiva" es una cantidad o dosis de constructos de ADN de AAV-ASPA capaz de producir cantidades suficientes de una proteína deseada para restaurar o reiniciar la actividad de la ASPA, proporcionando así sustratos para acelerar la vía sintética de ATP. Una cantidad o dosis terapéuticamente efectiva del constructo de AAV transfectado que confiere expresión de ASPA humana, por ejemplo, a un paciente que padece AD, disminuirá los síntomas de la AD. Además, una cantidad o dosis terapéuticamente efectiva del constructo de terapia génica de AAV transfectada que proporcione expresión de ASPA humana o una parte activa de la misma tratará, evitará o tratará profilácticamente cualquier daño adicional al sistema nervioso central, las células cerebrales, u otros tejidos afectados por tales condiciones.

35 Las células del sujeto útiles para cultivo y/o administración incluyen todas las células dentro del sistema nervioso independientemente del tipo o ubicación. En consecuencia, tales células pueden ser de tres tipos de células nerviosas; neuronas motoras nerviosas, neuronas sensoriales y neuronas autónomas y ubicaciones tales como corteza cerebral; sustancia blanca intracraneal, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, tronco encefálico y cerebelo.

40 Los vectores y constructos de terapia génica de VAA de la presente invención se pueden preparar usando técnicas conocidas en la técnica para proporcionar, como componentes operativamente enlazados, (a) secuencias de control que incluyen regiones de iniciación y terminación de la transcripción y (b) secuencias de nucleótidos que codifican una proteína deseada o un fragmento funcional de la misma. Los vectores virales adecuados para la administración del ácido nucleico ASPA incluyen, pero no se limitan a, los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 de AAV, preferiblemente AAV2. En una realización, los vectores adecuados incluyen vectores de virus (por ejemplo, retrovirus, alfavirus; virus vaccinia; adenovirus, virus adenoasociado o virus de herpes simplex), y vectores no virales como vectores de lípidos, vectores de polilisina, polímero de poliamino sintético, vectores que se utilizan con moléculas de ácido nucleico, plásmidos y similares.

55 En otra realización, los vectores virales adecuados incluyen, pero no se limitan a, vectores derivados de: Adenoviridae; Birnaviridae; Bunyaviridae; Caliciviridae, grupo Capillovirus; grupo de Carlavirus; grupo de virus de Carmovirus; Grupo Caulimovirus; Grupo de Closterovirus; grupo del virus del moteado amarillo de la Commelina;

Grupo de virus Comovirus; Coronaviridae; grupo de fagos PM2; Corcicoviridae; grupo de Virus Crípticos; grupo Criptovirus; grupo de virus de la Familia Cucumovirus (grupo de fagos [PHgr] 6; Cysioviridae; Grupo de Mancha anular de Clavel; Grupo de virus Diantovirus; Grupo de Marchitamiento de la haba; Grupo de virus Fabavirus; Filoviridae; Flaviviridae; Grupo de Furovirus; Grupo de Geminivirus; Grupo de Gardiavirus; Hepadnaviridae; 5 Herpesviridae; grupo de Virus Hordeivirus; grupo de virus Illarvirus; Inoviridae; Iridoviridae; Leviviridae; Lipothrixviridae; grupo de Luteovirus; grupo de virus Marafivirus; grupo de virus enanos cloróticos del Maíz; icroviridae; Myoviridae; grupo de Necrovirus; grupo de virus Nepovirus; Nodaviridae; Orthomyxoviridae; Papovaviridae; Paramyxoviridae; grupo del virus de la mancha amarilla de la Chirivía; Partitiviridae; Parvoviridae; Grupo de virus del mosaico del guisante; Phycodnaviridae; Picornaviridae; Plasmaviridae; Prodoviridae; 10 Polydnviridae; Grupo de Potexvirus; Potyvirus; Poxviridae; Reoviridae; Retroviridae; Rhabdoviridae; Grupo Rhizidiovirus; Siphoviridae; grupo de Sobemovirus; Fagos de Tipo SSV 1; Tectiviridae; Tenuivirus; Tetraviridae; Grupo Tobamovirus; Grupo Tobravirus; Togaviridae; Grupo Tombusvirus; Grupo Torovirus; Totiviridae; Grupo Tymovirus; y satélites de virus de Plantas.

15 Los expertos en la técnica apreciarán que se puedan encontrar los protocolos que se usan para producir vectores virales recombinantes y para usar vectores virales para la administración de ácidos nucleicos. Dichos protocolos se pueden encontrar, por ejemplo, en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989) y otros manuales de laboratorio estándar (por ejemplo, *Vectors for Gene Therapy*. In: *Current Protocols in Human Genetics*. John Wiley and Sons, Inc.: 1997).

20 En otro aspecto de la presente invención, los vectores empleados en los métodos de esta invención pueden ser, por ejemplo, un plásmido, un vector no viral o un vector viral, tal como un vector retroviral que puede empaquetar un genoma retroviral recombinante (ver, por ejemplo, Pastan et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:4486 (1988); Miller et al, *Mol. Cell. Biol.* 6:2895 (1986)). En este aspecto de la invención, el retrovirus recombinante se puede usar para infectar y de ese modo administrar un ácido nucleico de la invención a las células infectadas. El método exacto de introducir el ácido nucleico alterado en células de mamífero, por supuesto, no se limita al uso de vectores 25 retrovirales. Otras técnicas están ampliamente disponibles para este procedimiento, incluido el uso de vectores adenovirales (Mitani et al, *Hum. Gene Ther.* 5:941-948, 1994), vectores virales adenoasociados (AAV) (Goodman et al, *Blood* 84: 1492-1500, 1994), vectores lentivirales (Naldini et al, *Science* 272:263-267, 1996), vectores retrovirales pseudotipificados (Agrawal et al, *Exper. Hematol.* 24:738-747, 1996).

30 También se describen partículas virales quiméricas, que son bien conocidas en la técnica y contienen proteínas virales y/o ácidos nucleicos de dos o más virus diferentes en cualquier combinación para producir un vector viral funcional. Las partículas virales quiméricas también pueden comprender una secuencia de aminoácidos y/o nucleótidos de origen no viral (por ejemplo, para facilitar el direccionamiento de vectores a células o tejidos específicos y/o para inducir una respuesta inmune específica).

35 La presente invención también describe partículas de virus "dirigidas" (por ejemplo, un vector de parvovirus que comprende una cápside de parvovirus y un genoma de AAV recombinante, en donde se ha insertado o sustituido una secuencia de direccionamiento exógena en la cápside de parvovirus).

40 Las técnicas de transducción física también pueden usarse como un modo de suministro de la secuencia de ácido nucleico ASPA. Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a, liberación de liposomas y mecanismos de endocitosis mediados por receptores y otros (véase, por ejemplo, Schwartzenberger et al., *Blood* 87:472-478, 1996). Otros medios apropiados para la transfección, que incluyen vectores virales, transfectantes químicos o métodos físico-mecánicos tales como electroporación y difusión directa de ADN, se describen, por ejemplo, en Wolff et al, *Science* 247: 1465-1468, (1990); y Wolff, *Nature* 352:815-818, (1991).

45 También se pueden expresar proteínas recombinantes utilizando los métodos de la presente invención. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el gen ASPA o una parte del mismo se pueden fusionar en el marco, con respecto al marco de lectura de traducción, con secuencias de ácido nucleico que codifican etiquetas o epítomos. Dichas etiquetas y/o epítomos se utilizan de forma rutinaria por los profesionales expertos para rastrear la expresión de proteínas y como medio para purificar proteínas recombinantes. Las etiquetas pueden ser útiles para detectar la expresión del transgén después de la administración.

50 Las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas descritas anteriormente pueden obtenerse usando métodos recombinantes, tales como cribado de ADNc y bibliotecas genómicas de células que expresan proteínas o derivando la secuencia de un vector que se sabe que incluye las mismas. Además, la secuencia deseada puede aislarse directamente a partir de células y tejidos que la contengan, utilizando técnicas estándar, tales como extracción con fenol y PCR de ADNc o ADN genómico. Las secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de interés también pueden producirse sintéticamente, en lugar de clonarse. Por ejemplo, la secuencia completa puede 55 ensamblarse a partir de oligonucleótidos superpuestos preparados mediante métodos estándar y ensamblarse en una secuencia codificadora completa (véase, por ejemplo, Edge, *Nature* 292:756 (1981); Nand Jay et al, *J. Biol. Chem.*, 259:6311 (1984)).

Aunque no se pretende que la presente invención se limite a ningún método particular para evaluar la producción de proteínas biológicamente activas o evaluar la capacidad de moléculas que pueden modular la actividad del

catabolismo de ASPA y NAA, también se contemplan métodos tales como inmunoensayos y ensayos de actividad biológica *in vitro* e *in vivo*.

La siguiente es una realización de ejemplo de la presente invención en la que las secuencias de ácido nucleico que codifican ASPA se producen y administran a un huésped. Un experto en la técnica apreciaría que las secuencias de ácido nucleico que codifican otras proteínas de interés pueden incorporarse en los vectores de terapia génica de AAV de la presente invención.

En otro aspecto de la presente invención, los constructos descritos en el presente documento pueden introducirse en una célula o tejido de interés usando metodología estándar conocida por los expertos en la técnica (por ejemplo, transfección). En la técnica se conocen en general varias técnicas de transfección (véase, por ejemplo, Graham et al, *Virology*, 52:456 (1973), Sambrook et al. *supra*, Davis et al, *supra*, and Chu et al, *Gene* 13: 197 (1981)). Los métodos de transfección particularmente adecuados incluyen la coprecipitación con fosfato de calcio (Graham et al., *Virology*, 52:456-467 (1973)), microinyección directa en células cultivadas (Capecchi, *Cell* 22:479-488 (1980)), electroporación (Shigekawa et al, *BioTechnol.*, 6:742-751 (1988)), transferencia de genes mediada por liposomas (Mannino et al., *BioTechnol.*, 6:682-690 (1988)), transducción mediada por lípidos (Feigner et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:7413-7417 (1987)), y administración de ácido nucleico usando microproyectiles de alta velocidad (Klein et al, *Nature* 327:70-73 (1987)).

En otro aspecto de la presente invención, se contemplan cultivos de células *ex vivo* o poblaciones que tienen células huésped adecuadas para el suministro de ASPA, constructo AAV- ASPA u otros restos funcionales o variaciones de los mismos. Dichos cultivos celulares pueden incluir microorganismos no alergénicos, células de levadura, células de insectos, células mesenquimales, células indiferenciadas, células de mamífero o células madre, que pueden ser, o han sido, utilizadas como receptores de una molécula de ADN heteróloga. Por tanto, como se indicó anteriormente, una célula hospedadora o célula productora se refiere a una célula que ha sido transfectada con una secuencia de ADN exógena y es capaz de expresar ASPA y/o administración a un paciente o sujeto.

Los constructos de terapia génica AAV-ASPA se pueden administrar a cualquier tejido adecuado para la expresión de proteínas o fragmentos de las mismas. Las partículas de terapia génica de AAV de la presente invención están en combinación con un vehículo farmacéutico adecuado. Las composiciones pueden administrarse solas o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizador, que puede administrarse en cualquier vehículo farmacéutico biocompatible estéril. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener otras sustancias activas, precursores, fármacos, antioxidantes, inmunosupresores u hormonas. Ejemplos de sustancias activas incluyen agentes antiinflamatorios, inmunosupresores u hormonas. El presente método incluye la administración o aplicación conjunta de una inmunoterapia complementaria, un tratamiento dietético o combinaciones de los mismos para aliviar los perfiles de efectos secundarios potenciales asociados con la presente invención. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden inyectarse usando una jeringa convencional, aunque se prevén otros métodos de administración tales como administración mejorada por convección.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichos excipientes o vehículos incluyen cualquier agente farmacéutico que no induzca por sí mismo una respuesta inmunitaria perjudicial para el individuo que recibe la composición y que pueda administrarse sin una toxicidad indebida. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, líquidos tales como agua, solución salina, glicerol, azúcares y etanol. También se pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, benzoatos y similares. Además, en tales vehículos pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias reguladoras del pH y similares. Una preparación farmacéutica de ejemplo puede ser un polvo liofilizado que puede contener cualquiera o todos los siguientes: histidina 1-50 mM, sacarosa 0.1% -2% y manitol 2-7%, en un intervalo de pH de 4.0 a 6.5. Una discusión detallada de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., 20th Edition, Easton, Pa. (2005)).

Los modos de administración incluyen aplicaciones orales, supositorios y transdérmicos. Las dosis terapéuticas de AAV-ASPA o porciones biológicamente activas de las mismas dependerán, entre otros factores, de la edad y el estado general del sujeto y de la gravedad de la enfermedad. Por tanto, una cantidad terapéuticamente efectiva en seres humanos caerá en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse basándose en el resultado de ensayos clínicos y la respuesta de pacientes individuales al tratamiento.

La presente divulgación también se refiere a un nuevo método de tratamiento para tratar trastornos cerebrales asociados con el estrés oxidativo. Como se expuso anteriormente, los inventores proponen aquí que el catabolismo de NAA por la enzima ASPA es un proceso de producción de energía que puede dar soporte a la síntesis de ATP a través del suministro de sustratos para la cascada de energía metabólica celular. El ciclo metabólico natural de NAA está estrechamente compartimentado, con síntesis restringida a neuronas y catabolismo por ASP A a oligodendrocitos. El tratamiento divulgado proporciona estrategias novedosas para introducir ASPA en células neurales, neuronas, astrocitos específicamente, donde no se encuentra de forma natural.

La ASPA se encuentra normalmente en oligodendrocitos, mientras que el NAA se sintetiza exclusivamente en neuronas. Las neuronas no tienen la capacidad de catabolizar NAA. El NAA constituye aproximadamente el 1% del peso seco del cerebro de los mamíferos y está presente en cantidades milimolares, estando la inmensa mayoría presente intraneuronalmente. Los inventores muestran que la expresión de ASPA en neuronas, a través de métodos

5 virales o no virales, tiene acceso directo a un suministro abundante de sustrato para la suplementación del metabolismo oxidativo en células afectadas por una amplia gama de patologías neuronales.

Se logra una reducción de los primeros signos de estrés oxidativo bajo la metodología reivindicada. La presente metodología muestra un tratamiento a largo plazo para condiciones que se atribuyen a deficiencias de aprendizaje y/o deterioro cognitivo progresivo.

10 La ACh se sintetiza a partir de colina y AcCoA por la colina acetiltransferasa (ChAT). Después de ser liberada por las neuronas presinápticas, la ACh se descompone rápidamente en colina y acetato, que son captados por la terminal presináptica. El acetato complementa la síntesis de ACh formando AcCoA. AcCoA está disponible para la síntesis de ACh o ATP a través del ciclo de TCA. Proporcionar a las neuronas colinérgicas los medios para catabolizar NAA endógena mediante transducción con AAV-ASPA apoya la síntesis de ACh y ATP.

15 Los presentes inventores han expresado ASPA en neuronas primarias en cultivo y han proporcionado resistencia a la privación de glucosa/oxígeno que puede cuantificarse en niveles aumentados de ATP (Figura 1). Privar a las neuronas de glucosa y oxígeno durante un breve período de tiempo replica las condiciones experimentadas por las neuronas in vivo durante la hipoxia-isquemia in vivo. Una agresión de esta naturaleza priva al cerebro de la glucosa y el oxígeno necesarios para generar energía para mantener los gradientes iónicos necesarios para la función

20 sináptica normal.

El aumento de la actividad celular ASPA para proporcionar niveles extrafisiológicos de ATP se traduce en una mayor capacidad funcional bajo estrés. Dado que el estrés oxidativo es un componente de prácticamente todas las afecciones neurodegenerativas y lesiones cerebrales conocidas, los expertos en la técnica pueden apreciar que los pacientes que padecen o están en riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas pueden beneficiarse de la invención actualmente contemplada.

25

Una aplicación de la presente invención es en pacientes con riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. Tales pacientes, por ejemplo, manifiestan un déficit oxidativo y daño asociado a lípidos y proteínas en áreas del cerebro asociadas con placas de β -amiloide y ovillos neurofibrilares. En la enfermedad de Parkinson, la aparente vulnerabilidad selectiva de las neuronas dopaminérgicas al estrés respiratorio se asocia con anomalías mitocondriales significativas en esta población neuronal discreta. Ambas condiciones neurodegenerativas son susceptibles de administración de genes dirigida con vectores virales, y ambas se beneficiarían del apoyo oxidativo proporcionado por la suplementación de intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) a través del catabolismo de NAA por ASPA. Como se indica en el presente documento, el ciclo de TCA es el conducto principal hacia la energía metabólica en el cerebro y utiliza glucosa para generar ATP. La síntesis de NAA está estrechamente acoplada al ciclo de TCA en las neuronas y la acetilación del aspartato se basa en AcCoA del ciclo de TCA (ver Figura 3). El aspartato acetilado, en forma de NAA, es luego transportado fuera de la neurona y hacia la sustancia blanca que produce oligodendrocitos. El catabolismo de NAA por ASPA en oligodendrocitos produce AcCoA para la síntesis de ácidos grasos, lo que permite que el ciclo de TCA en estas células continúe sin cesar. Por tanto, la síntesis y exportación de NAA requiere mucha energía para la neurona. El equilibrio energético mantenido por la síntesis y el catabolismo de NAA puede demostrarse fácilmente en cualquier tipo de célula mediante intervención genética (Figuras 1 y 3). Por tanto, la sobreexpresión de la enzima sintética de NAA que limita la tasa, Nat8L, da como resultado un aumento de NAA (Figura 3), una caída de AcCoA (Figura 3) y una caída correspondiente de ATP (Figura 3). Los déficits metabólicos resultantes de los niveles extrafisiológicos de síntesis de NAA se rescatan mediante la sobreexpresión de ASPA. Por tanto, la síntesis de NAA consume mucha energía, mientras que el catabolismo de NAA produce energía. Dado que el ciclo de TCA es un componente fundamental de todos los procesos neuronales, la tecnología propuesta es aplicable a todo el espectro neuropatológico, desde la lesión aguda hasta los fenotipos neurocognitivos complejos.

30

35

40

45

Ejemplos

Debe apreciarse que la invención no debe interpretarse como limitada a los ejemplos que se describen ahora.

50 *Integridad oxidativa mejorada en ratones 5xFAD tratados con AAV-ASPA*

El ratón 5xFAD es un modelo de AD heredado. Contiene 5 mutaciones en genes que se encuentran clínicamente y que dan como resultado la acumulación de fragmentos de β -amiloide en el cerebro. Este animal manifiesta placas positivas de amiloide B-42 en el cerebro y un déficit de aprendizaje asociado desde aproximadamente los 4 meses de edad en adelante. Este déficit de aprendizaje puede evaluarse mediante el uso de un aparato de laberinto que mide la memoria de trabajo espacial. Se inyectaron ratones 5xFAD con AAV-ASPA a las 6 semanas de edad, y se analizaron los cerebros para determinar la actividad de ASPA (es decir, disminución de NAA endógena) y marcadores de estrés oxidativo a los 4 meses de edad (Figura 4). La expresión de ASPA en neuronas de ratones

55

5xFAD resultó en una reducción significativa de NAA endógena. Cabe señalar que NAA es la segunda molécula más abundante en el cerebro, e incluso cuando es anormalmente baja, se encuentra en cantidades millimolares.

2) *Rescate del fenotipo cognitivo relacionado con la edad en ratones 5xFAD tratados con I-ASP*

5 En este ejemplo, las pruebas de memoria en animales comenzaron cuando tenían 5 meses de edad. Los animales se habituaron a un laberinto con 8 brazos que irradiaban desde una plataforma central. Los animales fueron entrenados para buscar recompensas de comida al final de cada brazo, y la recuperación exitosa de las recompensas de los 8 brazos constituye una prueba completa. Si un animal vuelve a visitar un brazo del que ya ha tomado alimento, se registra un error. A medida que envejecen los ratones 5xFAD, aumenta el número de estos errores, lo que refleja la degeneración de los circuitos de memoria asociados. Cuando se probaron a los 5, 7 y 9 meses de edad, los ratones 5xFAD tratados con AAV-ASPA mostraron reducciones muy significativas en el número de errores cometidos durante el período de prueba, lo que indica la recuperación a largo plazo de la memoria de trabajo (ver Figura 5).

3) *Reducción drástica de los niveles de placas de amiloide β 42 en las edades de ratones 5xFAD tratados con AAV-ASPA--*

15 Los ratones se mantienen hasta los 9 meses de edad y actualmente se están sometiendo a pruebas para este momento. Se han generado unos pocos animales de 9 meses y actualmente se están analizando los cerebros de estos animales para histopatología. Los cerebros 5xFAD AAV-ASPA que se han analizado hasta ahora parecen tener reducciones drásticas en los niveles de placas amiloides B42. Por lo tanto, el rescate observado de un déficit cognitivo importante (Figura 5) se correlaciona con reducciones en la patología similar a la AD.

20 Listado de secuencias

<110> UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY

<120> TERAPIA METABÓLICA PARA EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL CEREBRO A TRAVÉS DEL CATABOLISMO NEURONAL DIRECCIONADO DEL ÁCIDO N-ACETILASPÁRTICO

<130> 096738.00320

25 Listado de secuencias

<110> UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY

<120> TERAPIA METABÓLICA PARA EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL CEREBRO A TRAVÉS DEL CATABOLISMO NEURONAL DIRECCIONADO DEL ÁCIDO N-ACETILASPÁRTICO

<130> 096738.00320

30 <150> 61/653,087

<151> 2012-05-30

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

35 <211> 1435

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

40 <400>

ES 2 837 826 T3

ttgtaacaga aaattaaaat atactccact caaggaatt ctgtactttg ccctttgggt 60
 aaagtctcat ttacatttct aaacctttct taagaaaatc gaatttcctt tgatctctct 120
 tctgaattgc agaaatcaga taaaaactac ttggtgaaat gacttcttgt cacattgctg 180
 aagaacatat acaaaagggt gctatctttg gaggaacca tgggaatgag ctaaccggag 240
 tatttctggg taagcattgg ctagagaatg gcgctgagat tcagagaaca gggctggagg 300
 taaaaccatt tattactaac ccagagcag tgaagaagtg taccagatat attgactgtg 360
 acctgaatcg cttttttgac cttgaaaatc ttggcaaaaa aatgtcagaa gatttgccat 420
 atgaagtgag aagggctcaa gaaataaatc atttatttgg tccaaaagac agtgaagatt 480
 cctatgacat tttttttgac cttcacaaca ccacctctaa catgggggtgc actcttattc 540
 ttgaggattc caggaataac tttttaattc agatgtttca ttacattaag acttctctgg 600
 ctccactacc ctgctacggt tatctgattg agcatccttc cctcaaatat gcgaccactc 660
 gttccatagc caagtatcct gtgggtatag aagttgggtcc tcagcctcaa ggggttctga 720
 gagctgatat cttggatcaa atgagaaaaa tgattaaaca tgctcttgat tttatacatc 780
 atttcaatga aggaaaagaa tttcctcctt ggcgcattga ggtctataaa attatagaga 840
 aagttgatta cccccgggat gaaaatggag aaattgctgc tatcatccat cctaactctgc 900
 aggatcaaga ctggaaacca ctgcatcctg gggatcccat gtttttaact cttgatggga 960
 agacgatccc actggggcga gactgtaccg tgtaccccggt gtttgtgaat gaggccgcat 1020
 attacgaaa gaaagaagct tttgcaaaga caactaaact aacgctcaat gcaaaaagta 1080
 1 ttogctgctg ttacattag aaatcacttc cagcttacat cttacacggg gtcttacaaa 1140
 ttctgctagt ctgtaagctc ctttaagagta gggttgtgcc ttattcaact gcatacatag 1200
 ctctagcac agtgoccttat tcggtaggca tctaagcaaa tttcttaaat taattaatat 1260
 atctttaaag atatcatatt ttatgtatgt agcttattca aagaagtgtt tcctatttct 1320
 atatagttta ttatacatga tacttgggta gctcaacatt ctttaataaac agcctttgta 1380
 ttcagaatat aaaattgaaa tagatatata taaagttaa aaaaaaaaaa aaaaa 1435

<210> 2

<211> 313

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 2

ES 2 837 826 T3

Met Thr Ser Cys His Ile Ala Glu Glu His Ile Gln Lys Val Ala Ile
 1 5 10 15

Phe Gly Gly Thr His Gly Asn Glu Leu Thr Gly Val Phe Leu Val Lys
 20 25 30

His Trp Leu Glu Asn Gly Ala Glu Ile Gln Arg Thr Gly Leu Glu Val
 35 40 45

Lys Pro Phe Ile Thr Asn Pro Arg Ala Val Lys Lys Cys Thr Arg Tyr
 50 55 60

Ile Asp Cys Asp Leu Asn Arg Ile Phe Asp Leu Glu Asn Leu Gly Lys
 65 70 75 80

Lys Met Ser Glu Asp Leu Pro Tyr Glu Val Arg Arg Ala Gln Glu Ile
 85 90 95

Asn His Leu Phe Gly Pro Lys Asp Ser Glu Asp Ser Tyr Asp Ile Ile
 100 105 110

Phe Asp Leu His Asn Thr Thr Ser Asn Met Gly Cys Thr Leu Ile Leu
 115 120 125

Glu Asp Ser Arg Asn Asn Phe Leu Ile Gln Met Phe His Tyr Ile Lys
 130 135 140

Thr Ser Leu Ala Pro Leu Pro Cys Tyr Val Tyr Leu Ile Glu His Pro
 145 150 155 160

Ser Leu Lys Tyr Ala Thr Thr Arg Ser Ile Ala Lys Tyr Pro Val Gly
 165 170 175

ES 2 837 826 T3

Ile Glu Val Gly Pro Gln Pro Gln Gly Val Leu Arg Ala Asp Ile Leu
 180 185 190

Asp Gln Met Arg Lys Met Ile Lys His Ala Leu Asp Phe Ile His His
 195 200 205

Phe Asn Glu Gly Lys Glu Phe Pro Pro Cys Ala Ile Glu Val Tyr Lys
 210 215 220

Ile Ile Glu Lys Val Asp Tyr Pro Arg Asp Glu Asn Gly Glu Ile Ala
 225 230 235 240

Ala Ile Ile His Pro Asn Leu Gln Asp Gln Asp Trp Lys Pro Leu His
 245 250 255

Pro Gly Asp Pro Met Phe Leu Thr Leu Asp Gly Lys Thr Ile Pro Leu
 260 265 270

Gly Gly Asp Cys Thr Val Tyr Pro Val Phe Val Asn Glu Ala Ala Tyr
 275 280 285

Tyr Glu Lys Lys Glu Ala Phe Ala Lys Thr Thr Lys Leu Thr Leu Asn
 290 295 300

Ala Lys Ser Ile Arg Cys Cys Leu His
 305 310

REIVINDICACIONES

1. Un constructo para administración de genes que comprende un vector y un ácido nucleico que codifica aspartoacilasa (ASPA) para su uso en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo asociado con estrés oxidativo, en donde el trastorno es la enfermedad de Alzheimer.
- 5 2. Un constructo para administración de genes que comprende un vector y un ácido nucleico que codifica aspartoacilasa (ASPA) para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad de Alzheimer es una enfermedad hereditaria.
- 10 3. Un constructo para administración de genes que comprende un vector y un ácido nucleico que codifica aspartoacilasa (ASPA) para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico comprende una secuencia identificada como SEQ ID No: 1.
4. Un constructo para administración de genes que comprende un vector y un ácido nucleico que codifica aspartoacilasa (ASPA) para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vector es un vector viral o un vector no viral.
- 15 5. Un constructo para administración de genes que comprende un vector y un ácido nucleico que codifica aspartoacilasa (ASPA) para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el vector viral se selecciona del grupo que consiste en un vector AAV1, un vector AAV2, un vector AAV3, un vector AAV4, un vector AAV5, un vector AAV6, un vector AAV7, un vector AAV8, un vector AAV9, un vector AAV 10, un vector AAVI 1, un vector retroviral, un vector alfaviral; un vector viral de vaccinia; un vector adenoviral y un vector viral del herpes simple.
- 20 6. Un constructo para administración de genes que comprende un vector y un ácido nucleico que codifica aspartoacilasa (ASPA) para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el vector no viral es un lípido, una polilisina, un poliamino polímero sintético o un plásmido.
7. Un constructo para administración de genes que comprende un vector y un ácido nucleico que codifica aspartoacilasa (ASPA) para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia identificada como SEQ ID No: 2.

25

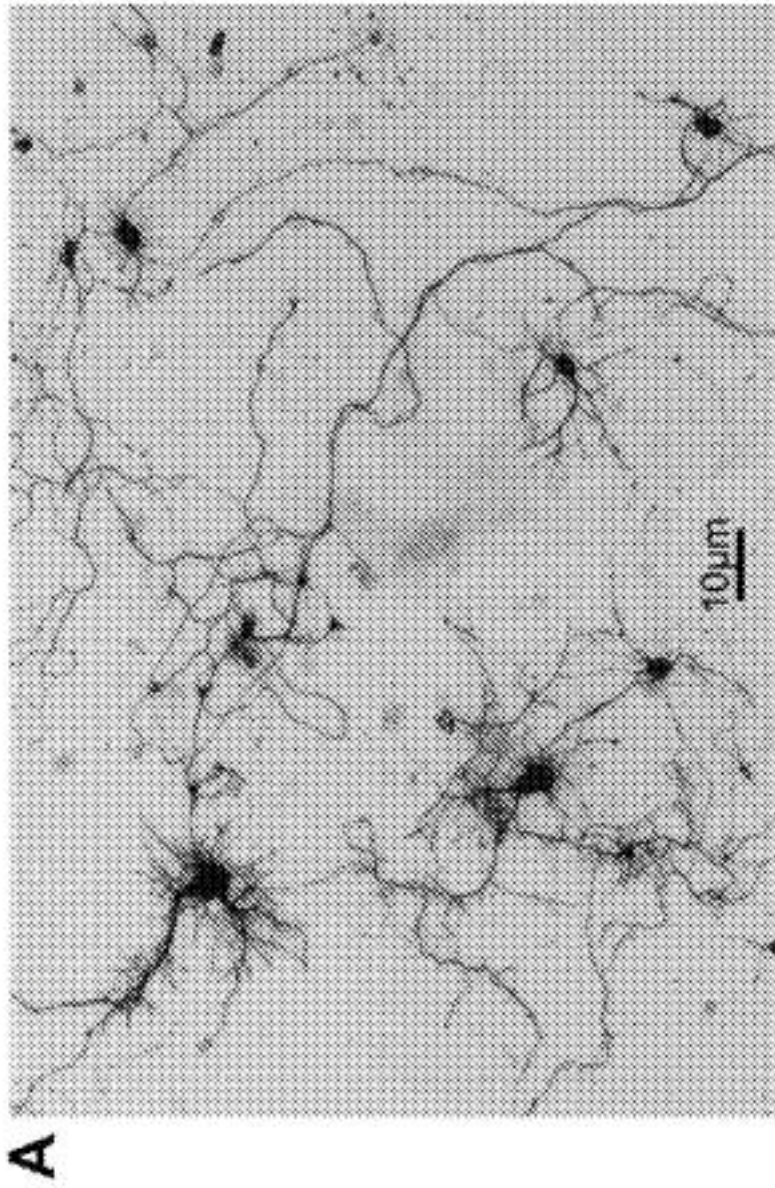


FIG. 1-A

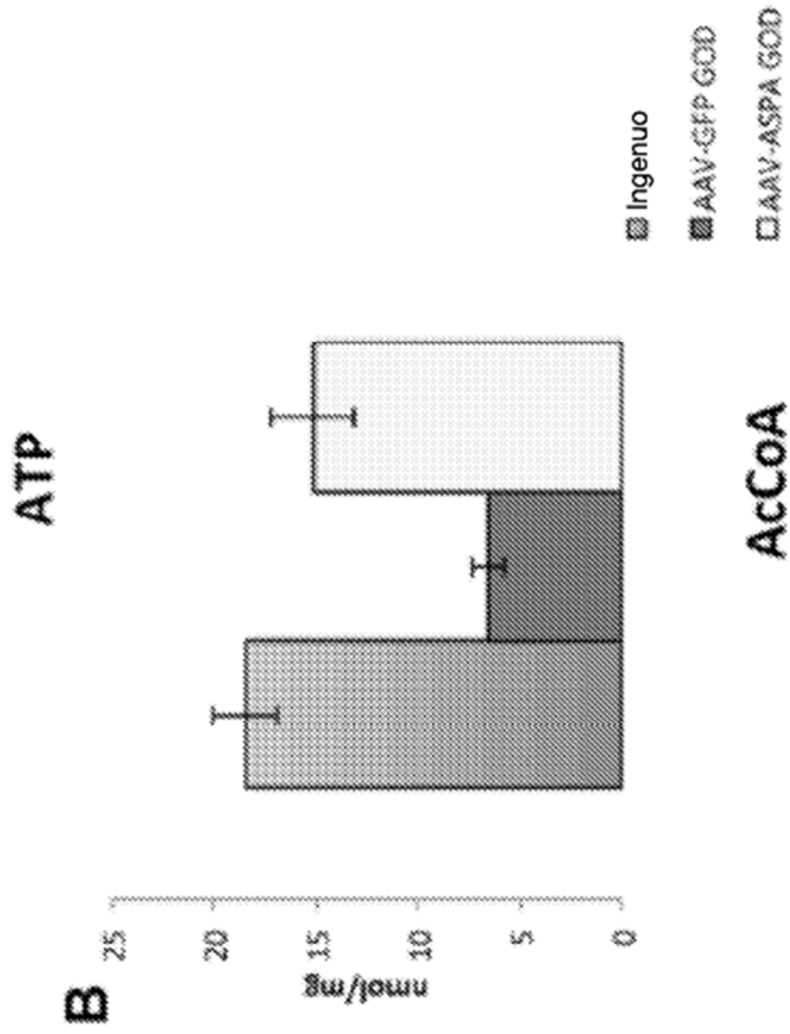


FIG. 1-B

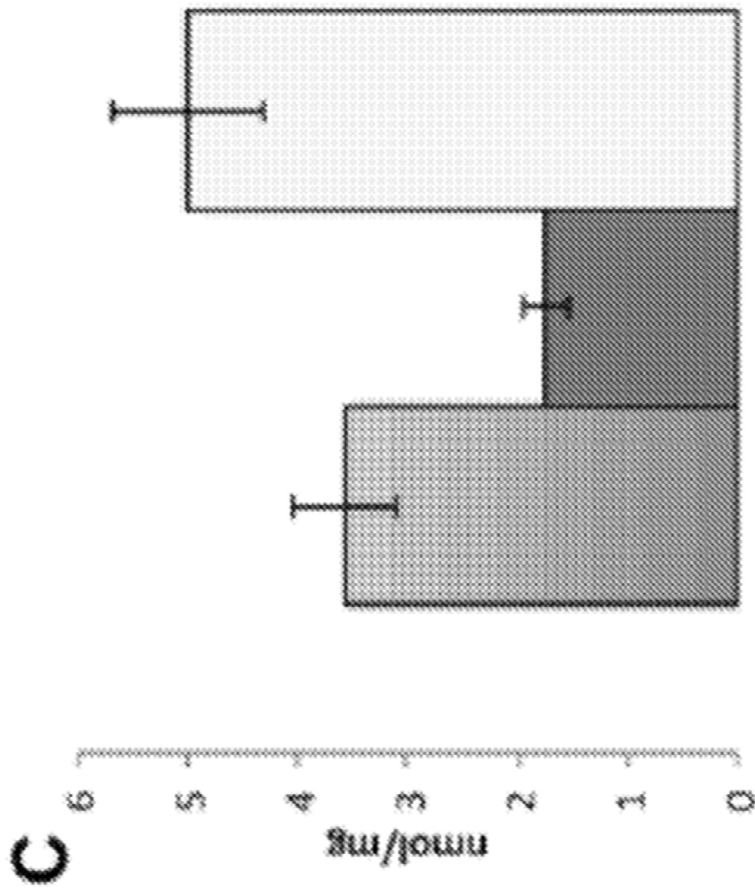


FIG. 1-C

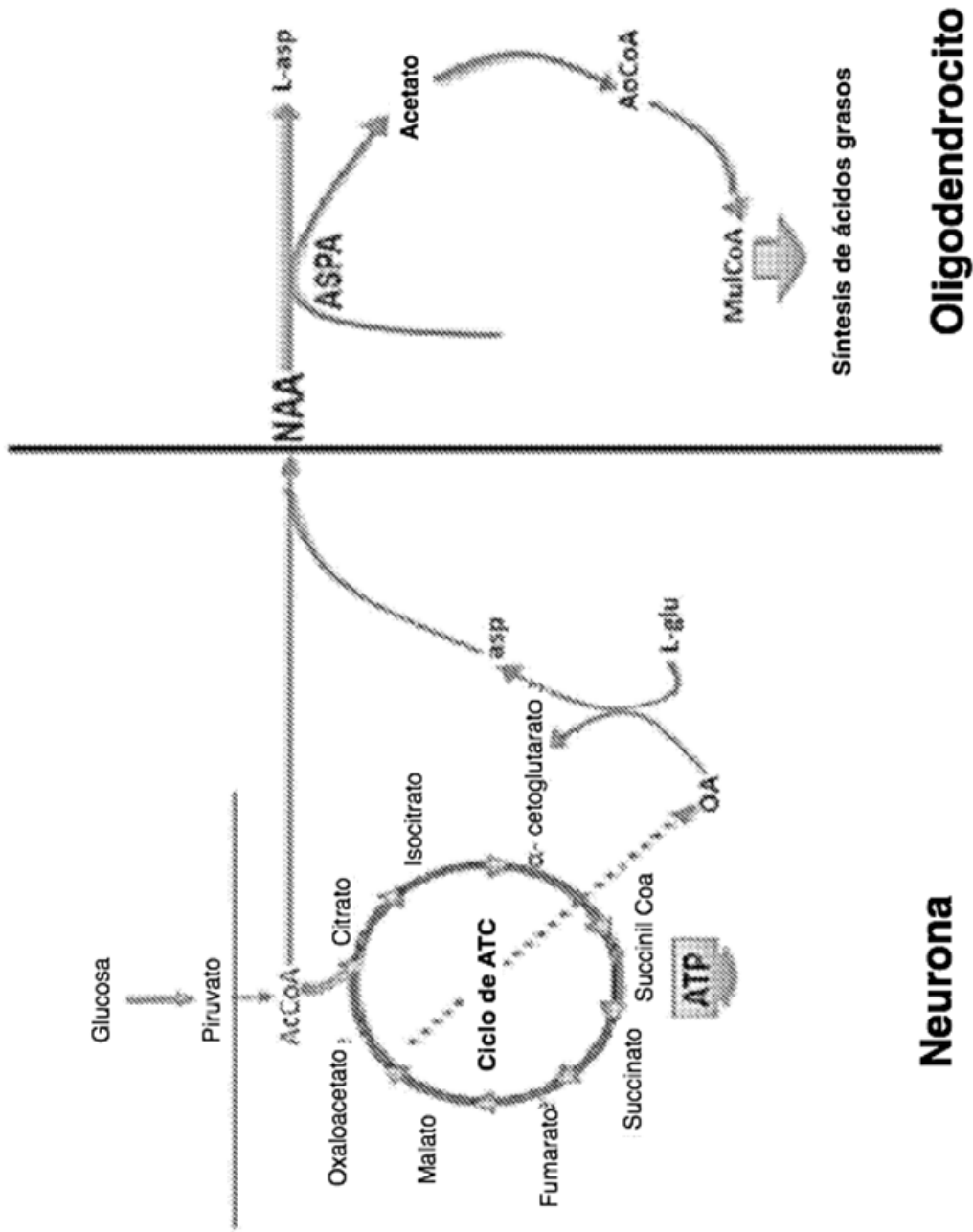


FIG. 2

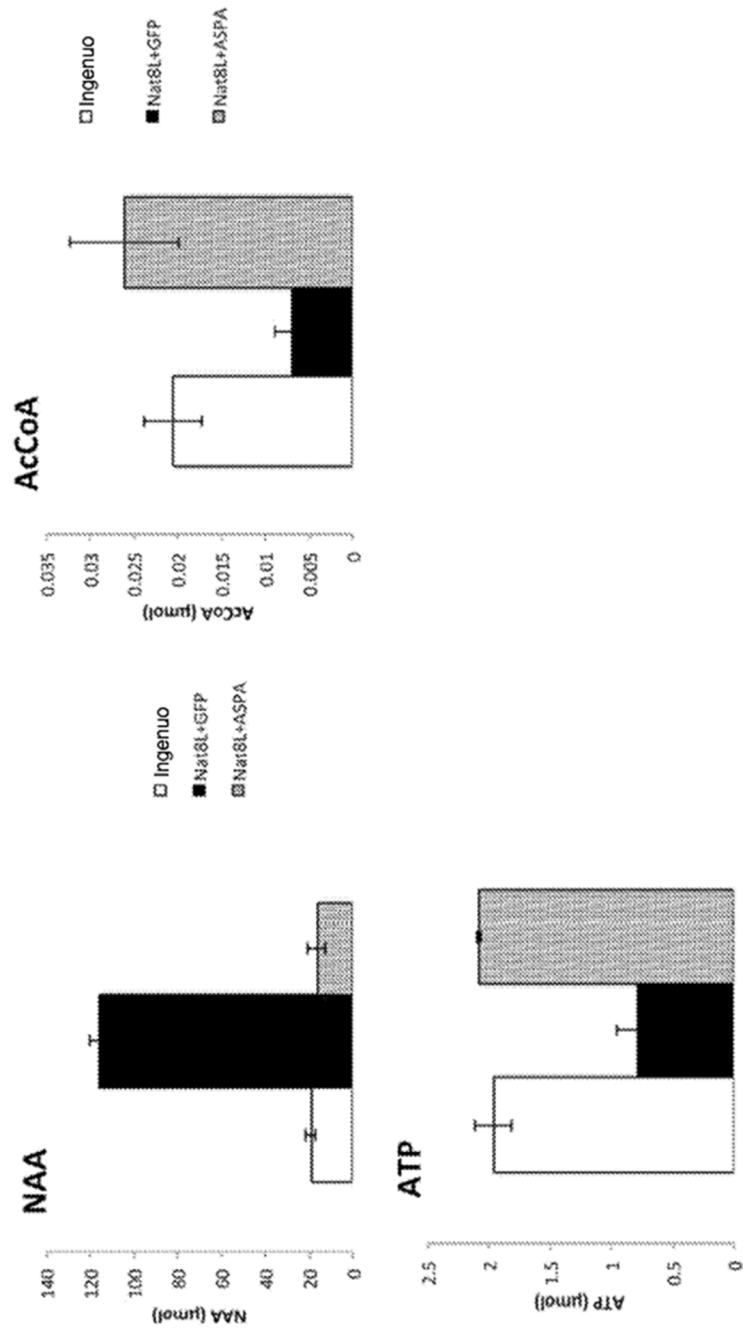


FIG. 3

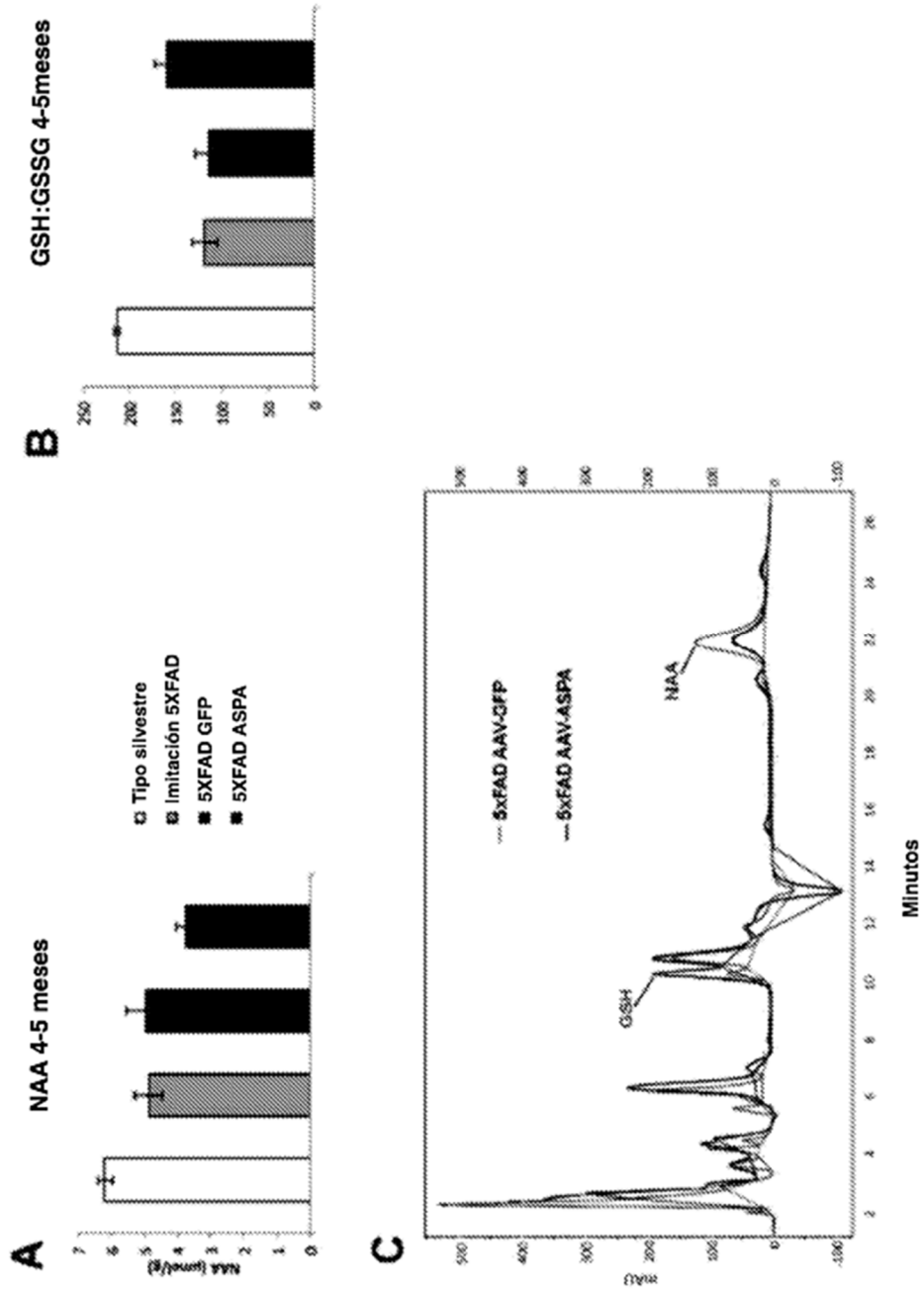


FIG. 4

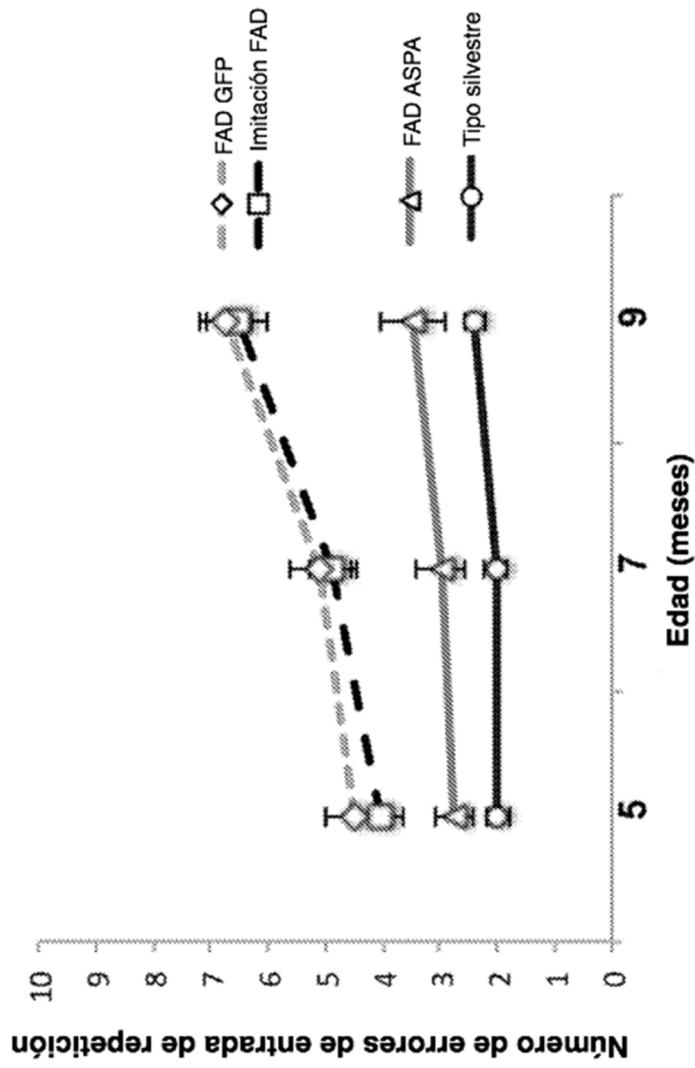


FIG. 5

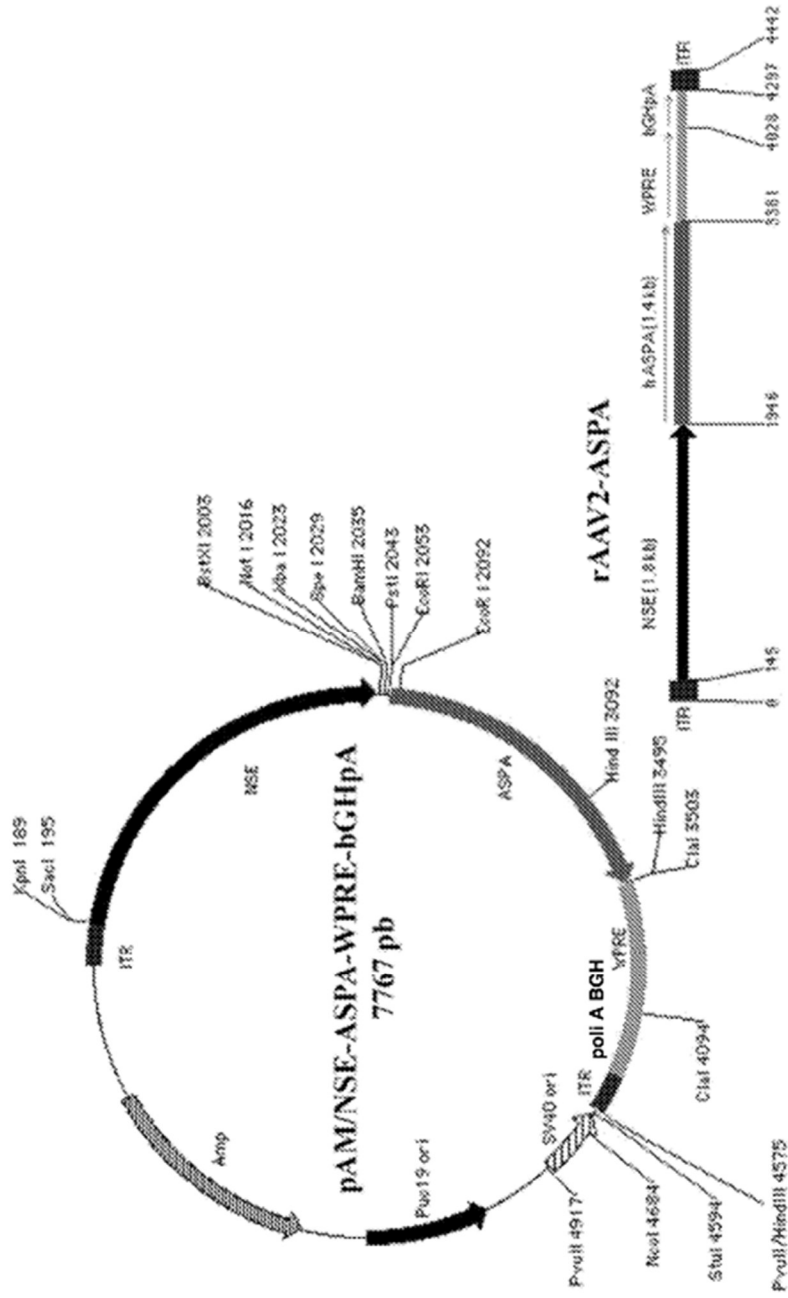


FIG. 6

Casete de transcripción: nse-ASPA-wpre-bGHpA

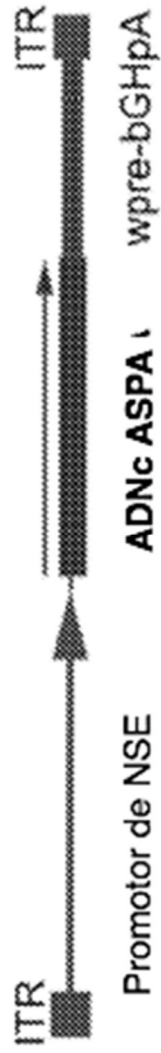


FIG. 7