

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 901 766**

51 Int. Cl.:

A61K 38/47 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2016** **PCT/US2016/032392**
87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2016** **WO16187017**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2016** **E 16797013 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.10.2021** **EP 3294323**

54 Título: **Virus adenoasociado para el suministro terapéutico al sistema nervioso central**

30 Prioridad:

15.05.2015 US 201562162174 P
06.11.2015 US 201562252055 P
01.03.2016 US 201662301980 P
03.05.2016 US 201662331156 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2022

73 Titular/es:

REGENXBIO INC. (50.0%)
9804 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850, US y
REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA
(50.0%)

72 Inventor/es:

MCIVOR, R. SCOTT;
BELUR, LALITHA R. y
KOZARSKY, KAREN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 901 766 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

Virus adenoasociado para el suministro terapéutico al sistema nervioso central

5 Antecedentes

Las mucopolisacaridosis (MPS) son un grupo de 11 enfermedades de almacenamiento provocadas por alteraciones en el catabolismo de los glucosaminoglicanos (GAG), que conducen a su acumulación en lisosomas (Muenzer, 2004; Muñoz-Rojas y otros, 2008). Las manifestaciones de gravedad variable incluyen organomegalia, displasias esqueléticas, obstrucción cardíaca y pulmonar y deterioro neurológico. Para la MPS I, la deficiencia de iduronidasa (IDUA), la gravedad varía de leve (síndrome de Scheie) a moderada (Hurler-Scheie) a grave (síndrome de Hurler), y esta última da como resultado deficiencia neurológica y muerte a los 15 años (Muenzer, 2004; Muñoz-Rojas y otros, 2008). Las terapias para las MPS han sido en su mayor parte paliativas. Sin embargo, existen algunas de las enfermedades MPS, lo que incluye el síndrome de Hurler, para las que el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (HSCT) ha mostrado eficacia (Krivit, 2004; Orchard y otros, 2007; Peters y otros, 2003). Adicionalmente, para cada vez más enfermedades MPS, se dispone ahora de la terapia de reemplazo enzimático (ERT) (Brady, 2006). En general, el HSCT y la ERT dan como resultado el aclaramiento de los materiales de almacenamiento y la mejora de las condiciones periféricas, aunque persisten algunos problemas después del tratamiento (esqueléticos, cardíacos, opacidad corneal). El principal desafío en estas terapias celulares y enzimáticas es la eficacia para abordar las manifestaciones neurológicas, ya que la enzima administrada periféricamente no penetra la barrera hematoencefálica y se ha descubierto que el HSCT es beneficioso para algunas MPS, pero no para todas.

La MPS I ha sido una de las enfermedades MPS más ampliamente estudiadas para el desarrollo de terapias celulares y moleculares. La eficacia del HSCT alogénico es probablemente el resultado de la corrección cruzada metabólica, por la cual la enzima faltante se libera de las células derivadas del donante y posteriormente es captada por las células huésped y transportada a los lisosomas, donde la enzima contribuye al metabolismo lisosómico (Fratantoni y otros, 1968). Posteriormente se observa el aclaramiento de los materiales de almacenamiento GAG en órganos periféricos tales como el hígado y el bazo, existe alivio de la obstrucción cardiopulmonar y mejoría en la opacidad corneal (Orchard y otros, 2007). Es de particular importancia el efecto del trasplante alogénico de células madre sobre la aparición de manifestaciones neurológicas en las enfermedades MPS. En este sentido, existe evidencia en varias enfermedades MPS de que los individuos injertados con células madre alogénicas afrontan un mejor resultado en comparación con los pacientes no trasplantados (Bjoraker y otros, 2006; Krivit, 2004; Orchard y otros, 2007; Peters y otros, 2003). Una hipótesis central que explica el beneficio neurológico del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas es la penetración de las células hematopoyéticas derivadas del donante (muy probablemente microglía) (Hess y otros, 2004; Unger y otros, 1993) en el sistema nervioso central, donde la enzima faltante es expresada por las células injertadas, desde ese momento la enzima se difunde hacia los tejidos del CNS y participa en el aclaramiento de los materiales de almacenamiento. Por tanto, el nivel de enzima proporcionado a los tejidos del CNS se limita a la cantidad expresada y liberada de las células derivadas del donante que se injertan en el cerebro. Si bien dicho injerto es de gran beneficio para la MPS I, los receptores, no obstante, continúan mostrando un coeficiente intelectual por debajo del normal y una capacidad neurocognitiva deteriorada (Ziegler y Shapiro, 2007).

El fenómeno de la corrección cruzada metabólica también explica la eficacia de la ERT para varias enfermedades de almacenamiento lisosómico (Brady, 2006), más marcadamente la MPS I. Sin embargo, debido al requisito de penetración de la barrera hematoencefálica (BBB) por la enzima faltante en la enfermedad de almacenamiento lisosómico (LSD) en particular para alcanzar eficazmente el CNS, no se ha observado eficacia de la terapia enzimática para las manifestaciones neurológicas de la enfermedad de almacenamiento lisosómico (LSD) (Brady, 2006). Las enzimas son casi siempre demasiado grandes y, en general, demasiado cargadas para cruzar eficazmente la BBB. Esto ha motivado investigaciones sobre la administración intratecal invasiva de enzimas (Dickson y otros, 2007), cuya eficacia se ha demostrado en un modelo canino de MPS I (Kakkis y otros, 2004) y para las que se están iniciando ensayos clínicos en humanos para la MPS I (Pastores, 2008; Muñoz-Rojas y otros, 2008). Las desventajas claves de la terapia enzimática incluyen su elevado coste (> \$ 200 000 por año) y el requisito de infusiones repetidas de proteína recombinante. Los ensayos clínicos actuales de administración intratecal de IDUA están diseñados para inyectar la enzima solo una vez cada tres meses, por lo que la eficacia de este régimen de dosificación permanece incierta. El documento WO2014/186579 también describe la idea de usar el AAV9 como vector para tratar diferentes tipos de enfermedades de almacenamiento lisosómico. Sin embargo, el documento WO 2014/186579 no menciona la neurocognición en el contexto de la terapia génica.

60 Resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

Los vectores de AAV empleados en los métodos de la invención son útiles para suministrar genes al CNS. En una modalidad, la invención proporciona el suministro intranasal al CNS de proteínas terapéuticas por medio de AAV, por ejemplo, para prevenir, inhibir o tratar la disfunción neurocognitiva o la enfermedad neurológica. Como se describe

en la presente descripción, el suministro intranasal del vector condujo a la transducción del prosencéfalo (bulbo olfatorio) y la expresión de la proteína terapéutica. La proteína se difundió a todas las áreas del cerebro. Por tanto, el uso de vectores de AAV por suministro intranasal para expresar, por ejemplo, una proteína secretada, permite el tratamiento de muchos trastornos neurológicos diferentes, por ejemplo, MPS I, MPS II, MPS III, otras enfermedades metabólicas, lo que incluye la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, y similares. Por ejemplo, el análisis de extractos de todas las partes microdisecionadas del cerebro muestra una distribución generalizada en todo el cerebro de la alfa-L-iduronidasa suministrada por el rAAV.

En una modalidad, el rAAV se suministra a un mamífero por vía intratecal (IT), endovascular (IV), cerebroventricular (ICV) o intranasal (IN) para prevenir, inhibir o tratar la disfunción neurocognitiva o la enfermedad neurológica. En una modalidad, la administración intranasal da como resultado una administración directa no invasiva al CNS con corrección cruzada metabólica. En una modalidad, el mamífero se somete a inmunosupresión. En una modalidad, el mamífero se somete a la inducción de tolerancia.

En un aspecto de la descripción, la enfermedad que se va a prevenir, inhibir o tratar con un gen en particular incluye, MPS I (IDUA), MPS II (IDS), MPS IIIA (Heparán^o-N-sulfatasa; sulfaminidasa), MPS IIIB (alfa-N-acetilglucosaminidasa), MPS IIIC (Acetil-CoA:alfa-N-acetil-glucosaminida acetiltransferasa), MPS IIID (N-acetilglucosamina 6-sulfatasa), MPS VII (beta-glucoronidasa), Gaucher (betaglicosidasa ácida), alfamanosidosis (alfamanosidasa), betamanosidosis (betamanosidasa), alfafucosidosis (alfafucosidasa), sialidosis (alfasialidasa), galactosialidosis (catepsina A), aspartilglucosaminuria (aspartilglucosaminidasa), gangliosidosis GM1 (betagalactosidasa), Tay-Sachs (subunidad alfa de betahexosaminidasa), Sandhoff (subunidad beta de betahexosaminidasa), gangliosidosis GM2/variante AB (proteína activadora de GM2), Krabbe (galactocerebrosidasa), leucodistrofia metacromática (arilsulfatasa A), y otros trastornos neurológicos, lo que incluye la enfermedad de Alzheimer (expresión de un anticuerpo, tal como un anticuerpo contra el beta-amiloide, o una enzima que ataca las placas y las fibrillas asociadas con el Alzheimer), o las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (expresión de proteínas neuroprotectoras, lo que incluye GDNF o neurturina).

Por tanto, se describen métodos para prevenir, inhibir y/o tratar, por ejemplo, uno o más síntomas asociados con una enfermedad del sistema nervioso central (CNS) en un mamífero que lo necesita. Los métodos implican suministrar al CNS de un mamífero que necesita tratamiento una composición que comprende una cantidad eficaz de un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un marco abierto de lectura que codifica un producto génico, por ejemplo, un producto génico terapéutico. Los productos génicos objetivo que pueden ser codificados por un vector de rAAV incluyen alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparán sulfato sulfatasa, N-acetil-alfa-D-glucosaminidasa, betahexosaminidasa, alfa-galactosidasa, betagalactosidasa, betaglicuronidasa o glucocerebrosidasa, así como también los descritos anteriormente. Las enfermedades que pueden prevenirse, inhibirse o tratarse mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción incluyen, trastorno de mucopolisacaridosis tipo I, trastorno de mucopolisacaridosis tipo II o trastorno de mucopolisacaridosis tipo VII, así como también los trastornos enumerados anteriormente. El vector de AAV puede administrarse de diversas formas para asegurar que se suministra al CNS/cerebro y que el transgén se transduce con éxito en el CNS/cerebro del sujeto. Las vías de suministro al CNS/cerebro incluyen administración intratecal, administración intracraneal, por ejemplo, administración intracerebroventricular o administración cerebroventricular lateral, administración intranasal, administración endovascular y administración intraparenquimatosa.

En un aspecto de la descripción, los métodos implican suministrar al CNS de un mamífero adulto que necesita tratamiento una composición que comprende una cantidad eficaz de un vector de rAAV serotipo 9 (rAAV9) que comprende un marco abierto de lectura que codifica un gen. En un aspecto de la descripción, los métodos implican suministrar al CNS de un mamífero adulto que necesita tratamiento una composición que comprende una cantidad eficaz de un vector de rAAV9 que comprende un marco abierto de lectura que codifica IDUA. Estos métodos se basan, en parte, en el descubrimiento de que un vector de AAV9 puede transducir eficientemente el transgén terapéutico en el cerebro/CNS de sujetos adultos, lo que restaura los niveles de enzima a los niveles de tipo silvestre (ver la Figura 15, *infra*). Los resultados logrados mediante el uso de AAV9 son sorprendentes en vista de trabajos previos que demostraron que el suministro intravascular de AAV9 en ratones adultos no logra un direccionamiento neuronal directo generalizado (ver Foust y otros, 2009), así como también datos adicionales que muestran que la inyección directa de AAV8-IDUA en el CNS de ratones adultos con deficiencia de IDUA dio como resultado una expresión deficiente del transgén (Figura 18). Los ejemplos descritos en la presente descripción usan un modelo preclínico para el tratamiento de la MPS1, un trastorno metabólico hereditario provocado por la deficiencia de la enzima lisosómica alfa-L-iduronidasa (IDUA). Los ejemplos demuestran que la aplicación directa de AAV9-IDUA en el CNS de ratones adultos inmunocompetentes con deficiencia de IDUA dio como resultado una expresión y actividad de la enzima IDUA que es igual o superior a la expresión y actividad de la enzima IDUA en ratones adultos de tipo silvestre (ver la Figura 15, *infra*).

Los ejemplos también demuestran que la terapia combinada para inducir inmunosupresión o inmunotolerancia, o el tratamiento de animales inmunodeficientes, puede lograr niveles aún más altos de expresión y actividad de la enzima IDUA. Los pacientes con genotipos que promueven una respuesta inmunitaria que neutraliza la actividad enzimática (ver, por ejemplo, Barbier y otros, 2013) se tratan con un inmunosupresor además del vector de rAAV que comprende un marco abierto de lectura que codifica un producto génico, tal como IDUA.

Los ratones IDUA^{-/-} neonatales son inmunológicamente vírgenes. La administración de AAV8-IDUA a ratones IDUA^{-/-} neonatales dio como resultado la expresión de IDUA (Wolf y otros, 2011), lo que indujo la tolerancia de los animales a IDUA. Como se describe en la presente descripción, se demostró la aplicabilidad de la transferencia génica mediada por AAV a ratones adultos (inmunocompetentes) mediante la infusión directa de AAV al sistema nervioso central mediante el uso de diferentes vías de administración. Por ejemplo, el AAV9-IDUA se administró mediante inyección directa en los ventrículos laterales de ratones adultos con deficiencia de IDUA que eran inmunocompetentes, inmunodeficientes (NODSCID-IDUA^{-/-}), inmunosuprimidos con ciclofosfamida (CP) o con inducción de inmunotolerancia mediante la inyección semanal de proteína iduronidasa humana (Aldurazyme) a partir del nacimiento. A los animales inmunodeprimidos con CP también se les administró AAV9-IDUA mediante infusión intranasal, mediante inyección intratecal y mediante infusión endovascular con y sin manitol para alterar la barrera hematoencefálica. Los animales se sacrificaron 8 semanas después de la administración del vector, y los cerebros se cosecharon y microdisecaron para la evaluación de la actividad enzimática de IDUA, glucosaminoglicanos tisulares y secuencias del vector de IDUA en comparación con ratones de control normales y afectados. Los resultados de estos estudios muestran que pueden emplearse numerosas vías para la administración del vector de AAV directamente al CNS, por ejemplo, para lograr niveles más altos de suministro de proteínas y/o actividad enzimática en el CNS. Además, aunque el cerebro es un sitio inmunoprivilegiado, la administración de un inmunosupresor o la inducción de inmunotolerancia pueden aumentar la actividad encontrada en el cerebro después de la administración del AAV. Los niveles más altos de expresión por administración y/o las vías de administración menos invasivas son clínicamente más agradables para los pacientes.

Por tanto, la invención incluye el uso de vectores de AAV recombinantes (rAAV) que codifican un producto génico con efectos terapéuticos cuando se expresan en el CNS de un mamífero. El mamífero es un mamífero inmunocompetente con una enfermedad o trastorno del CNS (una enfermedad neurológica). Un mamífero "inmunocompetente", como se usa en la presente descripción, es un mamífero de una edad en la que se provocan respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales después de la exposición a un estímulo antigénico, mediante la regulación positiva de las funciones Th1 o la producción de IFN- γ en respuesta a estímulos policlonales, por el contrario a un recién nacido que tiene inmunidad innata e inmunidad derivada de la madre, por ejemplo, durante la gestación o a través de la lactancia. Un mamífero adulto que no tiene una enfermedad de inmunodeficiencia es un ejemplo de un mamífero inmunocompetente. Por ejemplo, un ser humano inmunocompetente tiene típicamente al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses de edad, e incluye humanos adultos sin una enfermedad de inmunodeficiencia. En una modalidad, el AAV se administra por vía intratecal. En una modalidad, el AAV se administra por vía intracraneal (por ejemplo, por vía intracerebroventricular). En una modalidad, el AAV se administra por vía intranasal, con o sin un potenciador de la penetración. En una modalidad, el AAV se administra por vía endovascular, por ejemplo, la administración por la arteria carótida, con o sin un potenciador de la penetración. En una modalidad, el mamífero al que se le administra el AAV es inmunodeficiente o se somete a inmunosupresión o inducción de inmunotolerancia, por ejemplo, para inducir niveles más altos de expresión de proteína terapéutica con respecto a un mamífero correspondiente al que se le administra el AAV pero que no se somete a inmunosupresión o inducción de inmunotolerancia. En una modalidad, se administra un agente inmunosupresor para inducir la inmunosupresión. En una modalidad, el mamífero al que se administra el AAV no se somete a inmunosupresión o inducción de inmunotolerancia (por ejemplo, la administración del AAV solo proporciona el efecto terapéutico).

En una modalidad, la invención proporciona un método para aumentar la proteína secretada en el sistema nervioso central de un mamífero que tiene una enfermedad neurológica, que puede incluir una disfunción neurocognitiva. El método incluye administrar por vía intranasal al mamífero una composición que comprende una cantidad eficaz de un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un marco abierto de lectura que codifica la proteína secretada, cuya expresión en el mamífero disminuye la neuropatología y/o potencia la neurocognición en todo el cerebro con respecto a un mamífero con la enfermedad o disfunción pero al que no se le ha administrado el rAAV. En una modalidad, la proteína codificada comprende una proteína neuroprotectora, por ejemplo, GDNF o neurturina. En una modalidad, la proteína codificada comprende un anticuerpo, por ejemplo, uno que se une a beta-amiloide. En una modalidad, la proteína es una enzima que escinde la placa o las fibrillas asociadas con la enfermedad de Alzheimer. En una modalidad, el mamífero no se trata con un inmunosupresor. En otra modalidad, por ejemplo, en sujetos que pueden generar una respuesta inmunitaria que neutraliza la actividad de la proteína terapéutica, el mamífero se trata con un inmunosupresor, por ejemplo, un glucocorticoide, agentes citostáticos, lo que incluye un agente alquilante, un antimetabolito, un antibiótico citotóxico, un anticuerpo o un agente activo sobre la inmunofilina, tal como una mostaza nitrogenada, nitrosourea, compuesto de platino, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, fluorouracilo, dactinomicina, una antraciclina, mitomicina C, bleomicina, mitramicina, anticuerpos dirigidos contra CD3 o el receptor de IL-2 (CD25-), anticuerpos anti-IL-2, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, IFN- β , IFN- γ , un opioide, o un agente de unión al TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa). En una modalidad, el rAAV y el inmunosupresor se administran conjuntamente o el inmunosupresor se administra después del rAAV. En una modalidad, el inmunosupresor se administra por vía intratecal. En una modalidad, el inmunosupresor se administra por vía intracerebroventricular. En un aspecto de la descripción, el vector de rAAV es un vector rAAV1, rAAV3, rAAV4, rAAV5, rAA rh10 o rAAV9. En una modalidad, antes de la administración de la composición, se induce inmunotolerancia al mamífero.

En una modalidad, la invención proporciona un método para prevenir, inhibir o tratar una enfermedad neurológica, que puede incluir disfunción neurocognitiva en un mamífero. El método incluye administrar por vía intranasal al mamífero una composición que comprende una cantidad eficaz de un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un marco abierto de lectura que codifica una proteína, cuya expresión en el mamífero previene, inhibe o trata la neuropatología y/o disfunción neurocognitiva. En una modalidad, la proteína codificada comprende una proteína neuroprotectora, por ejemplo, GDNF o neurturina. En una modalidad, la proteína codificada comprende un anticuerpo, por ejemplo, uno que se une a beta-amiloide. En una modalidad, la proteína es una enzima que escinde la placa o las fibrillas asociadas con la enfermedad de Alzheimer. En una modalidad, el mamífero no se trata con un inmunosupresor. En otra modalidad, por ejemplo, en sujetos que pueden generar una respuesta inmunitaria que neutraliza la actividad de la proteína terapéutica, el mamífero se trata con un inmunosupresor, por ejemplo, un glucocorticoide, agentes citostáticos, lo que incluye un agente alquilante, un antimetabolito, un antibiótico citotóxico, un anticuerpo o un agente activo sobre la inmunofilina, tal como una mostaza nitrogenada, nitrosourea, compuesto de platino, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, fluorouracilo, dactinomicina, una antraciclina, mitomicina C, bleomicina, mitramicina, anticuerpos dirigidos contra CD3 o el receptor de IL-2 (CD25-), anticuerpos anti-IL-2, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, IFN- β , IFN- γ , un opioide, o un agente de unión al TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa). En una modalidad, el rAAV y el inmunosupresor se administran conjuntamente o el inmunosupresor se administra después del rAAV. En una modalidad, el inmunosupresor se administra por vía intratecal. En una modalidad, el inmunosupresor se administra por vía intracerebroventricular. En un aspecto de la descripción, el vector de rAAV es un vector rAAV1, rAAV3, rAAV4, rAAV5, rAAVrh10 o rAAV9. En una modalidad, antes de la administración de la composición, se induce inmunotolerancia al mamífero. En un aspecto de la descripción, el mamífero tiene la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

En un aspecto de la descripción, la invención proporciona un método para proporcionar la corrección cruzada de una proteína secretada en el sistema nervioso central en un mamífero que tiene una enfermedad neurológica, que puede incluir disfunción neurocognitiva. El método incluye: administrar por vía intranasal, intratecal, intracerebrovascular o intravenosa al mamífero una cantidad eficaz de una composición que comprende una cantidad eficaz de un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un marco abierto de lectura que codifica la proteína secretada, cuya expresión en el mamífero proporciona corrección cruzada. En un aspecto de la descripción, la proteína codificada comprende una proteína neuroprotectora, por ejemplo, GDNF o neurturina. En un aspecto de la descripción, la proteína codificada comprende un anticuerpo, por ejemplo, uno que se une a beta-amiloide. En un aspecto de la descripción, la proteína es una enzima que escinde la placa o las fibrillas asociadas con la enfermedad de Alzheimer. En un aspecto de la descripción, el mamífero no se trata con un inmunosupresor. En un aspecto de la descripción, por ejemplo, en sujetos que pueden generar una respuesta inmunitaria que neutraliza la actividad de la proteína terapéutica, el mamífero se trata con un inmunosupresor, por ejemplo, un glucocorticoide, agentes citostáticos, lo que incluye un agente alquilante, un antimetabolito, un antibiótico citotóxico, un anticuerpo o un agente activo sobre la inmunofilina, tal como una mostaza nitrogenada, nitrosourea, compuesto de platino, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, fluorouracilo, dactinomicina, una antraciclina, mitomicina C, bleomicina, mitramicina, anticuerpos dirigidos contra CD3 o el receptor de IL-2 (CD25-), anticuerpos anti-IL-2, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, IFN- β , IFN- γ , un opioide, o un agente de unión al TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa). En un aspecto de la descripción, el rAAV y el inmunosupresor se administran conjuntamente o el inmunosupresor se administra después del rAAV. En un aspecto de la descripción, el inmunosupresor se administra por vía intratecal. En un aspecto de la descripción, el inmunosupresor se administra por vía intracerebroventricular. En un aspecto de la descripción, el vector de rAAV es un vector rAAV1, rAAV3, rAAV4, rAAV5, rAAVrh10 o rAAV9. En un aspecto de la descripción, antes de la administración de la composición, se induce inmunotolerancia al mamífero.

La invención proporciona un método para prevenir, inhibir o tratar la disfunción neurocognitiva asociada con una enfermedad o trastorno del sistema nervioso central en un mamífero que lo necesita. El método incluye administrar al mamífero por vía intratecal, por ejemplo, en la región lumbar, o intracerebroventricular, por ejemplo, en el ventrículo lateral, una composición que comprende una cantidad eficaz de un vector de rAAV que comprende un marco abierto de lectura que codifica un producto génico, cuya expresión en el sistema nervioso central del mamífero previene, inhibe o trata la disfunción neurocognitiva. En un aspecto de la descripción, el producto génico es una enzima de almacenamiento lisosómico. En un aspecto de la descripción, el mamífero es un adulto inmunocompetente. En un aspecto de la descripción, el vector de rAAV es un vector AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh10 o AAV9. En un aspecto de la descripción, el mamífero es un ser humano. En un aspecto de la descripción, se administran múltiples dosis. En un aspecto de la descripción, la composición se administra semanalmente, mensualmente o con dos o más meses de diferencia.

En un aspecto de la descripción, el método incluye administrar a un mamífero por vía intratecal, por ejemplo, en la región lumbar, una composición que comprende una cantidad eficaz de un vector de rAAV que comprende un marco abierto de lectura que codifica un producto génico, cuya expresión en el sistema nervioso central del mamífero previene, inhibe o trata la disfunción neurocognitiva, y opcionalmente, administrar un potenciador de la penetración. En un aspecto de la descripción, el potenciador de la penetración se administra antes que la composición. En un aspecto de la descripción, la composición comprende un potenciador de la penetración. En un aspecto de la descripción, el potenciador de la penetración se administra después de la composición. En un aspecto de la descripción, el producto génico es una enzima de almacenamiento lisosómico. En un aspecto de la descripción, el mamífero es un adulto inmunocompetente. En un aspecto de la descripción, el vector de rAAV es un vector AAV-1,

AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAVrh10 o AAV-9. En un aspecto de la descripción, el mamífero es un ser humano. En un aspecto de la descripción, se administran múltiples dosis. En un aspecto de la descripción, la composición se administra semanalmente, mensualmente o con dos o más meses de diferencia. En un aspecto de la descripción, el mamífero al que se le administra por vía intratecal el AAV no se somete a inmunosupresión o inducción de inmunotolerancia (por ejemplo, la administración del AAV solo proporciona el efecto terapéutico). En un aspecto de la descripción, el mamífero al que se le administra por vía intratecal el AAV es inmunodeficiente o se somete a inmunosupresión o inducción de inmunotolerancia, por ejemplo, para inducir niveles más altos de expresión de proteína terapéutica con respecto a un mamífero correspondiente al que se le administra por vía intratecal el AAV pero no se somete a inmunosupresión o inducción de inmunotolerancia.

En un aspecto de la descripción, el método incluye administrar a un mamífero inmunocompetente por vía intracerebroventricular, por ejemplo, al ventrículo lateral, una composición que comprende una cantidad eficaz de un vector de rAAV que comprende un marco abierto de lectura que codifica un producto génico, cuya expresión en el sistema nervioso central del mamífero previene, inhibe o trata la disfunción neurocognitiva. En un aspecto de la descripción, el producto génico es una enzima de almacenamiento lisosómico. En un aspecto de la descripción, el vector de rAAV es un vector AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh10 o AAV9. En un aspecto de la descripción, el vector de rAAV no es un vector rAAV5. En un aspecto de la descripción, el mamífero es un ser humano. En un aspecto de la descripción, se administran múltiples dosis. En un aspecto de la descripción, la composición se administra semanalmente, mensualmente o con dos o más meses de diferencia. En un aspecto de la descripción, el mamífero al que se le administra el AAV por vía intracerebroventricular no se somete a inmunosupresión o inducción de inmunotolerancia (por ejemplo, la administración del AAV solo proporciona el efecto terapéutico). En un aspecto de la descripción, el mamífero al que se le administra el AAV por vía intracerebroventricular es inmunodeficiente o se somete a inmunosupresión o inducción de inmunotolerancia, por ejemplo, para inducir niveles más altos de expresión de proteína terapéutica con respecto a un mamífero correspondiente al que se le administra el AAV por vía intracerebroventricular pero no se somete a inmunosupresión o inducción de inmunotolerancia. En un aspecto de la descripción, al mamífero se le induce inmunotolerancia al producto génico antes de administrar la composición que comprende el AAV.

Se proporciona además un método para prevenir, inhibir o tratar la disfunción neurocognitiva asociada con una enfermedad o trastorno del sistema nervioso central en un mamífero que lo necesita. El método incluye administrar por vía endovascular al mamífero una composición que comprende una cantidad eficaz de un vector de rAAV que comprende un marco abierto de lectura que codifica un producto génico, cuya expresión en el sistema nervioso central del mamífero previene, inhibe o trata la disfunción, y una cantidad eficaz de un potenciador de la penetración. En un aspecto de la descripción, la composición comprende el potenciador de la penetración. En un aspecto de la descripción, el potenciador de la penetración comprende manitol, glicocolato de sodio, taurocolato de sodio, desoxicolato de sodio, salicilato de sodio, caprilato de sodio, caprato de sodio, lauril sulfato de sodio, polioxietileno-9-lauril éter o EDTA. En un aspecto de la descripción, el producto génico es una enzima de almacenamiento lisosómico. En un aspecto de la descripción, el mamífero es un adulto inmunocompetente. En un aspecto de la descripción, el vector de rAAV es un vector AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh10 o AAV9. En un aspecto de la descripción, el vector de rAAV no es un vector rAAV5. En un aspecto de la descripción, el mamífero es un ser humano. En un aspecto de la descripción, se administran múltiples dosis. En un aspecto de la descripción, la composición se administra semanalmente. En un aspecto de la descripción, la composición se administra semanalmente, mensualmente o con dos o más meses de diferencia. En un aspecto de la descripción, el mamífero al que se le administra por vía endovascular el AAV no se somete a inmunosupresión o inducción de inmunotolerancia (por ejemplo, la administración del AAV proporciona el efecto terapéutico). En un aspecto de la descripción, el mamífero al que se le administra por vía endovascular el AAV es inmunodeficiente o se somete a inmunosupresión o inducción de inmunotolerancia, por ejemplo, para inducir niveles más altos de expresión de proteína terapéutica con respecto a un mamífero correspondiente al que se le administra por vía endovascular el AAV pero no se somete a inmunosupresión o inducción de inmunotolerancia.

En un aspecto de la descripción, el método incluye administrar por vía intranasal a un mamífero una composición que comprende una cantidad eficaz de un vector de rAAV9 que comprende un marco abierto de lectura que codifica un producto génico, cuya expresión en el sistema nervioso central del mamífero previene, inhibe o trata la disfunción neurocognitiva, y opcionalmente, administrar un potenciador de la penetración. En un aspecto de la descripción, el suministro intranasal puede lograrse como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 8,609,088, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia. En un aspecto de la descripción, el potenciador de la penetración se administra antes que la composición. En un aspecto de la descripción, la composición comprende un potenciador de la penetración. En un aspecto de la descripción, el potenciador de la penetración se administra después de la composición. En un aspecto de la descripción, el producto génico es una enzima de almacenamiento lisosómico. En un aspecto de la descripción, el mamífero es un adulto inmunocompetente. En un aspecto de la descripción, el mamífero es un ser humano. En un aspecto de la descripción, se administran múltiples dosis. En un aspecto de la descripción, la composición se administra semanalmente, mensualmente o con dos o más meses de diferencia. En un aspecto de la descripción, el mamífero al que se le administra el AAV por vía intranasal no se somete a inmunosupresión o inducción de inmunotolerancia. En un aspecto de la descripción, el mamífero al que se le administra el AAV por vía intranasal se somete a inmunosupresión o inducción de inmunotolerancia, por ejemplo, para inducir niveles más altos de expresión de la proteína IDUA con respecto a un

mamífero correspondiente al que se le administra el AAV por vía intranasal pero no se somete a inmunosupresión o inducción de inmunotolerancia.

También se proporciona un método para prevenir, inhibir o tratar la disfunción neurocognitiva asociada con una enfermedad del sistema nervioso central en un mamífero que lo necesita. El método incluye administrar al mamífero una composición que comprende una cantidad eficaz de un vector de rAAV que comprende un marco abierto de lectura que codifica un producto génico, cuya expresión en el sistema nervioso central del mamífero previene, inhibe o trata, y un inmunosupresor. En una modalidad, el inmunosupresor comprende ciclofosfamida. En una modalidad, el inmunosupresor comprende un glucocorticoide, agentes citostáticos, lo que incluye un agente alquilante o un antimetabolito tal como metotrexato, azatioprina, mercaptopurina o un antibiótico citotóxico, un anticuerpo o un agente activo sobre la inmunofilina. En una modalidad, el inmunosupresor comprende una mostaza nitrogenada, nitrosourea, un compuesto de platino, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, fluorouracilo, dactinomicina, una antraciclina, mitomicina C, bleomicina, mitramicina, anticuerpos dirigidos contra CD3 o el receptor de IL-2 (CD25-), anticuerpos anti-IL-2, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, IFN- β , IFN- γ , un opioide o agentes de unión al TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) tales como infliximab (Remicade), etanercept (Enbrel) o adalimumab (Humira). En una modalidad, el rAAV y el inmunosupresor se administran conjuntamente. En una modalidad, el rAAV se administra antes, y opcionalmente, después del inmunosupresor. En una modalidad, el inmunosupresor se administra antes que el rAAV. En una modalidad, el rAAV y el inmunosupresor se administran por vía intratecal. En una modalidad, el rAAV y el inmunosupresor se administran por vía intracerebroventricular. En una modalidad, el rAAV se administra por vía intratecal y el inmunosupresor se administra por vía intravenosa. En un aspecto de la descripción, el producto génico es una enzima de almacenamiento lisosómico. En una modalidad, el mamífero es un adulto. En un aspecto de la descripción, el vector de rAAV es un vector AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh10 o AAV9. En una modalidad, el mamífero es un ser humano. En una modalidad, se administran múltiples dosis. En una modalidad, la composición se administra semanalmente. En una modalidad, la composición se administra semanalmente, mensualmente o con dos o más meses de diferencia.

La invención proporciona también un método para prevenir, inhibir o tratar la disfunción neurocognitiva asociada con una enfermedad del sistema nervioso central en un mamífero que lo necesita. A un mamífero con inducción de inmunotolerancia a un producto génico que está asociado con la enfermedad se le administra una composición que comprende una cantidad eficaz de un vector de rAAV que comprende un marco abierto de lectura que codifica un producto génico, cuya expresión en el sistema nervioso central del mamífero previene, inhibe o trata uno o más síntomas. En un aspecto de la descripción, el producto génico es una enzima de almacenamiento lisosómico. En un aspecto de la descripción, el mamífero es un adulto. En un aspecto de la descripción, el vector de rAAV es un vector AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh10 o AAV9. En un aspecto de la descripción, el mamífero es un ser humano. En un aspecto de la descripción, se administran múltiples dosis. En un aspecto de la descripción, la composición se administra semanalmente.

Los productos génicos que pueden ser codificados por los vectores de rAAV incluyen, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparán sulfato sulfatasa, N-acetil-alfa-D-glucosaminidasa, beta-hexosaminidasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, glucocerebrosidasa, factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDGF), neurturina, factor de crecimiento derivado de la glía (GDGF), tirosina hidroxilasa, dopamina descarboxilasa o ácido glutámico descarboxilasa.

Las enfermedades que pueden presentar síntomas neurológicos o disfunción neurocognitiva que pueden prevenirse, inhibirse o tratarse mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción incluyen, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Angelman, ataxia telangiectasia, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, síndrome de Cockayne, sordera, distrofia muscular de Duchenne, epilepsia, temblor esencial, síndrome X frágil, ataxia de Friedreich, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Huntington, síndrome de Lesch-Nyhan, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, síndrome de Menkes, distrofia miotónica, narcolepsia, neurofibromatosis, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Parkinson, fenilcetonuria, síndrome de Prader-Willi, enfermedad de Refsum, síndrome de Rett, atrofia muscular espinal, ataxia espinocerebelosa, enfermedad de Tangier, enfermedad de Tay-Sachs, esclerosis tuberosa, síndrome de Von Hippel-Lindau, síndrome de Williams, enfermedad de Wilson o síndrome de Zellweger. En un aspecto de la descripción, la enfermedad es una enfermedad de almacenamiento lisosómico, por ejemplo, una falta o deficiencia en una enzima de almacenamiento lisosómico. Las enfermedades de almacenamiento lisosómico incluyen, enfermedades de mucopolisacaridosis (MPS), por ejemplo, mucopolisacaridosis tipo I, por ejemplo, síndrome de Hurler y las variantes síndrome de Scheie y síndrome de Hurler-Scheie (una deficiencia en alfa-L-iduronidasa); síndrome de Hunter (una deficiencia de iduronato-2-sulfatasa); mucopolisacaridosis tipo III, por ejemplo, síndrome de Sanfilippo (A, B, C o D; una deficiencia de heparán sulfato sulfatasa, N-acetil-alfa-D-glucosaminidasa, acetil CoA:alfa-glucosaminida N-acetil transferasa o N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa); mucopolisacaridosis tipo IV, por ejemplo, síndrome de Morquio (una deficiencia de galactosamina-6-sulfato sulfatasa o beta-galactosidasa); mucopolisacaridosis tipo VI, por ejemplo, síndrome de Maroteaux-Lamy (una deficiencia de arilsulfatasa B); mucopolisacaridosis tipo II; mucopolisacaridosis tipo III (A, B, C o D; una deficiencia de heparán sulfato sulfatasa, N-acetil-alfa-D-glucosaminidasa, acetil CoA:alfa-glucosaminida N-acetil transferasa o N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa); mucopolisacaridosis tipo IV (A o B; una deficiencia de galactosamina-6-sulfatasa y beta-galactosidasa); mucopolisacaridosis tipo VI (una deficiencia de arilsulfatasa B); mucopolisacaridosis tipo VII (una deficiencia de beta-

glucuronidasa); mucopolisacaridosis tipo VIII (una deficiencia de glucosamina-6-sulfato sulfatasa); mucopolisacaridosis tipo IX (una deficiencia de hialuronidasa); enfermedad de Tay-Sachs (una deficiencia en la subunidad alfa de la beta-hexosaminidasa); enfermedad de Sandhoff (una deficiencia en las subunidades alfa y beta de la beta-hexosaminidasa); gangliosidosis GM1 (tipo I o tipo II); enfermedad de Fabry (una deficiencia de alfa galactosidasa); leucodistrofia metacromática (una deficiencia de aril sulfatasa A); enfermedad de Pompe (una deficiencia de maltasa ácida); fucosidosis (una deficiencia de fucosidasa); alfamanosidosis (una deficiencia de alfamanosidasa); betamanosidosis (una deficiencia de betamanosidasa), lipofuscinosis ceroides y enfermedad de Gaucher (tipos I, II y III; una deficiencia de glucocerebrosidasa), así como también trastornos tales como el síndrome de Hermansky-Pudlak; idiotez amaurotica; enfermedad de Tánger; aspartilglucosaminuria; trastorno congénito de la glicosilación, tipo Ia; síndrome de Chediak-Higashi; distrofia macular, corneal, 1; cistinosis, nefropática; síndrome de Fanconi-Bickel; lipogranulomatosis de Farber; fibromatosis; displasia geofísica; enfermedad de almacenamiento de glucógeno I; enfermedad de almacenamiento de glucógeno Ib; enfermedad de almacenamiento de glucógeno Ic; enfermedad de almacenamiento de glucógeno III; enfermedad de almacenamiento de glucógeno IV; enfermedad de almacenamiento de glucógeno V; enfermedad de almacenamiento de glucógeno VI; enfermedad de almacenamiento de glucógeno VII; enfermedad de almacenamiento de glucógeno 0; displasia inmunoossea, tipo Schimke; lipidosis; lipasa b; mucopolisacaridosis II; mucopolisacaridosis II, lo que incluye la forma variante; mucopolisacaridosis IV; deficiencia de neuraminidasa con deficiencia de beta-galactosidasa; mucopolisacaridosis I; enfermedad de Niemann-Pick (una deficiencia de esfingomielinasa); enfermedad de Niemann-Pick sin deficiencia de esfingomielinasa (una deficiencia de un gen npc1 que codifica una enzima metabolizadora del colesterol); enfermedad de Refsum; enfermedad de los histiocitos azul marino; trastorno de almacenamiento del ácido siálico infantil; sialuria; deficiencia múltiple de sulfatasa; enfermedad de almacenamiento de triglicéridos con alteración de la oxidación de ácidos grasos de cadena larga; enfermedad de Winchester; enfermedad de Wolman (una deficiencia de éster hidrolasa de colesterol); trastorno de tipo desoxirribonucleasa I 1; trastorno de arilsulfatasa E; trastorno de la subunidad 1 lisosómica de transporte de H⁺ y ATPasa; enfermedad de almacenamiento de glucógeno IIb; trastorno de la proteína rab9 asociada a Ras; condrodisplasia punctata 1, trastorno recesivo ligado al cromosoma X; enfermedad de almacenamiento de glucógeno VIII; trastorno de la proteína de membrana 2 asociado a lisosomas; síndrome de Menkes; trastorno congénito de la glicosilación, tipo Ic; y sialuria. El reemplazo de niveles de menos del 20 %, por ejemplo, menos del 10 % o aproximadamente del 1 % al 5 % de enzima de almacenamiento lisosómico encontrado en mamíferos no enfermos, puede prevenir, inhibir o tratar síntomas neurológicos tales como la degeneración neurológica en mamíferos.

En un aspecto de la descripción, los métodos descritos en la presente descripción implican suministrar al CNS de un ser humano inmunocompetente que necesita tratamiento una composición que comprende una cantidad eficaz de un vector rAAV9 que comprende un marco abierto de lectura que codifica una IDUA. Las vías de administración al CNS/cerebro incluyen administración intratecal, administración intracraneal, por ejemplo, administración intracerebroventricular o administración cerebroventricular lateral, administración intranasal, administración endovascular y administración intraparenquimatosa.

Pueden emplearse otros vectores virales en los métodos de la invención, por ejemplo, vectores virales tales como vectores de retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus del bosque semliki o virus del herpes simple.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Diseño experimental para ratones con deficiencia de iduronidasa a los que se administró AAV9-IDUA por vía intracerebroventricular (ICV) o intratecal. Para prevenir la respuesta inmunitaria, los animales se inmunosuprimieron con ciclofosfamida (CP), se les indujo inmunotolerancia al nacer mediante la administración intravenosa de proteína iduronidasa humana (aldurazyme), o las inyecciones se llevaron a cabo en ratones inmunodeficientes NOD-SCID que también tenían deficiencia de iduronidasa. Los animales se sacrificaron en el tiempo indicado después del tratamiento, los cerebros se microdisecionaron y los extractos se analizaron para determinar la actividad de iduronidasa.

Figura 2. Actividad de IDUA en animales inmunodeficientes con deficiencia de IDUA.

Figura 3. Actividad de IDUA en animales inmunosuprimidos a los que se les administró el vector de AAV por vía ICV.

Figura 4. Actividad de IDUA en animales inmunosuprimidos a los que se les administró el vector de AAV por vía IT.

Figura 5. Actividad de IDUA en animales con inducción de inmunotolerancia a los que se administró el vector de AAV ICV.

Figura 6. Compilación de todos los niveles medios de actividad de IDUA para comparación directa.

Figura 7. Los datos están agrupados de acuerdo con el área del cerebro.

Figura 8. Análisis del material de almacenamiento GAG en los diferentes cortes de cerebro para los cuatro grupos de prueba.

Figura 9. Esquema del diseño experimental.

Figura 10. Infusión intracraneal de AAV9-IDUA en ratones con MPS I inmunodeficientes. Se inyectaron 10¹¹ genomas de vector a animales adultos y se evaluó la expresión de iduronidasa en el cerebro después de 10 semanas. Los niveles de actividad enzimática en el cerebro fueron significativamente más altos que en los cerebros de los animales de tipo silvestre y variaron de 30 a 300 veces más altos que los de tipo silvestre.

Figura 11. Administración intracraneal de AAV9-IDUA en ratones inmunocompetentes con deficiencia de IDUA. A los animales adultos se les inyectaron 10¹¹ genomas de vector y se inmunosuprimieron mediante la inyección semanal

de ciclofosfamida (CP). Las inyecciones de CP se interrumpieron 6 semanas después de la inyección del vector debido a la salud deficiente, y los animales se sacrificaron 8 semanas después de la inyección. Los cerebros se microdisecionaron y analizaron para determinar la actividad enzimática de IDUA.

Figura 12. Infusión intracraneal de AAV9-IDUA en ratones con MPS I con inducción de inmunotolerancia. Se indujo tolerancia a los ratones con MPS 1 con una sola dosis de Aldurazyme al nacer o con múltiples dosis administradas semanalmente, a partir del nacimiento. Los ratones se infundieron con vector a los 4 meses y se sacrificaron 11 semanas después de la inyección. Los cerebros se microdisecionaron y analizaron para determinar la expresión de iduronidasa. Las actividades de la enzima variaron de un promedio de 10 a 1000 veces más alta que los niveles de tipo silvestre.

Figura 13. Administración intratecal de AAV9-IDUA en animales inmunocompetentes con deficiencia de IDUA. Se inyectaron ratones con MPS I adultos con AAV9-IDUA por vía intratecal, seguido de un régimen inmunosupresor semanal de ciclofosfamida. Los animales se sacrificaron 11 semanas después de la inyección, y después se analizaron los cerebros y las médulas espinales para determinar la actividad enzimática de IDUA.

Figura 14. Infusión intratecal de AAV9-IDUA en ratones con MPS I con inducción de inmunotolerancia. A animales con deficiencia de IDUA se les indujo tolerancia al nacer con una dosis única de Aldurazyme o dosis múltiples administradas semanalmente a partir del nacimiento. A los 4 meses de edad, los animales se infundieron intratecalmente con el vector AAV9-IDUA, y a las 10 semanas después de la inyección se sacrificaron los animales, se microdisecionaron los cerebros y se analizó la actividad de iduronidasa. Existió restauración de la actividad enzimática en todas las partes del cerebro, con actividades en el cerebelo que variaron de 200 a 1500 veces más altas que los niveles de tipo silvestre. Los niveles de actividad enzimática en el bulbo olfatorio y el cerebelo (a la derecha de la línea discontinua) corresponden al eje Y derecho.

Figura 15. Infusión intratecal de AAV9-IDUA en animales con MPS I inmunocompetentes. A los animales con MPS I de control se les inyectó el vector AAV9-IDUA, pero no se inmunosuprimieron ni se les indujo inmunotolerancia. Los animales se sacrificaron 11 semanas después de la inyección del vector, y después se analizó la actividad de iduronidasa en sus cerebros. Los niveles de enzima se restauraron a los niveles de tipo silvestre en todas las partes del cerebro, pero fueron significativamente más bajos que en los animales que estaban inmunosuprimidos o con inmunotolerancia.

Figura 16. Normalización de los niveles de glucosaminoglicanos (GAG) tras la infusión intracraneal o intratecal de AAV9. Se inyectó AAV9-IDUA por vía intracraneal o intratecal en ratones MPS I inmunodeficientes, inmunosuprimidos o con inducción de inmunotolerancia como se indica. Los animales se sacrificaron 8-11 semanas después de la inyección, después se microdisecionaron los cerebros y se analizaron para determinar los niveles de GAG. El almacenamiento de GAG se restauró a los niveles de tipo silvestre o cercanos a los de tipo silvestre en todos los grupos analizados.

Figura 17. Copias del vector de IDUA en el cerebro. Los cerebros microdisecionados se analizaron para determinar las secuencias de vector de IDUA mediante QPCR. El número de copias en ratones inyectados por vía intracraneal e intratecal se correlaciona con los niveles de actividad enzimática representados en las Figuras 11 y 13.

Figura 18. Infusión ICV de AAV8-MCI en animales adultos.

Figura 19. Administración intranasal de AAV9-IDUA en animales inmunocompetentes con deficiencia de IDUA. Se infundieron ratones con MPS I adultos con AAV9-IDUA por vía intranasal, seguido de un régimen inmunosupresor semanal de ciclofosfamida. Los animales se sacrificaron 12 semanas después de la inyección y se analizaron los cerebros para determinar la actividad enzimática de IDUA.

Figura 20. Copias del vector de IDUA en el cerebro. Los cerebros microdisecionados se analizaron para determinar las secuencias de vector de IDUA mediante QPCR. Los números de copias en ratones inyectados por vía intranasal se correlacionan con los niveles de enzima en la Figura 19.

Figura 21. Protocolo con inmunosupresor o inducción de tolerancia mediante el uso del suministro IN de AAV9-IDUA.

Figura 22. Restauración de la actividad de IDUA después del suministro IN de AAV9-IDUA.

Figura 23. Actividad de GAG después del suministro IN de AAV9-IDUA.

Figura 24. Inmunofluorescencia de IDUA en el cerebro después del suministro IN de AAV9-IDUA.

Figura 25. Inmunofluorescencia de GFP en el cerebro después del suministro IN de AAV9-GFP.

Figuras 26A-D. A) Tinción con azul de toluidina. B) Resumen de la patología de tejidos en ratones con MPS I heterocigotos y homocigotos de control y ratones tratados con suministro IN de AAV9-MCI de IDUA. C) Laberinto de Barnes. D) Datos del laberinto de Barnes.

Figuras 27A-B. A) Esquema de los vectores AAV9. B) Resumen de los grupos de prueba *in vivo* para el suministro IV e IT de vectores AAV9-hIDS.

Figura 28. Actividad de IDS en plasma de ratones a los que se les administró vectores AAV9-hIDS por las vías IT e IV.

Figura 29. Actividad de IDS en el CNS después de la inyección IT de AAV9-hIDS. Para cada grupo de ratones, los datos de los siguientes tejidos se presentan de izquierda a derecha: médula espinal, tálamo/tronco encefálico, cerebelo, corteza, hipocampo y cuerpo estriado.

Figuras 30A-D. A) Actividad de IDS en el CNS después de la inyección ICV de AAV9-hIDS. Para cada grupo de ratones, los datos de los siguientes tejidos se presentan de izquierda a derecha: médula espinal; tálamo/tronco encefálico, el cerebelo, la corteza, el hipocampo, el cuerpo estriado, el bulbo olfatorio del lado izquierdo y el bulbo olfatorio, el cuerpo estriado, el hipocampo, la corteza, el cerebelo y el tálamo/tronco encefálico del lado derecho. B) Actividad de IDS en plasma después de la inyección ICV de AAV9-hIDS. C) Actividad de IDS en órganos periféricos después de la inyección ICV de AAV9-hIDS. Para cada grupo de ratones, los datos de los siguientes órganos se

presentan de izquierda a derecha: hígado, corazón, pulmón, bazo y riñón. D) Contenido de GAG después de la inyección ICV. Para cada grupo de ratones, los datos de los siguientes tejidos se presentan de izquierda a derecha: médula espinal, resto, cerebelo, corteza, hipocampo, cuerpo estriado y bulbo olfatorio.

Figuras 31A-B. A) Laberinto de Barnes. B) Desempeño el día 1 y el día 4.

5 Figura 32. Comparación de la función neurológica de ratones de tipo silvestre y con MPS II.

Figura 33. Diseño experimental para el suministro de genes IV mediante el uso de AAV9 o AAVrh10.

Figuras 34A-C. Restauración de la actividad de IDUA en plasma (A), tejidos periféricos (B) y CNS (C) y después de la administración IV.

Figuras 35A-C. Actividad de GAG en orina (A), tejidos periféricos (B) y CNS (C).

10 Figuras 36A-F. Inmunofluorescencia de IDUA en cortes de tejido. A) Hígado. B) Corazón. C) Pulmón. D) Tálamo. E) Hipocampo. F) Cerebelo.

Figura 37. Niveles de actividad enzimática de IDUA después de la infusión IN de AAV9-IDUA. Se observaron altos niveles de actividad enzimática de IDUA en el bulbo olfatorio (10-100 veces más alto de lo normal) y niveles normalizados (wt) en otras partes del cerebro.

15 Figura 38. Reducción de material de almacenamiento en ratones tratados.

Figuras 39A-D. IDUA (A), GFP (B); e inmunofluorescencia del bulbo olfatorio (C). (D) Tinción conjunta con proteína marcadora olfatoria en bulbo olfatorio.

Figura 40. Función neurocognitiva mejorada en ratones tratados IN.

20 Figuras 41A-B. Perfiles neuroquímicos en cerebelo (A) e hipocampo (B). El control (CTR) es la barra a la izquierda, MPS I (no tratado) es la barra central y MPS I tratado es la barra a la derecha, para cada perfil neuroquímico.

Figura 42. Tinción del plexo coroideo después del suministro IN de AAVrh10-GFP.

Descripción detallada de la invención

25 Definiciones

Como se usa en la presente descripción, "individuo" (como en el sujeto del tratamiento) significa un mamífero. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, seres humanos; primates no humanos, por ejemplo, simios y monos; y no primates, por ejemplo, perros, gatos, ratas, ratones, vacas, caballos, ovejas y cabras. Los no mamíferos incluyen, por ejemplo, peces y aves.

30 Los términos "enfermedad" o "trastorno" se usan indistintamente y se usan para referirse a enfermedades o afecciones en las que la falta o cantidades reducidas de un producto génico específico, por ejemplo, una enzima de almacenamiento lisosómico, desempeña un papel en la enfermedad de manera que puede lograrse un efecto terapéuticamente beneficioso complementando, por ejemplo, hasta al menos el 1 % de los niveles normales.

40 "Sustancialmente", como se usa el término en la presente descripción, significa completamente o casi completamente; por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de un componente o bien no tiene ninguno de los componentes o contiene una cantidad tan traza que cualquier propiedad funcional relevante de la composición no se ve afectada por la presencia de la cantidad traza, o un compuesto es "sustancialmente puro" si sólo existen rastros insignificantes de impurezas presentes.

45 "Tratar" o "tratamiento" dentro del significado en la presente descripción se refiere a un alivio de los síntomas asociados con un trastorno o enfermedad, "inhibir" significa inhibir la progresión o empeoramiento adicional de los síntomas asociados con el trastorno o enfermedad, y "prevenir" se refiere a la prevención de los síntomas asociados con el trastorno o enfermedad.

50 Como se usa en la presente descripción, una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente de la invención, por ejemplo, un AAV recombinante que codifica un producto génico, se refiere a una cantidad del agente que alivia, en su totalidad o en parte, los síntomas asociados con el trastorno o afección, o detiene o ralentiza la progresión o empeoramiento adicional de esos síntomas, o previene o proporciona profilaxis para el trastorno o afección, por ejemplo, una cantidad que es eficaz para prevenir, inhibir o tratar en el individuo uno o más síntomas neurológicos.

55 En particular, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquiera de los efectos tóxicos o perjudiciales de los compuestos de la invención se compensan por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

60 Un "vector", como se usa en la presente descripción, se refiere a una macromolécula o asociación de macromoléculas que comprende o se asocia con un polinucleótido y que puede usarse para mediar en el suministro del polinucleótido a una célula, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los vectores ilustrativos incluyen, por ejemplo, plásmidos, vectores virales, liposomas y otros vehículos para el suministro de genes. El polinucleótido que se va a suministrar, a veces denominado como "polinucleótido objetivo" o "transgén", puede comprender una secuencia codificante de interés en terapia génica (tal como un gen que codifica una proteína de interés terapéutico) y/o un marcador seleccionable o detectable.

"AAV" es virus adenoasociado, y puede usarse para referirse al virus mismo o derivados del mismo. El término cubre todos los subtipos, serotipos y pseudotipos, y formas tanto de origen natural como recombinantes, excepto cuando se requiera de cualquier otra manera. Como se usa en la presente descripción, el término "serotipo" se refiere a un AAV que se identifica y se distingue de otros AAV basado en sus propiedades de unión, por ejemplo, existen once serotipos de AAV, AAV1-AAV11, lo que incluye AAV2, AAV5, AAV8, AAV9 y AAVrh10, y el término abarca pseudotipos con las mismas propiedades de unión. De esta forma, por ejemplo, los serotipos de AAV9 incluyen AAV con las propiedades de unión de AAV9, por ejemplo, un AAV pseudotipado que comprende la cápside de AAV9 y un genoma de rAAV que no se deriva ni se obtiene de AAV9 o cuyo genoma es quimérico. La abreviatura "rAAV" se refiere a un virus adenoasociado recombinante, también denominado vector de AAV recombinante (o "vector de rAAV").

Un "virus de AAV" se refiere a una partícula viral compuesta por al menos una proteína de la cápside de AAV y un polinucleótido encapsidado. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido distinto de un genoma de AAV de tipo silvestre tal como un transgén que se suministrará a una célula de mamífero), se denomina típicamente "rAAV". Una "proteína de la cápside" de AAV incluye una proteína de la cápside de un AAV de tipo silvestre, así como también formas modificadas de una proteína de la cápside de AAV que son estructural y funcionalmente capaces de empaquetar un genoma de rAAV y unirse a al menos un receptor celular específico que puede ser diferente de un receptor empleado por el AAV de tipo silvestre. Una proteína de la cápside de AAV modificada incluye una proteína de la cápside de AAV quimérica, tal como una que tiene secuencias de aminoácidos de dos o más serotipos de AAV, por ejemplo, una proteína de la cápside formada a partir de una porción de la proteína de la cápside de AAV9 fusionada o unida a una porción de la proteína de la cápside de AAV-2, y una proteína de la cápside de AAV que tiene una etiqueta u otro péptido o proteína detectable de la cápside que no es AAV fusionada o unida a la proteína de la cápside de AAV, por ejemplo, una porción de una molécula de anticuerpo que se une a un receptor diferente al receptor para AAV9, tal como el receptor de transferrina, puede fusionarse de forma recombinante con la proteína de la cápside del AAV9.

Un rAAV "pseudotipado" es un virus infeccioso que tiene cualquier combinación de una proteína de la cápside de AAV y un genoma de AAV. Las proteínas de la cápside de cualquier serotipo de AAV pueden emplearse con un genoma de AAV que se deriva o puede obtenerse de un genoma de AAV de tipo silvestre de un serotipo diferente o que es un genoma quimérico, es decir, formado a partir de ADN de AAV de dos o más serotipos diferentes, por ejemplo, un genoma quimérico que tiene 2 repeticiones terminales invertidas (ITR), cada ITR de un serotipo diferente o ITR quiméricas. El uso de genomas quiméricos tales como los que comprenden ITR de dos serotipos de AAV o ITR quiméricas puede dar como resultado una recombinación direccional que puede potenciar aún más la producción de concatémeros intermoleculares transcripcionalmente activos. Por tanto, las ITR 5' y 3' dentro de un vector de rAAV de la invención pueden ser homólogas, es decir, del mismo serotipo, heterólogas, es decir, de diferentes serotipos, o quiméricas, es decir, una ITR que tiene secuencias de ITR de más de un serotipo de AAV.

Vectores de rAAV

Los virus adenoasociados de cualquier serotipo son adecuados para preparar rAAV, ya que los diversos serotipos están relacionados funcional y estructuralmente, incluso a nivel genético. Todos los serotipos de AAV exhiben aparentemente propiedades de replicación similares mediadas por genes rep homólogos; y todos portan generalmente tres proteínas de la cápside relacionadas, tales como las expresadas en AAV2. El grado de parentesco lo sugiere además el análisis de heterodúplex que revela una hibridación cruzada extensa entre serotipos a lo largo del genoma; y la presencia de segmentos de autohibridación análogos en los extremos que corresponden a los ITR. Los patrones de infectividad similares también sugieren que las funciones de replicación en cada serotipo están bajo un control regulador similar. Entre los diversos serotipos de AAV, el AAV2 es el más empleado comúnmente.

Un vector de AAV de la invención comprende típicamente un polinucleótido que es heterólogo de AAV. El polinucleótido es típicamente de interés debido a la capacidad de proporcionar una función a una célula objetivo en el contexto de la terapia génica, tal como la regulación positiva o negativa de la expresión de un determinado fenotipo. Dicho polinucleótido heterólogo o "transgén" tiene generalmente una longitud suficiente para proporcionar la función o secuencia codificante deseada.

Cuando se desea la transcripción del polinucleótido heterólogo en la célula objetivo pretendida, puede unirse operativamente a su propio promotor o a un promotor heterólogo, en dependencia, por ejemplo, del nivel y/o la especificidad de la transcripción deseado dentro de la célula objetivo, como se conoce en la técnica. Diversos tipos de promotores y potenciadores son adecuados para su uso en este contexto. Los promotores constitutivos proporcionan un nivel continuo de transcripción génica y pueden preferirse cuando se desea que el polinucleótido terapéutico o profiláctico se exprese de manera continua. Los promotores inducibles generalmente muestran una baja actividad en ausencia del inductor y se regulan positivamente en presencia del inductor. Pueden preferirse cuando se desea la expresión solo en determinados momentos o en determinadas localizaciones, o cuando es conveniente valorar el nivel de expresión mediante el uso de un agente inductor. Los promotores y potenciadores

también pueden ser específicos de tejido: es decir, muestran su actividad solo en determinados tipos de células, presumiblemente debido a elementos reguladores de genes que se encuentran únicamente en esas células.

Ejemplos ilustrativos de promotores son el promotor tardío de SV40 del virus simio 40, el elemento potenciador/promotor de poliedro de baculovirus, la timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV tk), el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) y diversos promotores retrovirales, lo que incluye los elementos LTR. Los promotores inducibles incluyen promotores inducibles por iones de metales pesados (tales como el promotor del virus del tumor mamario de ratón (mMTV) o diversos promotores de hormonas de crecimiento) y los promotores del fago T7 que son activos en presencia de la ARN polimerasa T7. A modo de ilustración, los ejemplos de promotores específicos de tejido incluyen diversos promotores de surfactina (para la expresión en el pulmón), promotores de miosina (para la expresión en músculo) y promotores de albúmina (para la expresión en hígado). Se conoce una gran variedad de otros promotores y están generalmente disponibles en la técnica, y las secuencias de muchos de dichos promotores están disponibles en bases de datos de secuencias tales como la base de datos GenBank.

Cuando también se desea la traducción en la célula objetivo pretendida, el polinucleótido heterólogo también comprenderá, preferentemente, elementos de control que facilitan la traducción (tales como un sitio de unión al ribosoma o "RBS" y una señal de poliadenilación). En consecuencia, el polinucleótido heterólogo comprende generalmente al menos una región codificante unida operativamente a un promotor adecuado y también puede comprender, por ejemplo, un potenciador unido operativamente, un sitio de unión al ribosoma y una señal de poli-A. El polinucleótido heterólogo puede comprender una región codificante o más de una región codificante bajo el control de los mismos o diferentes promotores. La unidad completa, que contiene una combinación de elementos de control y región codificante, se denomina a menudo casete de expresión.

El polinucleótido heterólogo se integra mediante técnicas recombinantes en o en lugar de la región codificante genómica del AAV (es decir, en lugar de los genes rep y cap de AAV), pero generalmente está flanqueado a ambos lados por regiones de repeticiones terminales invertidas (ITR) del AAV. Esto significa que una ITR aparece tanto aguas arriba como aguas abajo de la secuencia codificante, ya sea en yuxtaposición directa, por ejemplo, (aunque no necesariamente) sin ninguna secuencia intermedia de origen AAV para reducir la probabilidad de recombinación que podría regenerar un genoma de AAV competente para la replicación. Sin embargo, una sola ITR puede ser suficiente para llevar a cabo las funciones asociadas normalmente con las configuraciones que comprenden dos ITR (ver, por ejemplo, el documento WO 94/13788), y los constructos de vector con solo una ITR pueden, por tanto, emplearse junto con los métodos de empaquetamiento y producción de la presente invención.

Los promotores nativos de rep se autorregulan y pueden limitar la cantidad de partículas de AAV producidas. El gen rep también puede unirse operativamente a un promotor heterólogo, ya sea que rep se proporcione como parte del constructo del vector o por separado. Es adecuado cualquier promotor heterólogo que no esté fuertemente regulado negativamente por la expresión del gen rep; pero pueden preferirse los promotores inducibles porque la expresión constitutiva del gen rep puede tener un impacto negativo en la célula huésped. Se conoce en la técnica una gran variedad de promotores inducibles; lo que incluye, a modo de ilustración, promotores inducibles por iones de metales pesados (tales como promotores de metalotioneína); promotores inducibles por hormonas esteroideas (tales como el promotor de MMTV o promotores de hormonas de crecimiento); y promotores tales como los del fago T7 que son activos en presencia de la ARN polimerasa T7. Una subclase de promotores inducibles son aquellos que son inducidos por el virus auxiliar que se usa para complementar la replicación y empaquetamiento del vector de rAAV. También se han descrito varios promotores inducibles por virus auxiliares, lo que incluye el promotor génico temprano de adenovirus que es inducible por la proteína E1A de adenovirus; el promotor tardío principal de adenovirus; el promotor del virus del herpes que es inducible por proteínas del virus del herpes tales como VP16 o 1CP4; así como también promotores inducibles por vaccinia o poxvirus.

Se han descrito métodos para identificar y someter a prueba los promotores inducibles por virus auxiliares (ver, por ejemplo, el documento WO 96/17947). Por tanto, se conocen métodos en la técnica para determinar si los promotores candidatos son o no inducibles por virus auxiliares, y si serán útiles o no en la generación de células de empaquetamiento de alta eficiencia. Brevemente, uno de dichos métodos implica reemplazar el promotor p5 del gen rep de AAV con el promotor inducible por virus auxiliar putativo (conocido en la técnica o identificado mediante el uso de técnicas bien conocidas tales como el enlace a genes "informadores" sin promotor). Los genes rep-cap de AAV (con p5 reemplazado), por ejemplo, unidos a un marcador seleccionable positivo tal como un gen de resistencia a antibióticos, se integran después de forma estable en una célula huésped adecuada (tales como las células HeLa o A549 ejemplificadas más abajo). Las células que son capaces de crecer relativamente bien en condiciones de selección (por ejemplo, en presencia del antibiótico) se someten a prueba a continuación para determinar su capacidad para expresar los genes rep y cap tras la adición de un virus auxiliar. Como prueba inicial para la expresión de rep y/o cap, las células pueden tamizarse fácilmente mediante el uso de inmunofluorescencia para detectar las proteínas Rep y/o Cap. La confirmación de las capacidades y eficiencias de empaquetamiento pueden determinarse mediante pruebas funcionales para determinar la replicación y el empaquetamiento de los nuevos vectores de rAAV. Mediante el uso de esta metodología, un promotor inducible por virus auxiliar derivado del gen de la metalotioneína de ratón se ha identificado como un reemplazo adecuado para el promotor p5, y se ha usado para producir altos títulos de partículas de rAAV (como se describe en el documento WO 96/17947).

En cualquier caso, es conveniente la eliminación de uno o más genes de AAV, para reducir la probabilidad de generar AAV competentes para la replicación ("RCA"). En consecuencia, las secuencias codificantes o promotoras de rep, cap o ambos, pueden eliminarse, ya que las funciones proporcionadas por estos genes pueden proporcionarse *en trans*, por ejemplo, en una línea estable o a través de cotransfección.

El vector resultante se denomina como que es "defectuoso" en estas funciones. Para replicar y empaquetar el vector, las funciones faltantes se complementan con un gen de empaquetamiento, o una pluralidad de los mismos, que codifican juntos las funciones necesarias para los diversos productos génicos rep y/o cap faltantes. En una modalidad, los genes de empaquetamiento o casetes de genes no están flanqueados por ITR de AAV y, en una modalidad, no comparten ninguna homología sustancial con el genoma de rAAV. Por tanto, para minimizar la recombinación homóloga durante la replicación entre la secuencia del vector y los genes de empaquetamiento proporcionados por separado, es conveniente evitar la superposición de las dos secuencias de polinucleótidos. El nivel de homología y la frecuencia correspondiente de recombinación aumentan con el aumento de la longitud de las secuencias homólogas y con su nivel de identidad compartida. El nivel de homología que planteará una preocupación en un sistema dado puede determinarse teóricamente y confirmarse experimentalmente, como se conoce en la técnica. Típicamente, sin embargo, la recombinación puede reducirse o eliminarse sustancialmente si la secuencia superpuesta es menos de aproximadamente una secuencia de 25 nucleótidos si es al menos un 80 % idéntica en toda su longitud, o menos de aproximadamente una secuencia de 50 nucleótidos si es al menos un 70 % idéntica en toda su longitud. Por supuesto, se prefieren niveles incluso más bajos de homología, ya que reducirán aún más la probabilidad de recombinación. Parece que, incluso sin ninguna homología superpuesta, existe cierta frecuencia residual de generación de RCA. Incluso pueden obtenerse reducciones adicionales en la frecuencia de generación de RCA (por ejemplo, mediante recombinación no homóloga) al "dividir" las funciones de replicación y encapsidación de AAV, como describen Allen y otros, documento WO 98/27204).

El constructo del vector de rAAV y los constructos de genes de empaquetamiento complementarios pueden implementarse en esta invención en varias formas diferentes. Pueden usarse partículas virales, plásmidos y células huésped transformadas de manera estable para introducir dichos constructos en la célula de empaquetamiento, ya sea de forma transitoria o estable.

En determinadas modalidades de esta invención, el vector de AAV y el gen o genes de empaquetamiento complementarios, si los hay, se proporcionan en forma de plásmidos bacterianos, partículas de AAV o cualquier combinación de los mismos. En otras modalidades, la secuencia del vector de AAV, el gen o los genes de empaquetamiento, o ambos, se proporcionan en forma de células eucariotas genéticamente alteradas (preferentemente, alteradas de forma hereditaria). El desarrollo de células huésped alteradas de forma hereditaria para expresar la secuencia del vector de AAV, los genes de empaquetamiento de AAV, o ambos, proporciona una fuente establecida del material que se expresa a un nivel fiable.

Por tanto, puede usarse una variedad de diferentes células genéticamente alteradas en el contexto de esta invención. A modo de ilustración, puede usarse una célula huésped de mamífero con al menos una copia intacta de un vector de rAAV integrado de forma estable. Puede usarse un plásmido de empaquetamiento de AAV que comprende al menos un gen rep de AAV unido operativamente a un promotor para suministrar funciones de replicación (como se describe en la Patente de los Estados Unidos 5,658,776). De forma alternativa, puede usarse una línea celular estable de mamífero con un gen rep de AAV unido operativamente a un promotor para suministrar funciones de replicación (ver, por ejemplo, Trempe y otros, documento WO 95/13392); Burstein y otros. (documento WO 98/23018); y Johnson y otros. (EE. UU. núm. 5,656,785). El gen cap de AAV, que proporciona las proteínas de encapsidación como se describió anteriormente, puede proporcionarse junto con un gen rep de AAV o por separado (ver, por ejemplo, las solicitudes y patentes referidas anteriormente, así como también Allen y otros. (documento WO 98/27204). Son posibles otras combinaciones y se incluyen dentro del alcance de esta invención.

Vías para el suministro

A pesar de la inmensa red de la vasculatura cerebral, el suministro sistémico de agentes terapéuticos al sistema nervioso central (CNS) no es eficaz para más del 98 % de las moléculas pequeñas y para casi el 100 % de las moléculas grandes (Partridge, 2005). La falta de eficacia se debe a la presencia de la barrera hematoencefálica (BBB), que impide que la mayoría de las sustancias extrañas, incluso muchos agentes terapéuticos beneficiosos, entren en el cerebro desde la sangre circulante. Si bien determinados agentes terapéuticos de moléculas pequeñas, péptidos y proteínas administrados sistémicamente alcanzan el parénquima cerebral al cruzar la BBB (Banks, 2008), se necesitan generalmente dosis sistémicas altas para lograr niveles terapéuticos, lo que puede conducir a efectos adversos en el cuerpo. Los agentes terapéuticos pueden introducirse directamente en el CNS mediante inyecciones intracerebroventriculares o intraparenquimatosas. El suministro intranasal evita la BHE y dirige los agentes terapéuticos directamente al CNS mediante el uso de vías a lo largo de los nervios olfatorio y trigémino que inervan los conductos nasales (Frey II, 2002; Thorne y otros, 2004; Dhanda y otros, 2005).

Puede emplearse cualquier vía de administración de rAAV siempre que esa vía y la cantidad administrada sean profilácticamente o terapéuticamente útiles. En un ejemplo, las vías de administración al CNS incluyen la intratecal y la intracraneal. La administración intracraneal puede ser a la cisterna magna o al ventrículo. El término "cisterna

magna" pretende incluir el acceso al espacio alrededor y debajo del cerebelo a través de la abertura entre el cráneo y la parte superior de la columna vertebral. El término "ventrículo cerebral" pretende incluir las cavidades del cerebro que son continuas con el canal central de la médula espinal. La administración intracraneal es a través de inyección o infusión y los intervalos de dosis adecuados para la administración intracraneal son generalmente de aproximadamente 10^3 a 10^{15} unidades infecciosas de vector viral por microlitro suministradas en 1 a 3000 microlitros de volumen de inyección única. Por ejemplo, los genomas virales o unidades infecciosas de vector por microlitro contendrán generalmente aproximadamente 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} o 10^{17} genomas virales o unidades infecciosas de vector viral suministradas en aproximadamente 10, 50, 100, 200, 500, 1000 o 2000 microlitros. Debe entenderse que la dosificación antes mencionada es simplemente una dosificación ilustrativa y los expertos en la técnica entenderán que esta dosificación puede variarse. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de prueba in vitro o in vivo.

El AAV suministrado en los métodos de tratamiento intratecales de la presente invención puede administrarse mediante cualquier vía conveniente usada comúnmente para la administración intratecal. Por ejemplo, la administración intratecal puede realizarse a través de una infusión lenta de la formulación durante aproximadamente una hora. La administración intratecal es a través de inyección o infusión y los intervalos de dosis adecuados para la administración intratecal son generalmente de aproximadamente 10^3 a 10^{15} unidades infecciosas de vector viral por microlitro suministrado, por ejemplo, en 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75 o 100 o más mililitros, por ejemplo, 1 a 10 000 mililitros o 0,5 a 15 mililitros, de volumen de inyección única. Por ejemplo, los genomas virales o unidades infecciosas de vector por microlitro contienen generalmente aproximadamente 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} o 10^{14} genomas virales o unidades infecciosas de vector viral.

El AAV suministrado en los métodos de tratamiento intranasales de la presente invención puede administrarse en intervalos de dosis adecuados, generalmente aproximadamente 10^3 a 10^{15} unidades infecciosas de vector viral por microlitro suministrado, por ejemplo, en 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75 o 100 o más mililitros, por ejemplo, 1 a 10 000 mililitros o 0,5 a 15 mililitros. Por ejemplo, los genomas virales o unidades infecciosas de vector por microlitro contienen generalmente aproximadamente 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} o 10^{17} genomas virales o unidades infecciosas de vector viral, por ejemplo, al menos $1,2 \times 10^{11}$ genomas o unidades infecciosas, por ejemplo, al menos 2×10^{11} hasta aproximadamente 2×10^{12} genomas o unidades infecciosas o aproximadamente 1×10^{13} a aproximadamente 5×10^{16} genomas o unidades infecciosas. En una modalidad, el AAV empleado para el suministro intranasal es uno que se une a glicanos con residuos terminales de galactosa y en una modalidad la dosis es de 2 a 8 veces mayor que 9×10^{10} a menos de 1×10^{11} genomas o unidades infecciosas de vector viral de AAV8.

La terapia, si se expresa una enzima de almacenamiento lisosómico tal como IDUA, da como resultado la normalización de los gránulos de almacenamiento lisosómico en el tejido neuronal y/o meníngeo de los sujetos como se analizó anteriormente. Se contempla que la deposición de los gránulos de almacenamiento mejore a partir del tejido neuronal y glial, lo que alivia de esta manera el retardo del desarrollo y la regresión observados en individuos que padecen la enfermedad de almacenamiento lisosómico. Otros efectos de la terapia pueden incluir la normalización de los gránulos de almacenamiento lisosómico en las meninges cerebrales cerca de la granulación aracnoidea, cuya presencia en la enfermedad de almacenamiento lisosómico da como resultado hidrocefalia de presión alta. Los métodos de la invención también pueden usarse para tratar la compresión de la médula espinal que se produce como resultado de la presencia de gránulos de almacenamiento lisosómico en las meninges cervicales cerca de la médula en C1-C5 o en cualquier otra parte de la médula espinal. Los métodos de la invención también están dirigidos al tratamiento de quistes que son provocados por el almacenamiento perivascular de gránulos de almacenamiento lisosómico alrededor de los vasos del cerebro. En otras modalidades, la terapia también puede dar como resultado ventajosamente la normalización del volumen hepático y la excreción urinaria de glucosaminoglicanos, reducción del tamaño del bazo y eventos de apnea/hipopnea, aumento de la altura y velocidad de crecimiento en sujetos prepúberes, aumento de la flexión del hombro y extensión del codo y la rodilla, y reducción de la regurgitación tricuspídea o la regurgitación pulmonar.

La administración intratecal de la presente invención puede comprender introducir la composición en el área lumbar. Cualquier administración de este tipo puede ser a través de una inyección en bolo. En dependencia de la gravedad de los síntomas y la capacidad de respuesta del sujeto a la terapia, la inyección en bolo puede administrarse una vez por semana, una vez al mes, una vez cada 6 meses o anualmente. En otras modalidades, la administración intratecal se logra mediante el uso de una bomba de infusión. Los expertos en la técnica conocen los dispositivos que pueden usarse para efectuar la administración intratecal de una composición. La composición puede administrarse por vía intratecal, por ejemplo, mediante una única inyección o infusión continua. Debe entenderse que el tratamiento de dosificación puede ser en forma de administración de dosis única o de dosis múltiples.

Como se usa en la presente descripción, el término "administración intratecal" pretende incluir suministrar una composición farmacéutica directamente en el líquido cefalorraquídeo de un sujeto, mediante técnicas que incluyen la inyección cerebroventricular lateral a través de un agujero de trépano o punción cisternal o lumbar o similares. El término "región lumbar" pretende incluir el área entre la tercera y cuarta vértebras lumbares (espalda baja) y, de forma más inclusiva, la región L2-S1 de la columna vertebral.

La administración de una composición de acuerdo con la presente invención a cualquiera de los sitios mencionados anteriormente puede lograrse mediante inyección directa de la composición o mediante el uso de bombas de infusión. Para la inyección, la composición puede formularse en soluciones líquidas, por ejemplo, en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón fosfato. Además, la enzima puede formularse en forma sólida y volver a disolverse o suspenderse inmediatamente antes de su uso. También se incluyen las formas liofilizadas. La inyección puede ser, por ejemplo, en forma de una inyección en bolo o infusión continua (por ejemplo, mediante el uso de bombas de infusión) de la enzima.

En una modalidad de la invención, el rAAV se administra mediante inyección cerebroventricular lateral en el cerebro de un sujeto. La inyección puede realizarse, por ejemplo, a través de un orificio de trépano hecho en el cráneo del sujeto. En otra modalidad, la enzima y/u otra formulación farmacéutica se administra a través de una derivación insertada quirúrgicamente en el ventrículo cerebral de un sujeto. Por ejemplo, la inyección puede realizarse en los ventrículos laterales, que son más grandes, aunque también puede realizarse la inyección en el tercer y cuarto ventrículos más pequeños. En otra modalidad más, las composiciones usadas en la presente invención se administran mediante inyección en la cisterna magna o el área lumbar de un sujeto.

Si bien los mecanismos exactos subyacentes al suministro intranasal de fármacos al CNS no se comprenden por completo, un conjunto de pruebas acumuladas demuestra que las vías que involucran los nervios que conectan los conductos nasales con el cerebro y la médula espinal son importantes. Además, las vías que involucran la vasculatura, el líquido cefalorraquídeo y el sistema linfático se han implicado en el transporte de moléculas desde la cavidad nasal al CNS. Es probable que una combinación de estas vías sea responsable, aunque puede predominar una vía, en dependencia de las propiedades del agente terapéutico, las características de la formulación y el dispositivo de suministro usado.

Los agentes terapéuticos pueden acceder rápidamente al CNS después de la administración intranasal a lo largo de las vías del nervio olfatorio que conducen desde la cavidad nasal directamente al CNS. Las vías del nervio olfatorio son un componente importante del suministro intranasal, evidenciado por el hecho de que los marcadores fluorescentes se asocian con los nervios olfatorios a medida que atraviesan la placa cribiforme (Jansson y otros, 2002), las concentraciones de fármaco en los bulbos olfatorios se encuentran generalmente entre las concentraciones más altas observadas en el CNS (Thorne y otros, 2004; Banks y otros, 2004; Graff y otros, 2005a; Nonaka y otros, 2008; Ross y otros, 2004; Ross y otros, 2008; Thorne y otros, 2008), y existe una fuerte correlación positiva entre las concentraciones en el epitelio olfatorio y los bulbos olfatorios (Dhuria y otros, 2009a).

Las vías olfatorias surgen en la porción superior de los conductos nasales, en la región olfatoria, donde las neuronas del receptor olfatorio (ORN) están intercaladas entre las células de sostén (células sustentaculares), las células con microvelosidades y las células basales. Las ORN median el sentido del olfato al transmitir información sensorial desde el entorno periférico al CNS (Clerico y otros, 2003). Debajo del epitelio, la lámina propia contiene las glándulas de Bowman que secretan moco, axones, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y tejido conectivo. Las dendritas de las ORN se extienden hacia la capa mucosa del epitelio olfatorio, mientras que los axones de estas neuronas bipolares se extienden centralmente a través de la lámina propia y a través de perforaciones en la placa cribiforme del hueso etmoides, que separa las cavidades nasal y craneal. Los axones de las ORN pasan a través del espacio subaracnoideo que contiene CSF y terminan en las células mitrales en los bulbos olfatorios. Desde allí, las proyecciones neurales se extienden a múltiples regiones del cerebro, lo que incluye el tracto olfatorio, el núcleo olfatorio anterior, la corteza piriforme, la amígdala y el hipotálamo (Buck, 2000). Además de las ORN, las neuronas quimiosensoriales localizadas en la punta anterior de la cavidad nasal en el ganglio de Grueneberg conducen a los bulbos olfatorios (Fuss y otros, 2005; Koos y otros, 2005).

Las características únicas de las ORN contribuyen a un entorno celular dinámico fundamental para el suministro intranasal al CNS. Debido al contacto directo con las toxinas en el entorno externo, las ORN se regeneran cada 3-4 semanas a partir de las células basales que residen en el epitelio olfatorio (Mackay-Sim, 2003). Las células especiales similares a las células de Schwann, denominadas células olfatorias envainadas (OEC), envuelven los axones de las ORN y tienen un papel importante en la regeneración, el recrecimiento y la remielinización axonales (Field y otros, 2003; Li y otros, 2005a; Li y otros, 2005b). Las OEC crean canales perineurales continuos llenos de líquido que, curiosamente, permanecen abiertos, a pesar de la degeneración y regeneración de las ORN (Williams y otros, 2004).

Dado el entorno único del epitelio olfatorio, es posible que los agentes terapéuticos administrados por vía intranasal alcancen el CNS a través de mecanismos de transporte extracelulares o intracelulares a lo largo de los nervios olfatorios. Los mecanismos de transporte extracelular involucran el movimiento rápido de moléculas entre las células en el epitelio nasal, lo que requiere solo de varios minutos a 30 minutos para que un fármaco alcance los bulbos olfatorios y otras áreas del CNS después de la administración intranasal (Frey II, 2002; Balin y otros, 1986). El transporte implica probablemente mecanismos de flujo másico (Thorne y otros, 2004; Thorne y otros, 2001) dentro de los canales creados por las OEC. Los fármacos también pueden ser propulsados dentro de estos canales por los cambios estructurales que se producen durante la despolarización y la propagación axonal del potencial de acción en axones adyacentes (Luzzati y otros, 2004). Los mecanismos de transporte intracelular implican la captación de moléculas en las ORN mediante difusión pasiva, endocitosis mediada por receptores o endocitosis adsorptiva,

seguida de un transporte axonal más lento, por lo que tarda varias horas o días en aparecer un fármaco en los bulbos olfatorios y otras áreas del cerebro (Baker y otros, 1986; Broadwell y otros, 1985; Kristensson y otros, 1971). Se ha demostrado el transporte intracelular en las ORN para moléculas pequeñas y lipófilas tales como partículas de oro (de Lorenzo, 1970; Gopinath y otros, 1978), sales de aluminio (Perl y otros, 1987) y para sustancias con receptores en las ORN tales como WGA-HRP (Thorne y otros, 1995; Baker y otros, 1986; Itaya y otros, 1986; Shipley, 1985). Los mecanismos intracelulares, si bien son importantes para determinados agentes terapéuticos, no es probable que sean el modo de transporte predominante hacia el CNS. Mientras que algunas moléculas grandes, tales como el péptido similar a la galanina (GALP), muestran vías de transporte saturables hacia el CNS (Nonaka y otros, 2008), para otras moléculas grandes tales como el NGF y el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I), el suministro intranasal en el cerebro no es saturable y no está mediado por receptores (Thorne y otros, 2004; Chen y otros, 1998; Zhao y otros, 2004),

Una vía importante, que a menudo se pasa por alto, que conecta los conductos nasales con el CNS involucra al nervio trigémino, que inerva el epitelio respiratorio y olfatorio de los conductos nasales y entra al CNS en la protuberancia (Clerico y otros, 2003; Graff y otros, 2003). Curiosamente, una pequeña porción del nervio trigémino también termina en los bulbos olfatorios (Schaefer y otros, 2002). La composición celular de la región respiratoria de los conductos nasales es diferente de la de la región olfatoria, con células epiteliales ciliadas distribuidas entre las células caliciformes secretoras de moco. Estas células contribuyen a los mecanismos de aclaramiento mucociliar que eliminan el moco junto con las sustancias extrañas de la cavidad nasal a la nasofaringe. El nervio trigémino transmite información sensorial desde la cavidad nasal, la cavidad oral, los párpados y la córnea, al CNS a través de la división oftálmica (V1), la división maxilar (V2) o la división mandibular (V3) del nervio trigémino (Clerico y otros, 2003; Gray, 1978). Las ramas de la división oftálmica del nervio trigémino proporcionan inervación a la mucosa nasal dorsal y la porción anterior de la nariz, mientras que las ramas de la división maxilar proporcionan inervación a las paredes laterales de la mucosa nasal. La división mandibular del nervio trigémino se extiende a la mandíbula inferior y los dientes, sin entradas neurales directas a la cavidad nasal. Las tres ramas del nervio trigémino se unen en el ganglio trigémino y se extienden hacia el centro para ingresar al cerebro al nivel de la protuberancia, y terminan en los núcleos espinales del trigémino en el tronco encefálico. Una característica única del nervio trigémino es que ingresa al cerebro desde el epitelio respiratorio de los conductos nasales en dos sitios: (1) a través del foramen lacerado anterior cerca de la protuberancia y (2) a través de la placa cribiforme cerca de los bulbos olfatorios, lo que crea puntos de entrada en las áreas cerebrales caudal y rostral después de la administración intranasal. También es probable que otros nervios que inervan la cara y la cabeza, tales como el nervio facial, u otras estructuras sensoriales en la cavidad nasal, tales como el ganglio de Grueneberg, puedan proporcionar puntos de entrada para los agentes terapéuticos aplicados por vía intranasal hacia el CNS.

Tradicionalmente, la vía de administración intranasal se ha utilizado para suministrar fármacos a la circulación sistémica a través de la absorción en los vasos sanguíneos capilares que se encuentran debajo de la mucosa nasal. La mucosa nasal es muy vascularizada y recibe su riego sanguíneo de las ramas de las arterias maxilar, oftálmica y facial, que surgen de la arteria carótida (Clerico y otros, 2003; Cauna, 1982). La mucosa olfatoria recibe sangre de pequeñas ramas de la arteria oftálmica, mientras que la mucosa respiratoria recibe sangre de una rama arterial de gran calibre de la arteria maxilar (DeSesso, 1993). La densidad relativa de los vasos sanguíneos es mayor en la mucosa respiratoria en comparación con la mucosa olfatoria, lo que hace que la primera región sea un sitio ideal para la absorción en la sangre (DeSesso, 1993). La vasculatura de la región respiratoria contiene una mezcla de endotelios continuos y fenestrados (Grevers y otros, 1987; Van Diest y otros, 1979), lo que permite que tanto moléculas pequeñas como grandes entren en la circulación sistémica después de la administración nasal.

Es posible el suministro al CNS después de la absorción en la circulación sistémica y el transporte posterior a través de la BBB, especialmente para fármacos lipófilos pequeños, que entran más fácilmente en el torrente sanguíneo y atraviesan la BBB en comparación con los agentes terapéuticos hidrófilos grandes tales como péptidos y proteínas.

Surge cada vez más evidencia que sugiere que los mecanismos que involucran canales asociados con los vasos sanguíneos, o canales perivascuales, están implicados en el suministro intranasal de fármacos al CNS. Los espacios perivascuales están limitados por la capa más externa de vasos sanguíneos y la membrana basal del tejido circundante (Pollock y otros, 1997). Estos espacios perivascuales actúan como un sistema linfático para el cerebro, donde las sustancias derivadas de las neuronas se eliminan del líquido intersticial del cerebro al ingresar a los canales perivascuales asociados con los vasos sanguíneos cerebrales. El transporte perivascular se debe a mecanismos de flujo másico, por el contrario a la difusión sola (Cserr y otros, 1981; Groothuis y otros, 2007), y las pulsaciones arteriales también son una fuerza impulsora para el transporte perivascular (Rennels y otros, 1985; Rennels y otros, 1985). Los fármacos aplicados por vía intranasal pueden moverse hacia los espacios perivascuales en los conductos nasales o después alcanzar el cerebro y la distribución generalizada observada dentro del CNS podría deberse a mecanismos de transporte perivascular (Thorne y otros, 2004).

Las vías que conectan el espacio subaracnoideo que contiene CSF, los espacios perineuriales que abarcan los nervios olfatorios y los linfáticos nasales son importantes para el drenaje del CSF y estas mismas vías proporcionan acceso para los agentes terapéuticos aplicados por vía intranasal al CSF y otras áreas del CNS. Varios estudios documentan que los marcadores inyectados en el CSF en los ventrículos cerebrales o el espacio subaracnoideo drenan hacia la parte inferior de los bulbos olfatorios en canales asociados con los nervios olfatorios que atraviesan

la placa cribiforme y alcanzan el sistema linfático nasal y los ganglios linfáticos cervicales (Bradbury y otros, 1983; Hatterer y otros, 2006; Johnston y otros, 2004a; Kida y otros, 1993; Walter y otros, 2006a; Walter y otros, 2006b). Los fármacos pueden acceder al CNS a través de estas mismas vías después de la administración intranasal, se mueven de los conductos nasales al CSF, a los espacios intersticiales del cerebro y los espacios perivascuales para su distribución por todo el cerebro. Estas vías de drenaje son significativas en varias especies animales (ovejas, conejos y ratas) y representan aproximadamente el 50 % del aclaramiento del CSF (Bradbury y otros, 1981; Boulton y otros, 1999; Boulton y otros, 1996; Cserr y otros, 1992). Las vías entre los conductos nasales y el CSF aún son importantes y funcionales en los seres humanos, como lo evidencia el hecho de que los agentes terapéuticos se suministran directamente al CSF después del suministro intranasal, sin entrar en la sangre en un grado apreciable (Born y otros, 2002). Varios estudios intranasales demuestran que los fármacos obtienen acceso directo al CSF desde la cavidad nasal, seguido de una distribución posterior al cerebro y la médula espinal. Muchas moléculas aplicadas por vía intranasal ingresan rápidamente al CSF y este transporte depende de la lipofilicidad, el peso molecular y el grado de ionización de las moléculas (Dhanda y otros, 2005; Born y otros, 2002; Kumar y otros, 1974; Sakane y otros, 1995; Sakane y otros, 1994; Wang y otros, 2007). La evaluación de la distribución en el CSF puede proporcionar información sobre el mecanismo de suministro intranasal.

El suministro óptimo al CNS a lo largo de las vías neurales se asocia con el suministro del agente al tercio superior de la cavidad nasal (Hanson y otros, 2008). Aunque puede emplearse una posición supina, otra posición para dirigirse a la región olfatoria es con la posición de "rezar a la Meca", con la cabeza hacia abajo y hacia adelante. Una posición supina con el ángulo de la cabeza a 70° o 90° puede ser adecuada para un suministro eficiente al CSF mediante el uso de un tubo insertado en las fosas nasales para suministrar el fármaco a través de la administración intranasal (van den Berg y otros, (2002)).

Para la administración intranasal de fármacos, pueden administrarse gotas nasales durante un período de 10-20 minutos en fosas nasales alternas cada 1-2 minutos para permitir que la solución se absorba en el epitelio nasal (Thorne y otros, 2004; Capsoni y otros, 2002; Ross y otros, 2004; Ross y otros, 2008; Dhuria y otros, 2009a; Dhuria y otros, 2009b; Francis y otros, 2008; Martínez y otros, 2008). Este método no invasivo no implica insertar el dispositivo en la fosa nasal. En cambio, se colocan gotas en la abertura de la fosa nasal, lo que permite que la persona inhale la gota hacia la cavidad nasal. Otros métodos de administración en individuos anestesiados implican sellar el esófago e insertar un tubo de respiración en la tráquea para evitar que ingieran la formulación nasal y eliminar los problemas relacionados con la dificultad respiratoria (Chow y otros, 1999; Chow y otros, 2001; Flidner y otros, 2006; Dahlin y otros, 2001). Puede insertarse un tubo flexible en las fosas nasales para el suministro localizado de un pequeño volumen de la solución del fármaco al epitelio respiratorio u olfatorio, en dependencia de la longitud del tubo (Chow y otros, 1999; Van den Berg y otros, 2003; van den Berg y otros, 2004a; Banks y otros, 2004; van den Berg y otros, 2002; Vyas y otros, 2006a; Charlton y otros, 2007a; Gao y otros, 2007a).

Pueden emplearse dispositivos de suministro nasal, tales como pulverizadores, goteros nasales o jeringas sin aguja, para dirigir el agente a diferentes regiones de la cavidad nasal. OptiMist™ es un dispositivo accionado por la respiración que dirige formulaciones nasales líquidas o en polvo a la cavidad nasal, lo que incluye la región olfatoria, sin deposición en los pulmones o el esófago (Djupesland y otros, 2006). También puede usarse el dispositivo ViaNase™ para dirigir un aerosol nasal al epitelio olfativo y respiratorio de la cavidad nasal. Las gotas nasales tienden a depositarse en el piso nasal y están sujetas a un rápido aclaramiento mucociliar, mientras que los aerosoles nasales se distribuyen al meato medio de la mucosa nasal (Scheibe y otros, 2008).

El agente inmunosupresor o inductor de inmunotolerancia puede administrarse por cualquier vía, lo que incluye la vía parenteral. En una modalidad, el agente inmunosupresor o inductor de inmunotolerancia puede administrarse mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, por vía oral, intratecal, intracraneal o intranasal, o mediante liberación sostenida, por ejemplo, mediante el uso de un implante subcutáneo. El agente inmunosupresor o inductor de inmunotolerancia puede disolverse o dispersarse en un vehículo portador líquido. Para la administración parenteral, el material activo puede mezclarse adecuadamente con un vehículo aceptable, por ejemplo, de la variedad de aceites vegetales, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón y similares. También pueden usarse otros vehículos parenterales tales como composiciones orgánicas que usan formulaciones parenterales de solcetal, glicerol formal y acuosas. Para la aplicación parenteral por inyección, las composiciones pueden comprender una solución acuosa de una sal soluble en agua farmacéuticamente aceptable de los ácidos activos de acuerdo con la invención, convenientemente en una concentración de 0,01-10 %, y opcionalmente, también un agente estabilizante y/o sustancias tampón en solución acuosa. Ventajosamente, las unidades de dosificación de la solución pueden encerrarse en ampollas.

La composición, por ejemplo, la composición que contiene rAAV, la composición que contiene inmunosupresores o la composición que induce inmunotolerancia, puede estar en forma de una dosis unitaria inyectable. Ejemplos de portadores o diluyentes utilizables para preparar dichas dosis inyectables incluyen diluyentes tales como agua, alcohol etílico, macrogol, propilenglicol, alcohol isoestearílico etoxilado, alcohol polioxiisoestearílico y ésteres de ácidos grasos de polioxitilensorbitán, agentes de ajuste del pH o tampones tales como citrato de sodio, acetato de sodio y fosfato de sodio, estabilizadores tales como piro-sulfito de sodio, EDTA, ácido tioglicólico y ácido tioláctico, agentes isotónicos tales como cloruro de sodio y glucosa, anestésicos locales tales como clorhidrato de procaína y clorhidrato de lidocaína. Además, pueden añadirse agentes solubilizantes y analgésicos habituales. Las inyecciones

pueden prepararse mediante la adición de dichos portadores a la enzima u otro activo, mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Un análisis detallado de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991). Las formulaciones farmacéuticamente aceptables pueden suspenderse fácilmente en vehículos acuosos e introducirse mediante agujas hipodérmicas convencionales o mediante el uso de bombas de infusión. Antes de la introducción, las formulaciones pueden esterilizarse, preferentemente, con radiación gamma o esterilización por haz de electrones.

Cuando el agente inmunosupresor o inductor de inmunotolerancia se administra en forma de un implante subcutáneo, el compuesto se suspende o disuelve en un material de dispersión lenta conocido por los expertos en la técnica, o se administra en un dispositivo que libera lentamente el material activo mediante el uso de una fuerza impulsora constante tal como una bomba osmótica. En dichos casos, es posible la administración durante un período de tiempo prolongado.

La dosis a la que se administra la composición que contiene el agente inmunosupresor o inductor de inmunotolerancia puede variar dentro de un amplio intervalo y dependerá de diversos factores tales como la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente, etc., y puede tener que ajustarse individualmente. Un intervalo posible para la cantidad que puede administrarse por día es de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 2000 mg o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2000 mg. Las composiciones que contienen el agente inmunosupresor o inductor de inmunotolerancia pueden formularse adecuadamente de modo que proporcionen dosis dentro de estos intervalos, ya sea como unidades de dosificación únicas o como unidades de dosificación múltiples. Además de contener un inmunosupresor, las formulaciones objeto pueden contener uno o más rAAV que codifican un producto génico terapéutico.

Las composiciones descritas en la presente descripción pueden emplearse en combinación con otro medicamento. Las composiciones pueden aparecer en formas convencionales, por ejemplo, aerosoles, soluciones, suspensiones o aplicaciones tópicas, o en forma liofilizada.

Las composiciones típicas incluyen un rAAV, un inmunosupresor, un potenciador de la penetración o una combinación de los mismos, y un excipiente farmacéuticamente aceptable que puede ser un portador o un diluyente. Por ejemplo, el(los) agente(s) activo(s) puede(n) mezclarse con un portador, o diluirse con un portador, o encerrarse dentro de un portador. Cuando el agente activo se mezcla con un portador, o cuando el portador sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido que actúa como vehículo, excipiente o medio para el agente activo. Algunos ejemplos de portadores adecuados son agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, aceite de ricino polihidroxietoxilado, aceite de cacahuete, aceite de oliva, gelatina, lactosa, terra alba, sacarosa, dextrina, carbonato de magnesio, azúcar, ciclodextrina, amilosa, estearato de magnesio, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, ácido esteárico o éteres de alquilo inferior de celulosa, ácido silícico, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de pentaeritritol, polioxietileno, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona. De manera similar, el portador o diluyente puede incluir cualquier material de liberación sostenida conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o mezclado con una cera.

Las formulaciones pueden mezclarse con agentes auxiliares que no reaccionen de forma perjudicial con el agente o los agentes activos. Dichos aditivos pueden incluir agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, sal para influir en la presión osmótica, tampones y/o agentes conservantes de sustancias colorantes, agentes edulcorantes o agentes saborizantes. Las composiciones también pueden esterilizarse si se desea.

Si se usa un portador líquido, la preparación puede estar en forma de un líquido tal como una suspensión o solución líquida acuosa. Los solventes o vehículos aceptables incluyen agua esterilizada, solución de Ringer o una solución salina acuosa isotónica.

El(los) agente(s) puede(n) proporcionarse como un polvo adecuado para la reconstitución con una solución apropiada como se describió anteriormente. Ejemplos de estos incluyen polvos liofilizados, secados por rotación o secados por pulverización, polvos amorfos, gránulos, precipitados o partículas. La composición puede contener opcionalmente estabilizadores, modificadores del pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de los mismos. Una forma de dosificación unitaria puede estar en contenedores individuales o en contenedores multidosis.

Las composiciones contempladas por la presente invención pueden incluir, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en una forma de liberación prolongada para proporcionar un almacenamiento prolongado y/o efecto de suministro, por ejemplo, mediante el uso de polímeros biodegradables, por ejemplo, polilactida-poliglicólido. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos).

Las nanopartículas poliméricas, por ejemplo, compuestas por un núcleo hidrófobo de ácido poliláctico (PLA) y una cubierta hidrófila de metoxi-poli(etilenglicol) (MPEG), pueden tener una mejor solubilidad y direccionamiento al CNS.

Las diferencias regionales en el direccionamiento entre las formulaciones de microemulsión y de nanopartículas pueden deberse a diferencias en el tamaño de las partículas.

Los liposomas son estructuras muy simples que consisten en una o más bicapas lipídicas de lípidos anfífilos, es decir, fosfolípidos o colesterol. El resto lipófilo de las bicapas gira sobre sí y crea un entorno hidrófobo interno en la membrana. Los liposomas son portadores de fármacos adecuados para algunos fármacos lipófilos que pueden asociarse con las partes no polares de las bicapas lipídicas si se ajustan en tamaño y geometría. El tamaño de los liposomas varía de 20 nm a unos pocos μm .

Las micelas mixtas son estructuras detergentes eficientes que se componen de sales biliares, fosfolípidos, tri, di y monoglicéridos, ácidos grasos, colesterol libre y micronutrientes liposolubles. Como se conoce que los fosfolípidos de cadena larga forman bicapas cuando se dispersan en agua, la fase preferida de los análogos de cadena corta es la fase micelar esférica. Una solución micelar es un sistema termodinámicamente estable formado espontáneamente en agua y solventes orgánicos. La interacción entre las micelas y los fármacos hidrófobos/lipófilos conduce a la formación de micelas mixtas (MM), también denominadas micelas deglutidas. En el cuerpo humano, incorporan compuestos hidrófobos con baja solubilidad en agua y actúan como depósito de productos de la digestión, por ejemplo, monoglicéridos.

Las micropartículas lipídicas incluyen nano y microesferas lipídicas. Las microesferas se definen generalmente como pequeñas partículas esféricas fabricadas de cualquier material que tengan un tamaño de aproximadamente 0,2 a 100 μm . Las esferas más pequeñas por debajo de 200 nm se denominan generalmente nanoesferas. Las microesferas lipídicas son microemulsiones de aceite/agua homogéneas similares a las emulsiones de grasas disponibles comercialmente y se preparan mediante un procedimiento de sonicación intensiva o métodos de emulsificación a alta presión (métodos de trituración). El tensioactivo natural lecitina reduce la tensión superficial del líquido, por lo que actúa como un emulsionante para formar una emulsión estable. La estructura y composición de las nanoesferas lipídicas es similar a la de las microesferas lipídicas, pero con un diámetro menor.

Las nanopartículas poliméricas sirven como portadores para una amplia variedad de ingredientes. Los componentes activos pueden estar disueltos en la matriz polimérica o atrapados o adsorbidos sobre la superficie de la partícula. Los polímeros adecuados para la preparación de nanopartículas orgánicas incluyen derivados de celulosa y poliésteres tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y su copolímero. Debido a su pequeño tamaño, su gran relación área superficial/volumen y la posibilidad de funcionalización de la interfaz, las nanopartículas poliméricas son sistemas portadores y de liberación ideales. Si el tamaño de partícula es inferior a 50 nm, muchas capas de barrera biológicas y también sintéticas ya no las reconocen como partículas, sino que actúan de forma similar a sistemas molecularmente dispersos.

Por tanto, la composición de la invención puede formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida, controlada o retardada, o cualquier combinación de las mismas, del agente activo después de la administración al individuo mediante el empleo de procedimientos bien conocidos en la técnica. En una modalidad, la enzima está en una solución isotónica o hipotónica. En una modalidad, para las enzimas que no son solubles en agua, puede emplearse un vehículo de suministro basado en lípidos, por ejemplo, una microemulsión tal como la descrita en el documento WO 2008/049588 o liposomas.

En una modalidad, la preparación puede contener un agente, disuelto o suspendido en un portador líquido, tal como un vehículo acuoso, para su aplicación en aerosol. El portador puede contener aditivos tales como agentes solubilizantes, por ejemplo, propilenglicol, tensioactivos, potenciadores de la absorción tales como lecitina (fosfatidilcolina) o ciclodextrina, o conservantes tales como parabenos. Por ejemplo, además de la solubilidad, el suministro eficiente al CNS después de la administración intranasal puede depender de la permeabilidad de la membrana. Para las enzimas en las que el transporte paracelular se ve obstaculizado debido al tamaño y la polaridad, la mejora de la permeabilidad de la membrana puede potenciar los mecanismos extracelulares de transporte al CNS a lo largo de los nervios olfatorio y trigémino. Un enfoque para modificar la permeabilidad de la membrana dentro del epitelio nasal es mediante el uso de potenciadores de la penetración, tales como tensioactivos, por ejemplo, lauroilcarnitina (LC), sales biliares, lípidos, ciclodextrinas, polímeros o modificadores de la unión estrecha.

Generalmente, los agentes activos se dispensan en forma de dosificación unitaria que incluye el ingrediente activo junto con un portador farmacéuticamente aceptable por dosificación unitaria. Generalmente, las formas de dosificación adecuadas para la administración nasal incluyen de aproximadamente 125 μg a aproximadamente 125 mg, por ejemplo, de aproximadamente 250 μg a aproximadamente 50 mg, o de aproximadamente 2,5 mg a aproximadamente 25 mg, de los compuestos mezclados con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Las formas de dosificación pueden administrarse diariamente o más de una vez al día, tal como dos o tres veces al día. De forma alternativa, las formas de dosificación pueden administrarse con menos frecuencia que a diario, tal como en días alternos, o semanalmente, si el médico que prescribe lo considera aconsejable.

Ejemplo I

Suministro de genes de iduronidasa mediado por vectores de AAV en un modelo murino de mucopolisacaridosis tipo I: comparación de diferentes vías de suministro al CNS

La mucopolisacaridosis tipo I (MPS I) es un trastorno metabólico hereditario provocado por la deficiencia de la enzima lisosómica alfa-L-iduronidasa (IDUA). La acumulación sistémica y anormal de glucosaminoglicanos se asocia con retardo del crecimiento, organomegalia, displasia esquelética y enfermedad cardiopulmonar. Las personas con la forma más grave de la enfermedad (síndrome de Hurler) padecen de neurodegeneración, retraso mental y muerte prematura. Los dos tratamientos actuales para la MPS I (trasplante de células madre hematopoyéticas y terapia de reemplazo enzimático) no pueden tratar eficazmente todas las manifestaciones de la enfermedad en el sistema nervioso central (CNS).

Con respecto a la terapia génica, se demostró previamente que el suministro intravascular de AAV9 en ratones adultos no logra un direccionamiento neuronal directo generalizado (ver Foust y otros, 2009). El trabajo previo también mostró que la inyección directa de AAV8-IDUA en el CNS de ratones adultos con deficiencia de IDUA dio como resultado una baja frecuencia o un bajo nivel de expresión del transgén (ver la Figura 18). Los siguientes ejemplos, que usan un modelo preclínico para el tratamiento de la MPS1, demuestran sorprendentemente que la inyección directa de AAV9-IDUA en el CNS de ratones adultos inmunocompetentes con deficiencia de IDUA dio como resultado una expresión y actividad de la enzima IDUA que es igual o superior a la expresión y actividad de la enzima IDUA en ratones adultos de tipo silvestre (ver la Figura 15, *infra*).

Métodos

Preparación de AAV9-IDUA. El constructo del vector AAV-IDUA (MCI) se ha descrito previamente (Wolf y otros, 2011) (promotor mCags). El ADN plasmídico de AAV-IDUA se empaquetó en viriones de AAV9 en el centro de vectores de la Universidad de la Florida, con un rendimiento de un título de 3×10^{13} genomas de vector por mililitro.

Infusiones ICV. Se anestesiaron ratones adultos *Idua*^{-/-} mediante el uso de un cóctel de ketamina y xilazina (100 mg de ketamina + 10 mg de xilazina por kg) y se colocaron en un marco estereotáctico. Se infundieron diez microlitros de AAV9-IDUA en el ventrículo lateral derecho (coordenadas estereotácticas AP 0,4, ML 0,8, DV 2,4 mm desde el bregma) mediante el uso de una jeringa Hamilton. Los animales se devolvieron a sus jaulas sobre almohadillas térmicas para su recuperación.

Infusiones intratecales. Las infusiones en ratones adultos jóvenes se llevaron a cabo mediante la inyección de 10 μ l de una solución que contenía el vector de AAV entre las vértebras L5 y L6 20 minutos después de la inyección intravenosa de 0,2 ml de manitol al 25 %.

Inducción de inmunotolerancia. Se inyectaron ratones con deficiencia de IDUA recién nacidos a través de la vena temporal facial con 5 μ l que contenían 5,8 μ g de proteína iduronidasa recombinante (Aldurazyme), y después los animales se devolvieron a su jaula.

Inmunosupresión con ciclofosfamida. Para la inmunosupresión, a los animales se les administró ciclofosfamida una vez por semana a una dosis de 120 mg/kg, con inicio un día después de la infusión con el vector AAV9-IDUA.

Animales. Los animales se anestesiaron con ketamina/xilazina (100 mg de ketamina + 10 mg de xilazina por kg) y se perfundieron por vía transcardial con 70 ml de PBS antes del sacrificio. Los cerebros se cosecharon y se microdisecionaron en hielo en cerebelo, hipocampo, cuerpo estriado, corteza y tronco encefálico/tálamo ("resto"). Las muestras se congelaron en hielo seco y después se almacenaron a -80 °C. Las muestras se descongelaron y homogeneizaron en 1 ml de PBS mediante el uso de un mortero motorizado y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 %. La actividad de IDUA se determinó por un ensayo fluorométrico mediante el uso de 4MU-iduronida como sustrato. La actividad se expresa en unidades (por ciento de sustrato convertido en producto por minuto) por mg de proteína según se determina mediante el ensayo de Bradford (BioRad).

Tejidos. Los homogeneizados de tejido se clarificaron por centrifugación durante 3 minutos a 13 000 rpm mediante el uso de una centrífuga de mesa Eppendorf modelo 5415D (Eppendorf) y se incubaron durante la noche con proteinasa K, ADNasa1 y ARNasa. La concentración de GAG se determinó mediante el uso del ensayo de glucosaminoglicano sulfatado Blyscan (Accurate Chemical) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

La Figura 1 muestra el diseño experimental para ratones con deficiencia de iduronidasa a los que se les administró AAV por vía intracerebroventricular (ICV) o por vía intratecal (IT). Para prevenir la respuesta inmunitaria, los animales se inmunosuprimieron con ciclofosfamida (CP), se les indujo inmunotolerancia al nacer mediante la administración intravenosa de proteína iduronidasa humana (aldurazyme), o las inyecciones se llevaron a cabo en ratones inmunodeficientes NOD-SCID que también tenían deficiencia de iduronidasa. Los animales se sacrificaron

en el tiempo indicado después del tratamiento, los cerebros se microdisecionaron y los extractos se analizaron para determinar la actividad de iduronidasa.

La Figura 2 ilustra los datos para animales inmunodeficientes con deficiencia de IDUA, inyectados ICV con el vector AAV-IDUA. Esos animales mostraron altos niveles de expresión de IDUA (de 10 a 100 veces la del tipo silvestre) en todas las áreas del cerebro, con el nivel más alto observado en el tronco encefálico y el tálamo ("resto").

Los animales inmunosuprimidos a los que se les administró el vector de AAV por vía ICV tenían un nivel relativamente más bajo de enzima en el cerebro en comparación con los animales inmunodeficientes (Figura 3). Tenga en cuenta que la inmunosupresión puede haberse visto comprometida en estos animales porque la CP se retiró 2 semanas antes del sacrificio debido a salud deficiente.

La Figura 4 muestra los datos para animales inmunosuprimidos a los que se les administró el vector de AAV por la vía IT. Los animales con inducción de inmunotolerancia a los que se administró ICV el vector de AAV mostraron una actividad de IDUA generalizada en todas las partes del cerebro (Figura 5), similar a la observada en los animales inmunodeficientes, lo que indica la eficacia del procedimiento de inducción de inmunotolerancia.

La Figura 6 es una compilación de todos los niveles medios de actividad de IDUA para la comparación directa, y la Figura 7 son los datos agrupados de acuerdo con el área del cerebro.

El material de almacenamiento de GAG se analizó en los diferentes cortes de cerebro para los cuatro grupos de prueba. Para cada grupo, la media de cada porción del cerebro se muestra a la izquierda, los valores para cada uno de los animales individuales se muestran a la derecha (Figura 8). Los animales con deficiencia de IDUA (extremo izquierdo) contenían altos niveles de GAG en comparación con los animales de tipo silvestre (barra magenta). Los niveles de GAG fueron como los de tipo silvestre o más bajos que en el tipo silvestre para todas las porciones del cerebro en todos los grupos de animales tratados con AAV. Los niveles de GAG fueron ligeramente, aunque no significativamente más altos que los de tipo silvestre en la corteza y el tronco encefálico de los animales a los que se les administró AAV9-IDUA por vía intratecal.

Conclusiones

Los resultados muestran una distribución alta y generalizada de IDUA en el cerebro independientemente de la vía de suministro (ICV o IT), aunque la expresión de IDUA en el cuerpo estriado y el hipocampo fue menor en los animales inyectados IT frente a ICV. Parece haber una respuesta inmunitaria ya que los ratones inmunodeficientes tienen niveles más altos de expresión que los ratones inmunocompetentes. Con respecto a la inyección ICV, cuando la CP se retiró tempranamente, la expresión de IDUA es menor. Además, la inducción de inmunotolerancia fue eficaz para restaurar altos niveles de actividad enzimática. Además, los niveles de GAG se retornaron a la normalidad en todos los grupos experimentales de ratones tratados.

Ejemplo II

Métodos

Preparación de AAV9-IDUA. El plásmido de AAV-IDUA se empaquetó en viriones AAV9 en el centro de vectores de la Universidad de Florida o en el centro de vectores de la Universidad de Pensilvania, con un rendimiento de un título de $1-3 \times 10^{13}$ genomas del vector por mililitro.

Infusiones ICV. Ver el Ejemplo I.

Infusiones intratecales. Ver el Ejemplo I.

Inducción de inmunotolerancia. Como en el Ejemplo I excepto: para múltiples inducciones de tolerancia, se inyectaron ratones recién nacidos con deficiencia de IDUA la primera dosis de Aldurazyme en la vena temporal facial, seguida de 6 inyecciones semanales administradas por vía intraperitoneal.

Inmunosupresión con ciclofosfamida. Ver el Ejemplo I.

Animales. Los animales se anestesiaron con ketamina/xilazina (100 mg de ketamina + 10 mg de xilazina por kg) y se perfundieron por vía transcardial con 70 ml de PBS antes del sacrificio. Los cerebros se cosecharon y se microdisecionaron en hielo en cerebelo, hipocampo, cuerpo estriado, corteza y tronco encefálico/tálamo ("resto"). Las muestras se congelaron en hielo seco y después se almacenaron a -80 °C.

Actividad tisular de IDUA. Las muestras de tejido se descongelaron y homogeneizaron en solución salina en un homogeneizador de tejidos. Los homogeneizados de tejido se clarificaron mediante centrifugación a 15 000 rpm en una centrífuga Eppendorf de mesa a 4 °C durante 15 minutos. Se recolectaron lisados de tejido (sobrenadante) y se analizaron para determinar la actividad de IDUA y los niveles de almacenamiento de GAG.

Niveles de GAG en tejidos. Los lisados de tejido se incubaron durante la noche con proteinasa K, ARNasa y ADNasa. Los niveles de GAG se analizaron mediante el uso del ensayo de glucosaminoglicanos sulfatados Blyscan de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 5 Copias de vector de IDUA. Se usaron homogeneizados de tejido para el aislamiento de ADN y la QPCR posterior, como se describe en Wolf y otros (2011).

Resultados

- 10 La Figura 9 ilustra el diseño experimental y los grupos. A los animales se les administró el vector AAV9-IDUA mediante infusión intracerebroventricular (ICV) o intratecal (IT). La administración del vector se llevó a cabo en ratones inmunodeficientes (ID) NOD-SCID que también tenían deficiencia de IDUA, o en ratones con deficiencia de IDUA que se inmunosuprimieron con ciclofosfamida (CP) o se les indujo inmunotolerancia al nacer mediante inyecciones únicas o múltiples de proteína iduronidasa humana (Aldurazyme). Los tiempos de tratamiento con vector y el sacrificio son los indicados en la Figura 9. Todas las administraciones del vector se llevaron a cabo en animales adultos con edades comprendidas entre 3-4,5 meses. Se inyectaron a los animales 10 µl de vector a una dosis de 3×10^{11} genomas de vector por 10 microlitros.

- 20 La Figura 10 muestra las actividades de la enzima IDUA en ratones inmunodeficientes con deficiencia de IDUA infundidos por vía intracraneal. Se observaron altos niveles de actividad enzimática en todas las áreas del cerebro, que variaron de 30 a 300 veces más altos que los niveles de tipo silvestre. Las mayores expresiones enzimáticas se observaron en el tálamo y el tronco encefálico, y en el hipocampo.

- 25 Los animales que se inyectaron por vía intracraneal y se inmunosuprimieron con ciclofosfamida (CP) demostraron niveles significativamente más bajos de actividad enzimática que otros grupos (Figura 11). Sin embargo, la administración de CP en este caso tuvo que retirarse 2 semanas antes del sacrificio debido a salud deficiente de los animales.

- 30 Los niveles de enzima IDUA en animales con inducción de tolerancia al nacer con proteína IDUA (Aldurazyme) y administrados por vía intracraneal con el vector se representan en la Figura 12. Todos los animales mostraron niveles altos de enzimas en todas las partes del cerebro, que variaron de 10 a 1000 veces más altos que los niveles de tipo silvestre, similares a los niveles logrados en animales inmunodeficientes, lo que indica la eficacia del procedimiento de inducción de inmunotolerancia.

- 35 La Figura 13 representa los niveles de enzima IDUA en ratones que se inyectaron por vía intratecal y se les administró CP semanalmente. Se observaron niveles elevados de IDUA en todas las partes del cerebro, especialmente en el cerebelo y la médula espinal. Los niveles de enzima fueron los más bajos en el cuerpo estriado y el hipocampo con actividades a los niveles de los de tipo silvestre.

- 40 Se indujo tolerancia a ratones con deficiencia de IDUA con Aldurazyme como se describió, y se les inyectó el vector por vía intratecal (Figura 14). Existió una actividad generalizada de la enzima IDUA en todas las partes del cerebro, con los niveles más altos de actividad en el tronco encefálico y el tálamo, el bulbo olfatorio, la médula espinal y el cerebelo. De manera similar a los datos de la Figura 13, los niveles más bajos de actividad enzimática se observaron en el cuerpo estriado, la corteza y el hipocampo.

- 45 Los animales de control inmunocompetentes con deficiencia de IDUA se infundieron con el vector por vía intratecal, sin inmunosupresión o inducción de inmunotolerancia (Figura 15). Los resultados indican que aunque las actividades de las enzimas fueron como los niveles de tipo silvestre o ligeramente más altas, son significativamente más bajas que las observadas en los animales que se sometieron a inmunomodulación. Las disminuciones en los niveles de enzima fueron especialmente significativas en el cerebelo, bulbo olfatorio y tálamo y tronco encefálico, áreas que expresaron los niveles más altos de enzima en los animales inmunomodulados.

- 50 Los animales se analizaron para determinar el material de almacenamiento de GAG, como se muestra en la Figura 16. Todos los grupos demostraron aclaramiento del almacenamiento de GAG, con niveles de GAG similares a los observados en los animales de tipo silvestre. Los animales que se inmunosuprimieron y se inyectaron con el vector AAV9-IDUA por vía intratecal tenían niveles de GAG en la corteza que eran ligeramente más altos que los de tipo silvestre, pero aún mucho más bajos que los ratones con deficiencia de IDUA no tratados.

- 55 La presencia del vector AAV9-IDUA en animales en los que se indujo inmunotolerancia y se inyectaron con el vector por vía intracraneal o intratecal se evaluó mediante QPCR, como se ilustra en la Figura 16. Las copias de IDUA por célula fueron mayores en los animales infundidos por vía intracraneal en comparación con los animales infundidos por vía intratecal, lo cual es consistente con el nivel más alto de actividad enzimática observado en los animales inyectados por vía intracraneal.

65

Conclusiones

Se observaron niveles altos, generalizados y terapéuticos de IDUA en todas las áreas del cerebro después de las vías intracerebroventriculares e intratecales de administración de AAV9-IDUA en ratones adultos. Las actividades enzimáticas se restauraron a los niveles de tipo silvestre o ligeramente superiores en animales inmunocompetentes con deficiencia de IDUA infundidos con AAV-IDUA por vía intratecal. Se observaron niveles significativamente más altos de enzima IDUA para ambas vías de inyección del vector en animales con inducción de inmunotolerancia al nacer mediante la administración de proteína IDUA.

Ejemplo III

Se anestesiaron ratones adultos inmunocompetentes con deficiencia de IDUA (12 semanas de edad) con ketamina/xilazina, seguido de la infusión intranasal del vector AAV9-IDUA. El vector se administró mediante la aplicación de ocho gotas de 3 µl con una micropipeta en la cavidad intranasal, con alternancia entre fosas nasales, a intervalos de 2 minutos entre cada aplicación. Se administró un total de $2,4-7 \times 10^{11}$ genomas de vector a cada animal adulto, en dependencia de la fuente del vector. Para suprimir la respuesta inmunitaria del ratón a la IDUA humana producida por el vector AAV9-IDUA, los animales se inmunosuprimieron con 120 mg/kg de ciclofosfamida administrada semanalmente, con inicio el día después de la administración del vector. Sin embargo, la inmunosupresión en sujetos humanos es opcional y el experto en la técnica, de acuerdo con la buena/estándar práctica médica, sabría cuándo emplearla. Los ratones se sacrificaron a las 12 semanas después de la infusión del vector, los animales se analizaron para determinar la expresión de la enzima IDUA y las copias del vector en el cerebro (Figuras 19 y 20).

Ejemplo IV

A ratones con deficiencia de iduronidasa, un modelo para la mucopolisacaridosis humana tipo I (MPS I), se les administró aproximadamente 10^{11} copias del vector de AAV9-IDUA por vía intranasal. Cuatro semanas más tarde, los animales se sacrificaron y el cerebro se microdisecionó y se extrajo para el análisis de la enzima iduronidasa. Como se muestra en la Figura 22 (medias $\pm$ d.e. a la izquierda, animales individuales a la derecha), se observó un alto nivel de actividad de la enzima IDUA (casi 100 veces mayor que la del tipo silvestre) en el bulbo olfatorio, con niveles de enzima de tipo silvestre observados en todas las demás áreas del cerebro. La Figura 23 muestra la actividad de GAG.

Animales tratados de manera similar se sacrificaron y los cortes de tejido se tiñeron para determinar la presencia de la proteína IDUA humana mediante el uso de un anticuerpo anti-IDUA. Como se muestra en la Figura 24, se observó una tinción robusta de la proteína IDUA en el epitelio nasal y en el bulbo olfatorio de los cuatro animales tratados con vector intranasal a la izquierda, mientras que no se observó tinción en los animales de control normales no administrados o con deficiencia de IDUA a la derecha. No se observó tinción en otras partes de los cerebros (hipocampo, cerebelo, corteza, cuerpo estriado, tálamo y tronco encefálico) de los animales tratados con AAV-MCI, lo que demuestra que la transducción se limitó al bulbo olfatorio y al epitelio nasal.

Los animales se trataron por vía intranasal con aproximadamente 10^{11} genomas de vector del vector AAV9-GFP como sistema indicador para identificar la localización de la célula transducida). Los animales se sacrificaron dos semanas más tarde, se recolectaron los tejidos y se tiñeron los cortes para determinar la expresión de GFP mediante el uso de un anticuerpo anti-GFP (verde) junto con tinción DAPI (azul) para identificar los núcleos celulares (Figura 25). Se observó una tinción robusta de la proteína GFP tanto en el epitelio olfatorio (los dos paneles a la izquierda) como en el bulbo olfatorio (los dos paneles superiores) de los animales tratados en comparación con los controles no tratados (paneles a la derecha para el epitelio olfatorio y panel inferior para el bulbo olfatorio). No se observó tinción de GFP en ninguna otra parte del cerebro. Estos resultados son consistentes con los resultados de la tinción de IDUA, lo que demuestra que la transferencia y expresión génica mediada por AAV se limitó al epitelio nasal y al bulbo olfatorio después de la administración intranasal del vector AAV9-MCI. Estos resultados implican la difusión de IDUA expresada a altos niveles en el prosencéfalo como el mecanismo por el cual se logran niveles de tipo silvestre de IDUA en todas las áreas del cerebro después de la administración intranasal del vector AAV9-MCI. Este enfoque para lograr un alto nivel de expresión de proteínas terapéuticas en el prosencéfalo mediante la administración de un vector de AAV por vía intranasal no invasiva con posterior difusión por todo el cerebro es aplicable no solo al tratamiento de la MPS y enfermedades metabólicas relacionadas, sino también al tratamiento de otros trastornos neurológicos más comunes tales como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo V

La mucopolisacaridosis tipo II (MPS II; síndrome de Hunter) es una enfermedad de almacenamiento lisosómico hereditaria recesiva ligada al cromosoma X provocada por la deficiencia de iduronato-2-sulfatasa (IDS) y la acumulación posterior de glucosaminoglicanos (GAG) dermatán y heparán sulfato. Los individuos afectados muestran un rango en la gravedad de manifestaciones físicas, neurológicas y reducción de la esperanza de vida. Por ejemplo, los individuos afectados muestran un rango en la gravedad de manifestaciones tales como organomegalia, displasias esqueléticas, obstrucción cardiopulmonar, déficit neurocognitivo y reducción de la esperanza de vida. No

existe cura para la MPS II en este momento. El estándar actual de atención es la terapia de reemplazo enzimático (ELAPSRASE; idursulfasa), que se usa para controlar la progresión de la enfermedad. Sin embargo, la terapia de reemplazo enzimático (ERT) no da como resultado una mejoría neurológica. Dado que el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) no ha mostrado beneficios neurológicos para la MPS II, actualmente no existe un recurso clínico para los pacientes que muestran manifestaciones neurológicas de esta enfermedad y se necesitan desesperadamente nuevas terapias.

Los vectores AAV9 se desarrollan para el suministro de la secuencia codificante de IDS humana (AAV9-hIDS) en el sistema nervioso central de ratones con MPS II para restaurar los niveles de IDS en el cerebro y prevenir la aparición de déficits neurocognitivos en los animales tratados (Figura 27A). En particular, se generó una serie de vectores que codifican la IDS humana con o sin el factor modificador de sulfatasa 1 humano (SUMF-1), requerido para la activación del sitio activo de la sulfatasa. En estos experimentos se usaron tres vías de administración: intratecal (IT) (Figuras 28-29), intracerebroventricular (ICV) (Figuras 30A-D) e intravenosa (IV) (Figuras 28-29). No se encontró una diferencia significativa en el nivel de enzima entre los ratones que se trataron con el vector AAV9 que transduce hIDS sola y los ratones que se trataron con el vector AAV9 que codifica IDS humana y SUMF-1, independientemente de la vía de administración. NOD.SCID (IDS Y+) y C57BL/6 (IDS Y+) administrados por vía IT no mostraron una actividad elevada de IDS en el cerebro y la médula espinal en comparación con los animales no tratados, mientras que el plasma mostró niveles diez veces más altos (NOD.SCID) y 150 veces (C57BL/6) más altos que los de los animales no tratados. Los ratones con deficiencia de IDS a los que se administró por vía intravenosa AAV9-hIDS mostraron actividades de IDS en todos los órganos que eran comparables a las de tipo silvestre. Además, el plasma de los animales inyectados por vía IV mostró una actividad enzimática 100 veces más alta que la del tipo silvestre. Los ratones con deficiencia de IDS a los que se les administró AAV9-hIDUA ICV mostraron actividades de IDS comparables a las de tipo silvestre en la mayoría de las áreas del cerebro y tejidos periféricos, mientras que algunas porciones del cerebro mostraron una actividad de dos a cuatro veces más alta que la de tipo silvestre. Además, la actividad de IDS en plasma fue 200 veces más alta que la de tipo silvestre. Sorprendentemente, la actividad de la enzima IDS en el plasma de todos los animales tratados mostró persistencia durante al menos 12 semanas después de la inyección; por lo tanto, la enzima IDS no fue inmunogénica al menos en el fondo murino C57BL/6. Se llevaron a cabo pruebas neuroconductuales adicionales mediante el uso del laberinto de Barnes para diferenciar los déficits neurocognitivos de los animales con MPS II no tratados de los de las crías de la misma camada de tipo silvestre. Se encontró que la capacidad de aprendizaje de los animales afectados es distintivamente más lenta que la observada en las crías de la misma camada. Por tanto, el laberinto de Barnes se usa para abordar el beneficio de estas terapias en el modelo murino de MPS II (Figuras 31A-B y 32). Estos resultados indican un potencial de beneficio terapéutico de la transferencia del gen de IDS humana mediada por AAV9 al CNS para prevenir la deficiencia neurológica en la MPS I.

En resumen, la inyección intracerebroventricular (ICV) de AAV9-hIDS dio como resultado una corrección sistémica de la deficiencia de la enzima IDS, lo que incluye los niveles de IDS de tipo silvestre en el cerebro. El suministro de conjunto de hIDS con hSUMF-1 no aumentó la actividad de IDS en los tejidos. La expresión de hIDS no fue inmunogénica en ratones C57BL/6 WT y con MPS II.

Ejemplo VI

La mucopolisacaridosis tipo I (MPS I) es una enfermedad metabólica autosómica recesiva hereditaria provocada por la deficiencia de α -L-iduronidasa (IDUA), que da como resultado la acumulación de heparina y glucosaminoglicanos de dermatán sulfato (GAG). Los individuos con la forma más grave de la enfermedad (síndrome de Hurler) padecen de neurodegeneración, retraso mental y muerte a los 10 años de edad. Los tratamientos actuales para esta enfermedad incluyen el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (HSCT) y la terapia de reemplazo enzimático (ERT). Sin embargo, estos tratamientos no son suficientemente eficaces para abordar las manifestaciones de la enfermedad en el CNS.

El objetivo es mejorar la terapia para la MPS I grave al complementar la ERT y el HSCT actuales con la transferencia del gen IDUA al CNS, lo que previene de esta manera las manifestaciones neurológicas de la enfermedad. En este estudio, se sometió a prueba la capacidad de los serotipos 9 y rh10 de AAV (AAV9 y AAVrh10) administrados por vía intravenosa para cruzar la barrera hematoencefálica para el suministro y expresión del gen IDUA en el CNS (Figura 33). Se infundieron por vía intravenosa a través de la vena de la cola animales con MPS I adultos de 4-5 meses con un vector AAV9 o AAVrh10 que codifican el gen IDUA humano. Se recolectaron muestras de sangre y orina semanalmente hasta que los animales se sacrificaron 10 semanas después de la inyección. Las actividades de IDUA en plasma en los animales tratados fueron cerca de 1000 veces más altas que las de los controles heterocigotos 3 semanas después de la inyección (Figura 34). Se analizaron los cerebros, médulas espinales y órganos periféricos para determinar la actividad de IDUA, el aclaramiento de la acumulación de GAG y la inmunofluorescencia de IDUA de los cortes de tejido (Figuras 34-36). Los animales tratados demostraron una restauración generalizada de la actividad de la enzima IDUA en todos los órganos, lo que incluye el CNS. Estos datos demuestran la eficacia de la infusión sistémica de los vectores AAV9 y AAVrh10 para contrarrestar las manifestaciones de la MPS I en el CNS.

Ejemplo VII

La mucopolisacaridosis tipo I (MPS I) es una enfermedad metabólica hereditaria progresiva multisistémica, provocada por la deficiencia de la α -L-iduronidasa (IDUA). La forma más grave de esta enfermedad (síndrome de Hurler) da como resultado la muerte a los 10 años de edad. Los tratamientos actuales para esta enfermedad son ineficaces en el tratamiento de la enfermedad en el CNS debido a la incapacidad de las enzimas lisosómicas para atravesar la barrera hematoencefálica. El objetivo es complementar la terapia actual y tratar las manifestaciones de la enfermedad en el CNS mediante el suministro de genes mediado por AAV y la expresión de IDUA.

Se adoptó un enfoque no invasivo y eficaz para el tratamiento de la enfermedad en el CNS mediante la administración intranasal de un vector AAV9 que codifica la IDUA. Se les indujo inmunotolerancia a ratones adultos con deficiencia de IDUA al nacer con iduronidasa humana, para prevenir la respuesta inmunitaria anti-IDUA, y a los 3 meses de edad se les infundió por vía intranasal un vector AAV9-IDUA regulado por CAGS (potenciador de CMV/promotor de β -actina/intrón de globina). Los animales sacrificados 3 meses después de la infusión mostraron niveles de actividad enzimática de IDUA que eran 100 veces más altos que los de tipo silvestre en el bulbo olfatorio, con los niveles de enzima de tipo silvestre restaurados en todas las demás partes del cerebro (Figura 37). El tratamiento intranasal con AAV9-IDUA también dio como resultado la reducción de los materiales de almacenamiento de GAG en los tejidos en todas las partes del cerebro (Figura 38). Las pruebas neurocognitivas mediante el uso del laberinto de Barnes demostraron que los ratones con deficiencia de IDUA tratados no eran diferentes de los animales de control normales, mientras que los ratones con deficiencia de IDUA no tratados mostraron un déficit de aprendizaje significativo (Figura 40). Los animales heterocigotos no afectados mostraron un rendimiento mejorado en esta prueba, mientras que los ratones con MPS I mostraron un déficit en la localización del escape. Sorprendentemente, los ratones con MPS I tratados por vía intranasal con AAV9-IDUA mostraron un comportamiento similar al de los controles heterocigotos, lo que demuestra la prevención del déficit neurocognitivo observado en los animales con MPS I no tratados (Figura 40D).

Se observó una fuerte tinción de inmunofluorescencia de IDUA en cortes de tejido del epitelio nasal y bulbo olfatorio, pero no se observó tinción en otras porciones del cerebro (Figuras 39A-B). Esto indica que la distribución generalizada de la enzima IDUA más probablemente fue el resultado de la difusión de la enzima desde los sitios de transducción y expresión de IDUA en el bulbo olfatorio y el epitelio nasal hacia áreas más profundas del cerebro. Para aumentar el acceso, el suministro y la distribución del vector por todo el cerebro, los animales con deficiencia de IDUA se trataron previamente con infusiones intranasales de un potenciador de la absorción. En diferentes puntos temporales después del pretratamiento, se infundieron los animales por vía intranasal con el vector AAV9 o AAVrh10 que codifica la IDUA. Los animales se sacrificaron 2 meses después de la infusión, los cerebros se microdisecionaron y se analizaron para determinar la actividad enzimática de IDUA, el aclaramiento de glucosaminoglicanos y la tinción de inmunofluorescencia para IDUA y GFP. Esta nueva estrategia no invasiva para la administración intranasal de AAV9-IDUA podría usarse potencialmente para tratar las manifestaciones en el CNS de la MPS I y otras enfermedades lisosómicas.

Ejemplo VIII

La mucopolisacaridosis tipo I (MPS I) es una enfermedad de almacenamiento lisosómico autosómica recesiva provocada por la deficiencia de alfa-L-iduronidasa (IDUA), que da como resultado la acumulación de glucosaminoglicanos. Las manifestaciones de la enfermedad incluyen trastornos multisistémicos y, en la forma grave de la enfermedad (síndrome de Hurler), la muerte a los diez años de edad. Los tratamientos que se usan actualmente, tales como la terapia de reemplazo enzimático y el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas, parecen ser ineficaces para el tratamiento en el CNS. En este estudio hemos usado el suministro intratecal de un vector de virus adenoasociado del serotipo 9 que transduce el gen IDUA (AAV9-IDUA) al CNS en un modelo de ratón con inactivación génica de MPS I. El propósito de este estudio fue evaluar la capacidad de la terapia génica mediada por AAV para prevenir los cambios neuroquímicos patológicos asociados con la enfermedad MPS I.

Métodos

Se usaron ratones C57BL/6 con inactivación génica con deficiencia de IDUA como un modelo bien establecido del síndrome de Hurler. El vector AAV9-IDUA se suministró por vía intratecal a ratones con MPS I a las 12 semanas de edad. Antes de la administración del AAV, los ratones se inyectaron con manitol para abrir la barrera hematoencefálica y se les indujo inmunotolerancia con iduronidasa para prevenir la respuesta inmunitaria anti-IDUA. Los espectros de RM ^1H *in vivo* se adquirieron del hipocampo y el cerebelo de ratones con MPS I tratados con el gen AAV9-IDUA (tratados con MPS I, N = 11), ratones con MPS I no tratados (MPS I, N = 12) y crías de la misma camada heterocigotos (control, N = 12) a los 9 meses de edad. Los datos de espectros de RM ^1H se adquirieron a 9,4 T mediante el uso de la secuencia de localización con ajuste de la homogeneidad FASTMAP y TE STEAM ultracorta (TE = 2 ms) combinada con supresión de agua VAPOR. Los metabolitos se cuantificaron mediante el uso de LCModel con el espectro de macromoléculas de relajación rápida incluido en el conjunto básico. Animales que respiraban espontáneamente se anestesiaron con isoflurano al 1,0 - 1,5 %.

Resultados

La calidad espectral lograda consistentemente en este estudio permitió una cuantificación fiable de quince metabolitos cerebrales. Se observaron aumentos pequeños pero significativos en las concentraciones de ascorbato (Asc, +0,6 $\mu\text{mol/g}$, $p = 0,003$) y N-acetilaspargilglutamato (NAAG, +0,3 $\mu\text{mol/g}$, $p = 0,015$) en el hipocampo de ratones con MPS I no tratados con respecto a los controles. Además, se ha observado una tendencia de aumento del nivel de glutatión (GSH, +0,2 $\mu\text{mol/g}$, $p = 0,054$). Las diferencias entre los perfiles neuroquímicos cerebelosos de los ratones con MPS I no tratados y los controles incluyen un aumento de NAAG (0,25 $\mu\text{mol/g}$, $p = 0,026$) y una disminución de la fosfoetanolamina (PE, -0,44 $\mu\text{mol/g}$, $p = 0,04$). Los perfiles neuroquímicos de los ratones con MPS I tratados con AAV9-IDUA mostraron una similitud notable con los de los ratones de control (Figuras 42A-B). En el hipocampo de los ratones con MPS I tratados, se normalizaron los niveles de Asc, NAAG y GSH; solo el lactato (Lac) mostró una pequeña diferencia con respecto al control. En el cerebelo de los ratones con MPS I tratados, se normalizó el nivel de PE pero no el de NAAG. Se observaron diferencias pequeñas pero significativas entre los ratones tratados y los de control para Asc, Lac taurina (Tau) y creatina total (Cr+PCr). Excepto Asc, los cambios en las concentraciones de metabolitos en los ratones con MPS I tratados fueron siempre opuestos a los observados en el grupo no tratado. Además, para una serie de metabolitos que no mostraron cambios significativos entre los ratones con MPS I no tratados y los controles (por ejemplo, glucosa, glutamato, NAA), parece que los niveles de metabolitos encontrados en los ratones con MPS I tratados estaban más cerca de los controles que de los ratones con MPS I no tratados.

Discusión

Concentraciones significativamente mayores de Asc y una tendencia a un aumento de GSH en el hipocampo de ratones con MPS I no tratados indican una respuesta protectora contra el estrés oxidativo informado en las enfermedades lisosómicas. Mientras que la disminución de PE en el cerebelo y el aumento de NAAG en ambas regiones del cerebro de ratones con MPS I no tratados pueden indicar desmielinización. Se observó un patrón similar de disminución de PE y aumento de NAAG en el modelo de deficiencia de hierro donde se confirmó una mielinización alterada. La comparación de los perfiles neuroquímicos del hipocampo y el cerebelo de los ratones con MPS I tratados con los de los ratones con MPS I no tratados y los ratones de control demuestra claramente que la transferencia directa del gen IDUA faltante al CNS mediante la administración intratecal de AAV9 (a las 12 semanas de edad) previno las alteraciones neuroquímicas (a los 9 meses de edad) asociadas con los procesos neurodegenerativos en este modelo de ratón con MPS I. Estos resultados neuroquímicos están de acuerdo con enfoques de terapia génica similares sometidos a prueba en el modelo de ratón con MPS I.

La terapia génica basada en el suministro directo de AAV9-IDUA al CNS indica que el estrés oxidativo y la desmielinización asociados con este modelo de ratón con MPS I pueden prevenirse.

Referencias

- Al-Ghananeem y otros, AAPS Pharm. Sci. Tech., 3:E5 (2002).
- Bagger y otros, Eur. J. Pharm. Sci. 21:235-242 (2004b).
- Bagger y otros, Int. J. Pharm., 269:311-322 (2004a).
- Baker y otros, Exp. Brain Res., 63:461 (1986).
- Balin y otros, J. Comp. Neurol., 251:260-280 (1986).
- Banks y otros, J. Drug Target, 17:91-97 (2009).
- Banks y otros, J. Pharmacol. Exp. Ther., 309:469 (2004).
- Banks, Biopolymers, 90:589 (2008).
- Barakat y otros, J. Pharm. Pharmacol., 58:63 (2006).
- Barbier y otros, Mol. Genet. Metab., 110:303 (2013).
- Baumgartner y otros, Neuron., 58:639 (2008).
- Benedict y otros, Neuroendocrinology, 86:136 (2007b).
- Benedict y otros, Neuropsychopharmacology, 32:239 (2007a).
- Benedict y otros, Psychoneuroendocrinology, 29:1326 (2004).
- Bjorkaker y otros, J. Dev. Behav. Ped., 27:290 (2006).
- Blits y otros, J. Neuros. Methods, 185:257 (2010).
- Born y otros, Nat. Neurosci., 5:514 (2002).
- Boulton y otros, Am. J. Physiol., 276:R818 (1999).
- Boulton y otros, Neuropathol. Appl. Neurobiol., 22:325 (1996).
- Bradbury y otros, Am. J. Physiol., 240:F329 (1981).
- Bradbury y otros, J. Physiol., 339:519 (1983).
- Brady, Ann. Rev. Med., 57:283 (2006).
- Broadwell y otros, J. Comp. Neurol., 242:632 (1985).
- Broekman y otros, Neuroscience, 138:501 (2006).
- Buck, En: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editores. Principles of neural science. 4ta edición. Nueva York: McGraw-Hill Companies. págs. 625-652 (2000).
- Buxer y otros, J. Neurochem., 56:1012 (1991).

- Cai y otros, *Sichuan Da Xue Bao Yi Xue Ban*, 39:438 (2008).
- Campos y otros, *Meta. Brain Dis.*, 27:121 (2012).
- Capsoni y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:12432 (2002).
- Carare y otros, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 34:131 (2008).
- 5 Cauna, En: Proctor DF, Andersen I, editores. *Amsterdam: Elsevier Biomedical Press*. págs. 45-69 (1982).
- Charlton y otros, *Int. J. Pharm.*, 338:94 (2007b).
- Charlton y otros, *J. Drug Target*, 15:370 (2007a).
- Charlton y otros, *Pharm. Res.*, 25:1531 (2008).
- Chen y otros, *J. Alzheimers Dis.*, 1:35 (1998).
- 10 Chen y otros, *J. Pharm. Sci.*, 95:1364 (2006).
- Chow y otros, *J. Pharm. Sci.*, 88:754 (1999).
- Chow y otros, *J. Pharm. Sci.*, 90:1729 (2001).
- Clerico y otros, En: Doty RL, editor. *Handbook of olfaction and gustation*. 2da edición. Nueva York: Marcel Dekker, Inc. págs. 1-16 (2003).
- 15 Campos y otros, *Meta. Brain Dis.*, 27:121 (2012).
- Costantino y otros, *Int. J. Pharm.*, 337:1 (2007).
- Cserr y otros, *Am. J. Physiol.*, 240:F319 (1981).
- Cserr y otros, *Brain Pathol.*, 2:269 (1992).
- Dahlin y otros, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 14:75 (2001).
- Danhof y otros, *American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting*, Atlanta, GA (2008).
- 20 Danielyan y otros, *Eur. J. Cell. Biol.*, 88:315 (2009).
- Davis y otros, *Clin. Pharmacokinet.*, 42:1107 (2003).
- de Lorenzo, En: Wolstenholme GEW, Knight J, editores. *Taste and smell in vertebrates*. Londres: Churchill. págs. 151-175 (1970).
- De Rosa y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:3811 (2005).
- 25 DeSesso, *Qual. Assur.*, 2:213 (1993).
- Desmanis y otros, *Ann. Neurol.*, 56:68 (2004).
- deSouza y otros, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 19:53 (2009).
- Dhanda y otros, *Drug Del. Tech.*, 5:64 (2005).
- Dhuria y otros, *J. Pharm. Sci.*, 98:2501 (2009b).
- 30 Dhuria y otros, *J. Pharmaceutical Sciences*, 99:1654 (2010).
- Dhuria y otros, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 328:312 (2009a).
- Diano y otros, *J. Clin. Invest.*, 118:26 (2008).
- Dickson y otros, *Mol. Gen. Metab.*, 91:61 (2007).
- Djupestrand y otros, *Laryngoscope*, 116:466 (2006).
- 35 Domes y otros, *Biol. Psychiatry*, 61:731 (2007b).
- Domes y otros, *Biol. Psychiatry*, 62:1187 (2007a).
- Dufes y otros, *Int. J. Pharm.*, 255:87 (2003).
- Einer-Jensen y otros, *Exp. Brain Res.*, 130:216 (2000b).
- Einer-Jensen y otros, *Pharmacol. Toxicol.*, 87:276 (2000a).
- 40 Einer-Jensen y otros, *Reproduction*, 129:9 (2005).
- Ellinwood y otros, *Mol. Genet. Metab.*, 91:239 (2007).
- Fehm y otros, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86:1144 (2001).
- Field y otros, *J. Neurocytol.*, 32:317 (2003).
- Fliedner y otros, *Endocrinology*, 17:2088 (2006).
- 45 Foust y otros, *Nat. Biotech.*, 27:5 (2009).
- Francis y otros, *Brain*, 131:3311 (2008).
- Fratantoni y otros, *Science*, 162:570 (1968).
- Frey y otros, *Drug Delivery*, 4:87 (1997).
- Frey II, *Drug Del. Tech.*, 2:46 (2002).
- 50 Fuss y otros, *Eur. J. Neurosci.*, 22:2649 (2005).
- Gao y otros, *Biomaterials*, 27:3482 (2006).
- Gao y otros, *Int. J. Pharm.*, 340:207 (2007a).
- Gao y otros, *J. Control Release*, 121:156 (2007b).
- Gopinath y otros, *Current Ther. Res.*, 23:596 (1978).
- 55 Gozes y otros, *Curr. Alzheimer Res.*, 4:507 (2007).
- Graff y otros, *Pharm. Res.*, 20:1225 (2003).
- Graff y otros, *Pharm. Res.* 22:235 (2005a).
- Graff y otros, *Pharm. Res.* 22:86 (2005b).
- Gray, 15ta edición revisada (edición Classic Collectors). Nueva York: Bounty Books (1978).
- 60 Grevers y otros, *Arch. Otorhinolaryngol.*, 244:55 (1987).
- Groothuis y otros, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 27:43 (2007).
- Gross y otros, *J. Anat.*, 135:83 (1982).
- Guastella y otros, *Biol. Psychiatry*, 63:3 (2008).
- Hadaczek y otros, *Mol. Ther.*, 14:69 (2006).
- 65 Hallschmid y otros, *Regul. Pept.*, 149:79 (2008).
- Han y otros, *J. Mol. Med.*, 85:75 (2007).

- Hanson y otros, *BMC Neurosci.*, 9:S5 (2008).
Hanson y otros, *Drug Del. Tech.*, 4:66 (2004).
Hanson y otros, San Diego, CA: Society for Neuroscience (2007).
Hanson y otros, En: EPO, editor. *Biopharm and HealthPartners Research Foundation* (2008).
- 5 Hartung y otros, *J. Am. Soc. Gene Ther.*, 9:866 (2004).
Hartung y otros, *Mol. Thera.*, 9:869 (2004).
Hashizume y otros, *Neuro. Oncol.*, 10:112 (2008).
Hatterer y otros, *Blood*, 107:806 (2006).
Herati y otros, *J. Gene Med.*, 10:972 (2008).
- 10 Hess y otros, *Exp. Neuro.*, 186:134 (2004).
Horvat y otros, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72:252 (2009).
Hussar y otros, *Chem. Senses*, 27:7 (2002).
Ilium, J. *Control Release*, 87:187 (2003).
Ilium, J. *Pharm. Pharmacol.*, 56:3 (2004).
- 15 Itaya y otros, *Brain Res.*, 398:397 (1986).
Jansson y otros, *J. Drug Target*, 10:379 (2002).
Jogani y otros, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 22:116 (2008).
Johnston y otros, *Cerebrospinal Fluid Res.*, 1:2 (2004).
Kakkis y otros, *Mol. Gen. Met.*, 83:163 (2004).
- 20 Kandimalla y otros, *J. Pharm. Sci.*, 94:613 (2005b).
Kandimalla y otros, *Pharm. Res.* 22:1121 (2005a).
Kida y otros, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 19:480 (1993).
Kirsch y otros, *J. Neurosci.*, 25:11489 (2005).
Klein y otros, *J. Am. Soc. Gene Ther.*, 13:517 (2006).
- 25 Koos y otros, *Neuroreport*, 16:1929 (2005).
Kosfeld y otros, *Nature*, 435:673 (2005).
Kristensson y otros, *Acta Neuropathol (Berl)*, 19:145 (1971).
Krivit, Springer Seminars in Immunopathology, 26:119 (2004).
Kumar y otros, *Curr. Sci.*, 43:435 (1974).
- 30 Kumar y otros, *Int. J. Pharm.*, 358:285 (2008).
Li y otros, *Chin. J. Physiol.*, 48:7 (2005c).
Li y otros, *Glia*, 52:245 (2005a).
Li y otros, *J. Neurocytol.*, 34:343 (2005b).
Loftus y otros, *Neuroscience*, 139:1061 (2006).
- 35 Luzzati y otros, *J. Mol. Biol.*, 343:199 (2004).
Mackay-Sim, En: Doty RL, editor. *Handbook of olfaction and gustation*. 2da edición. Nueva York: Marcel Dekker, Inc. págs. 93-113 (2003).
Martínez y otros, *Neuroscience*, 157:908 (2008).
- 40 Minn y otros, *J. Drug Target*, 10:285 (2002).
Miragall y otros, *J. Comp. Neurol.*, 341:433 (1994).
Muenzer, J. *Pediatrics*, 144:S27 (2004).
Muñoz-Rojas y otros, *Am. J. Med. General*, 146A:2538 (2008).
- Neufeld y Muenzer, En A. L. B. C.R. Scriver, W.S. Sly, y otros (ed.), McGraw Hill, NY, pág. 3421 (2001).
Nonaka y otros, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 325:513 (2008).
- 45 Ohlfest y otros, *Blood*, 105:2691 (2005).
Orchard y otros, *J. Pediatrics*, 151:340 (2007).
Owens y otros, *Diabet. Med.*, 20:886 (2003).
Pan y otros, *Brain Res.*, 1188:241 (2008).
Pardridge, *NeuroRx*, 2:3 (2005).
- 50 Parker y otros, *Psychoneuroendocrinology*, 30:924 (2005).
Pastores, *Exp. Opin. Biol. Ther.*, 8:1003 (2008).
Pereira y otros, *Clin. Chim. Acta: Int. J. Clin. Chem.*, 387:75 (2008).
Perl y otros, *Lancet*, 1:1028 (1987).
- Peters y otros, *Bone Marrow Transpl.*, 31:229 (2003).
- 55 Pollock y otros, *J. Anat.*, 191:337 (1997).
Raghavan y otros, *J. Laryngol. Otol.*, 114:456 (2000).
Rao y otros, *Ped. Res.*, 73:31 (2013).
Reger y otros, *J. Alzheimers Dis.*, 13:323 (2008a).
- Reger y otros, *Neurobiol. Aging*, 27:451 (2006).
- 60 Reger y otros, *Neurology*, 70:440 (2008b).
Rennels y otros, *Adv. Neurol.* 52:431 (1990).
Rennels y otros, *Brain Res.*, 326:47 (1985).
Reolon y otros, *Brain Res.*, 1076:225 (2006).
Reolon y otros, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 29:443 (2009).
- 65 Rimmele y otros, *J. Neurosci.*, 29:38 (2009).
Ross y otros, *J. Neuroimmunol.*, 151:66 (2004).

- Ross y otros, *Neurosci. Lett.*, 439: 30 (2008).
 Sakane y otros, *J. Pharm. Pharmacol.*, 46:378 (1994).
 Sakane y otros, *J. Pharm. Pharmacol.*, 47:379 (1995).
 Sarkar, *Pharm. Res.*, 9:1 (1992).
- 5 Schaefer y otros, *J. Comp. Neurol.*, 444:221 (2002).
 Scheibe y otros, *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 134:643 (2008).
 Schley y otros, *J. Theor. Biol.*, 238:962 (2006).
 Schulz y otros, *Endocrinology*, 145:2696 (2004).
 Schuster y otros, *Frontiers in Neuroanatomy*, 8:42 (2014).
- 10 Scott y otros, *Am. J. Hum. Genet.*, 53:973 (1993).
 Shimizu y otros, *Int. J. Obes. (Lond)*, 29:858 (2005).
 Shipley, *Brain Res. Bol.*, 15:129 (1985).
 Skipor y otros, *Reprod. Biol.*, 3:143 (2003).
 Steen y otros, *J. Alzheimer Dis.*, 7:63 (2005).
- 15 Stefanczyk-Krzyszowska y otros, *Exp. Physiol.* 85:801 (2000).
 Takano y otros, *J. Histochem. Cytochem.*, 53:611 (2005).
 Thorne y otros, *Brain Res.*, 692:278 (1995).
 Thorne y otros, *Clin. Pharmacokinet.*, 40:907 (2001).
 Thorne y otros, *Neuroscience*, 127:481 (2004).
- 20 Thorne y otros, *Neuroscience*, 152:785 (2008).
 Thorne, RG. 2002. The nasal pathways for drug delivery to the central nervous system: Studies with protein tracers and therapeutics. Tesis de Doctorado, Universidad de Minnesota.
 Tkac y otros, *Mag. Res. In Med.*, 41:649 (1999).
 Tkac y otros, *Mag. Res. In Med.*, 50:24 (2003).
- 25 Unger y otros, *J. Neuropath. Exp. Neuro.*, 52:460 (1993).
 van den Berg y otros, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 58:131 (2004b).
 Van den Berg y otros, *J. Drug Target*, 11:325 (2003).
 van den Berg y otros, *J. Neurosci. Methods*, 116:99 (2002).
 van den Berg y otros, *Pharm. Res.*, 21:799 (2004a).
- 30 Van Diest y otros, *J. Anat.*, 128:293 (1979).
 Vyas y otros, *AAPS PharmSciTech.*, 7:E1 (2006c).
 Vyas y otros, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 23:319 (2006b).
 Vyas y otros, *J. Drug Target*, 13:317 (2005).
 Vyas y otros, *J. Pharm. Sci.*, 95:570 (2006a).
- 35 Walter y otros, *Arch. Histol. Cytol.*, 69:37 (2006a).
 Walter y otros, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 32:388 (2006b).
 Wang y otros, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 57:97 (2006a).
 Wang y otros, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 70:735 (2008).
 Wang y otros, *Int. J. Pharm.*, 317:40 (2006b).
- 40 Wang y otros, *Int. J. Pharm.*, 341:20 (2007).
 Watson y otros, *Gene Therapy*, 16 de febrero de 2006, doi: 10.1038/sj.gt.3302735.
 Weller y otros, *Neurol. Res.*, 25:611 (2003).
 Westin y otros, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 24:565 (2005).
 Westin y otros, *Pharm. Res.*, 23:565 (2006).
- 45 Williams y otros, *J. Comp. Neurol.*, 470:50 (2004).
 Wioland y otros, *J. Histochem. Cytochem.*, 48:1215 (2000).
 Wolf y otros, *Neurobio. Dis.*, 43:123 (2011).
 Wolf y otros, *Neurology*, 62:1503 (2004).
 Xu y otros, *J. Clin. Invest.*, 118:272 (2008).
- 50 Yamada y otros, *Am. J. Physiol.*, 261:H1197 (1991).
 Yang y otros, *J. Pharm. Sci.*, 94:1577 (2005).
 Zhang y otros, *Acta Neuropathol. (Berl)*, 83:233 (1992).
 Zhang y otros, *Acta Pharmacol. Sin.*, 25:522 (2004a).
 Zhang y otros, *Int. J. Pharm.*, 275:85 (2004b).
- 55 Zhang y otros, *J. Drug Target*, 14:281 (2006).
 Zhao y otros, *Acta Pharmacol. Sin.*, 28:273 (2007).
 Zhao y otros, *Chin. Med. Sci. J.*, 19:257 (2004).
 Zheng y otros, *Mol. Genet. Metab.*, 79:233 (2003).
 Ziegler y Shapiro, *En J. Donders y S. Hunter* (ed.), Cambridge University Press, pág. 427 (2007).
- 60

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cantidad eficaz de un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un marco abierto de lectura que codifica iduronato-2-sulfatasa, para su uso en un método para potenciar la neurocognición en un mamífero que tiene un trastorno de mucopolisacaridosis tipo II (MPSII) con respecto a un mamífero con MPSII al que no se le administra el rAAV, en donde el rAAV es rAAV9 o rAAVrh10.
5
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el mamífero no se trata con un inmunosupresor.
10
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el mamífero se trata con un inmunosupresor.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el inmunosupresor comprende un glucocorticoide, agentes citostáticos, lo que incluye un agente alquilante, un antimetabolito, un antibiótico citotóxico, un anticuerpo, un agente activo sobre la inmunofilina, ciclofosfamida, una mostaza nitrogenada, nitrosourea, compuesto de platino, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, fluorouracilo, dactinomicina, una antraciclina, mitomicina C, bleomicina, mitramicina, anticuerpos dirigidos contra CD3 o el receptor de IL-2 (CD25-), anticuerpos anti-IL-2, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, IFN- β , IFN- γ , un opioide, o un agente de unión al TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa).
15
20
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el rAAV y el inmunosupresor se administran conjuntamente o el inmunosupresor se administra después del rAAV.
- 25 6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde al mamífero no se le induce inmunotolerancia antes de la administración del rAAV.
7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde al mamífero se le induce inmunotolerancia antes de la administración del rAAV.
30
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el mamífero es un ser humano o un adulto inmunocompetente.
9. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el vector de rAAV es un vector rAAV9.
35
10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde se administran múltiples dosis o en donde la composición se administra semanalmente.
- 40 11. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la cantidad inhibe el retardo del crecimiento, inhibe la hepatoesplenomegalia, inhibe la enfermedad cardiopulmonar o inhibe la displasia esquelética, o cualquier combinación de los mismos.
- 45 12. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el rAAV es rAAVrh10.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en ratones adultos con MPS I (con deficiencia de IDUA)

Vía de Adm.	Ratones	CF	Edad al iny.	Sacrificado
1. ICV	Immunodeficiente	No		10 sem. después iny.
2. ICV	Immunocompetente	Sí	4,5 meses	8 sem. después iny.
3. Intratecal	Immunocompetente	Sí	4,5 meses	11 sem. después iny.
4. ICV	Con inducción de inmunotolerancia	No	3 meses	9 sem. después iny.

Todos los animales se inyectaron con 10 µl de vector AAV9 (3 x 10¹¹ partículas)

inyecciones ICV: Ventriculo lateral derecho

inyecciones IT: Área lumbar

Figura 1

Actividad de IDUA en:
Ratones inmunodeficientes (ID): Inyección ventricular intracraneal (ICV)

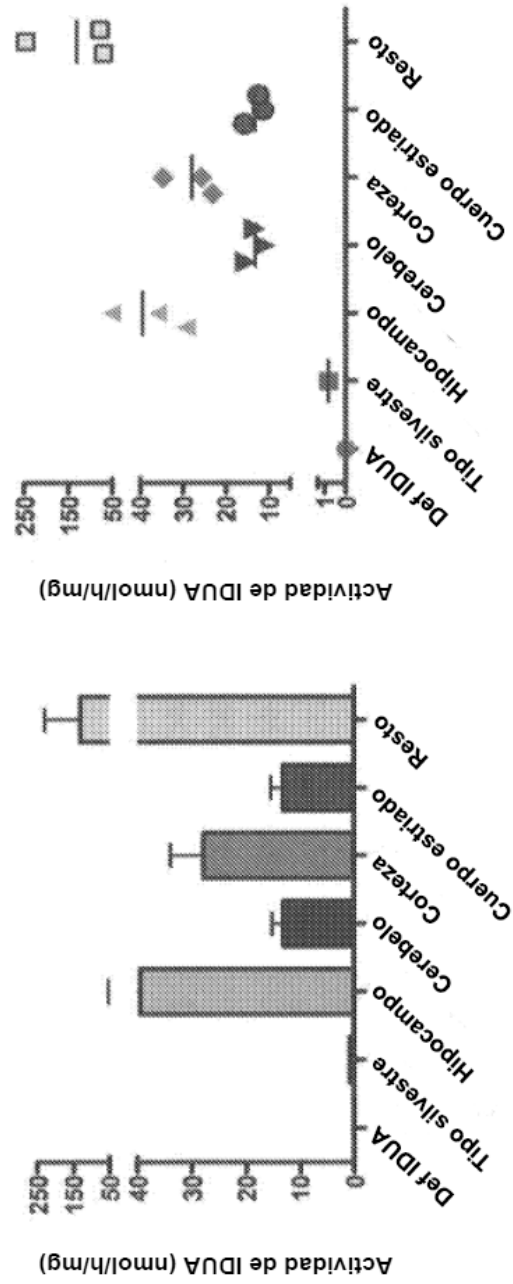


Figura 2

Actividad de IDUA en:
Ratones inmunocompetentes (IC): Inyección ICV +
Ciclofosfamida (CF)

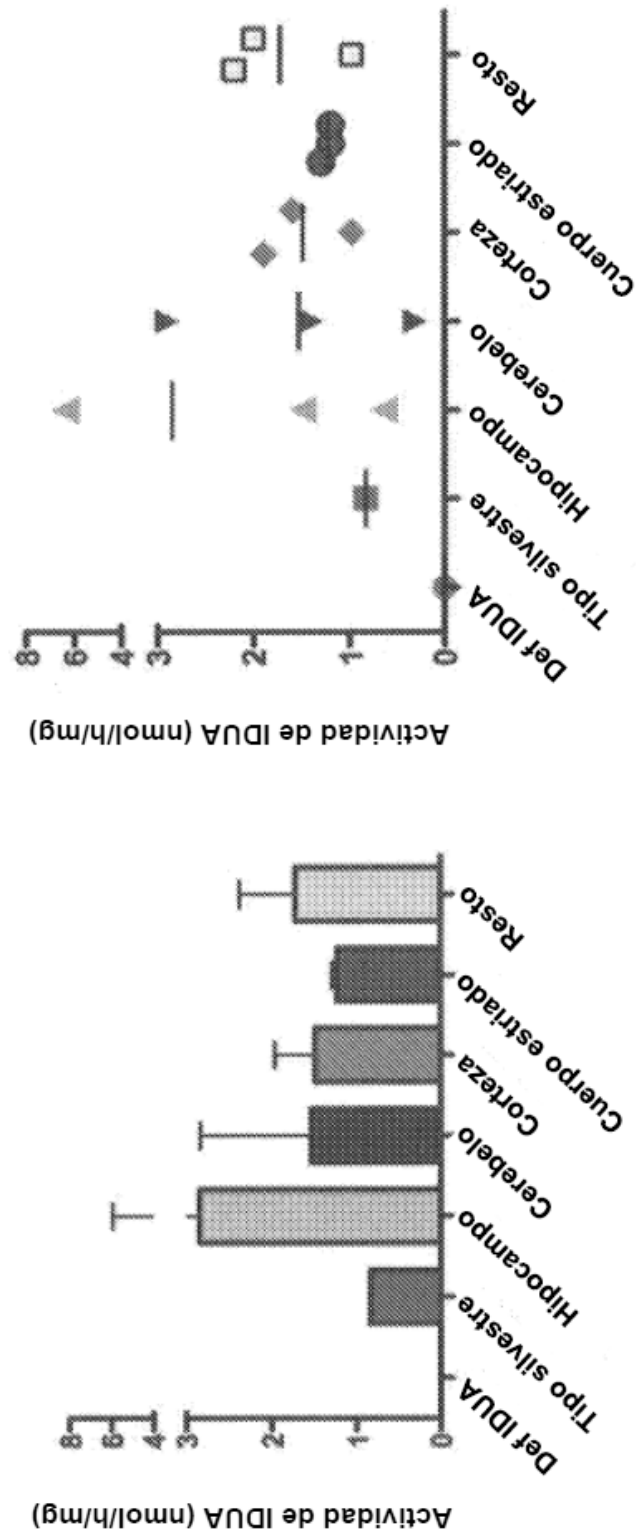


Figura 3

Actividad de IDUA en:
Ratones inmunocompetentes (IC): Inyección intratecal (IT) +
Ciclofosfamida (CF)

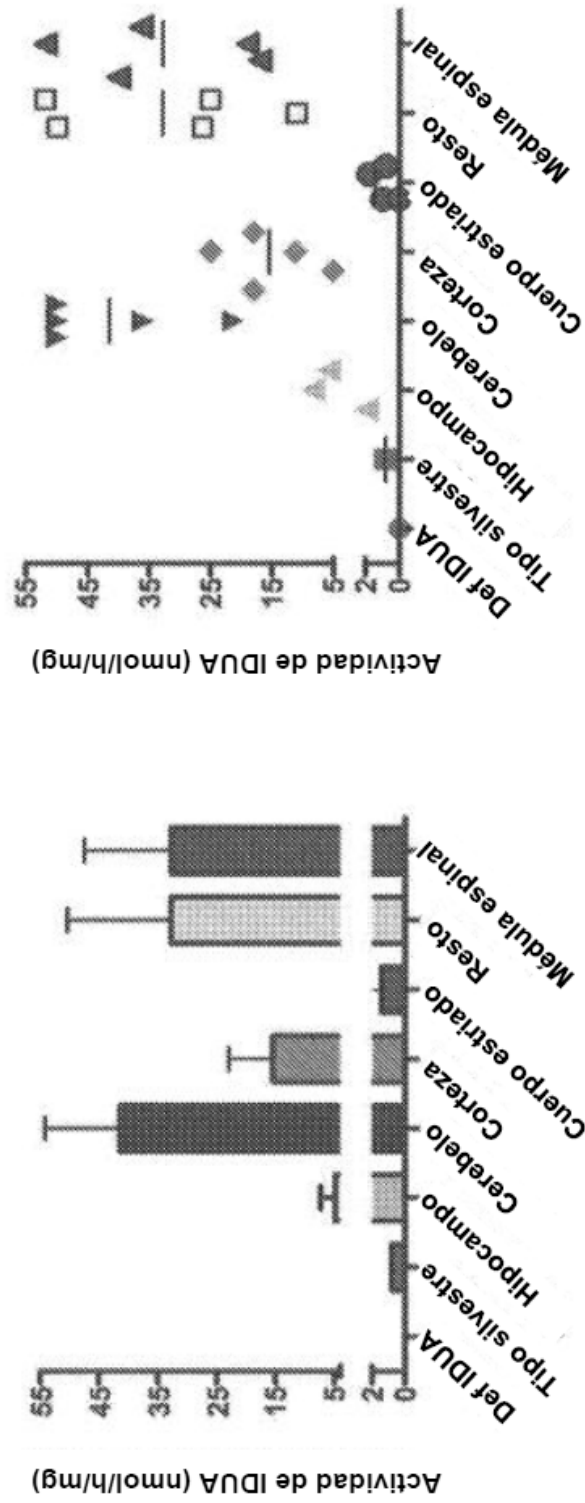


Figura 4

Actividad de IDUA en:
Ratones inmunocompetentes (IC): Con inducción de
inmunotolerancia (Itol)

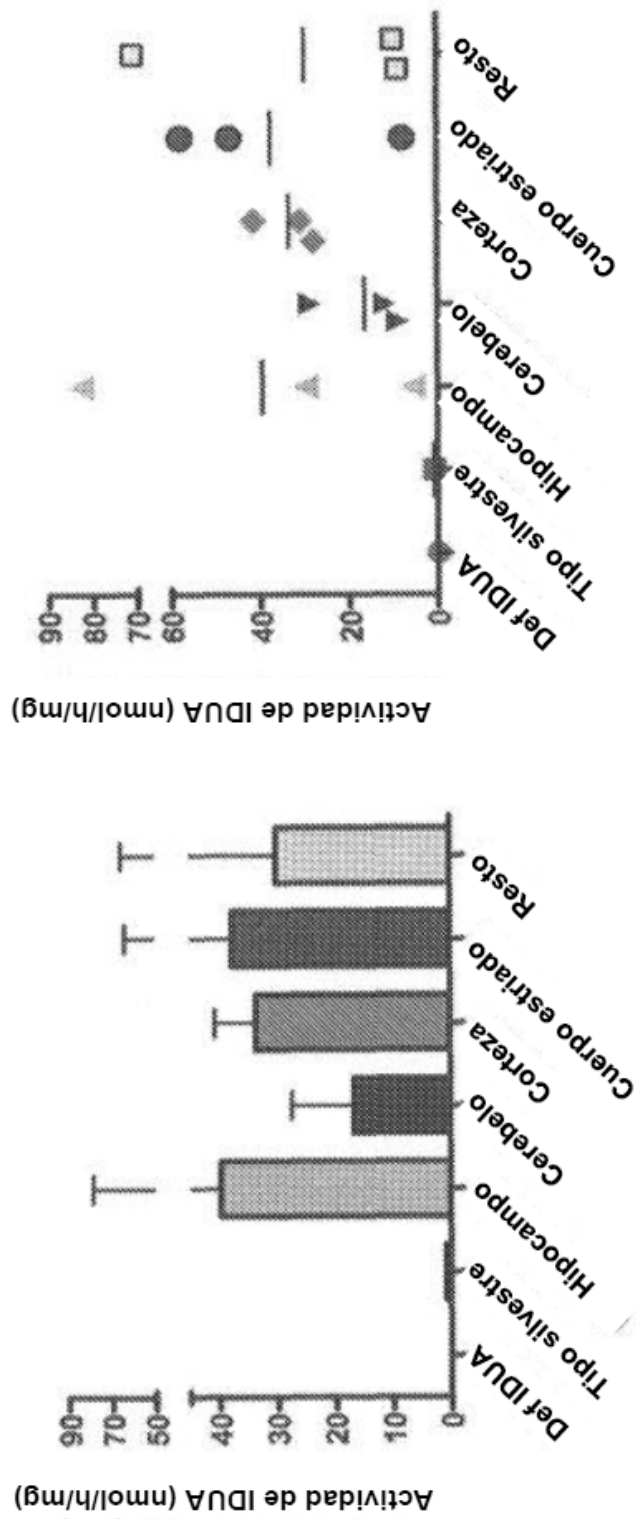


Figura 5

Comparación de diferentes vías de suministro

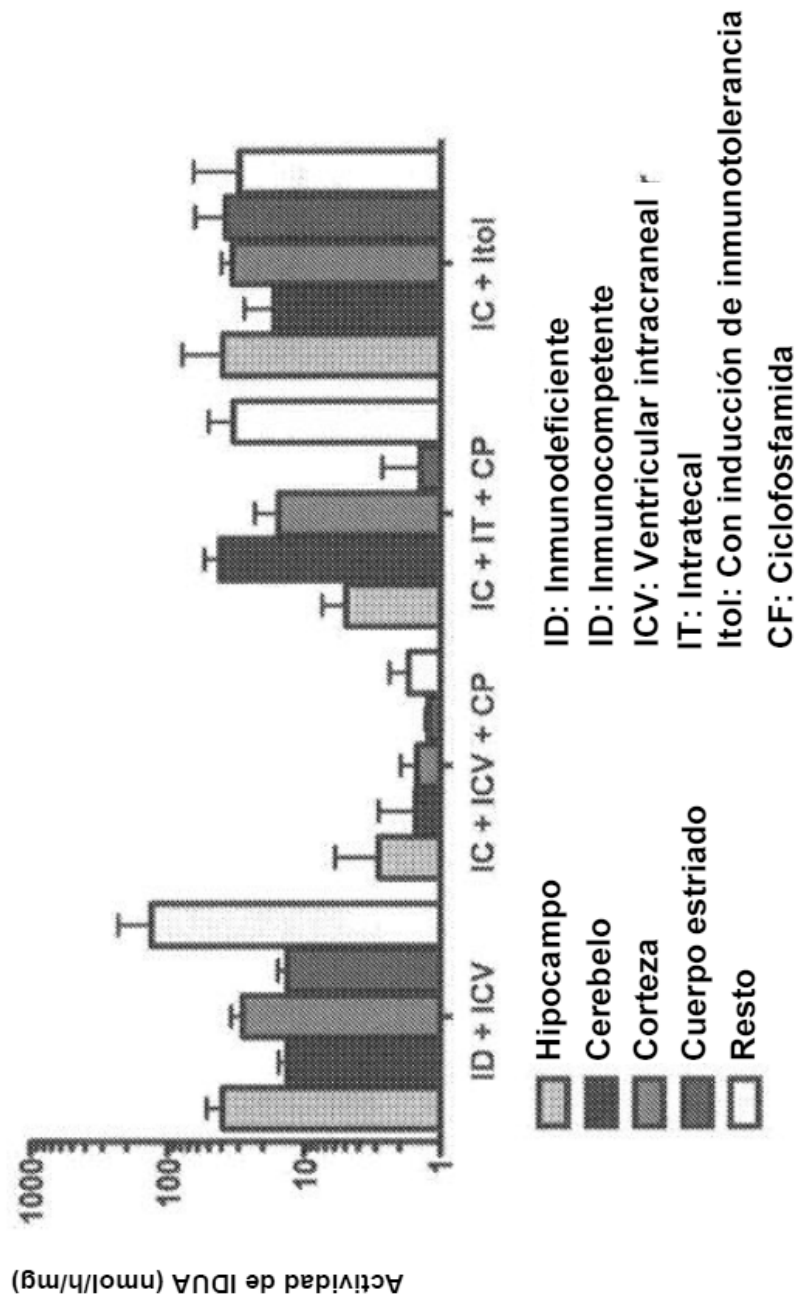


Figura 6

Comparación de vías de suministro y actividad de IDUA en el cerebro

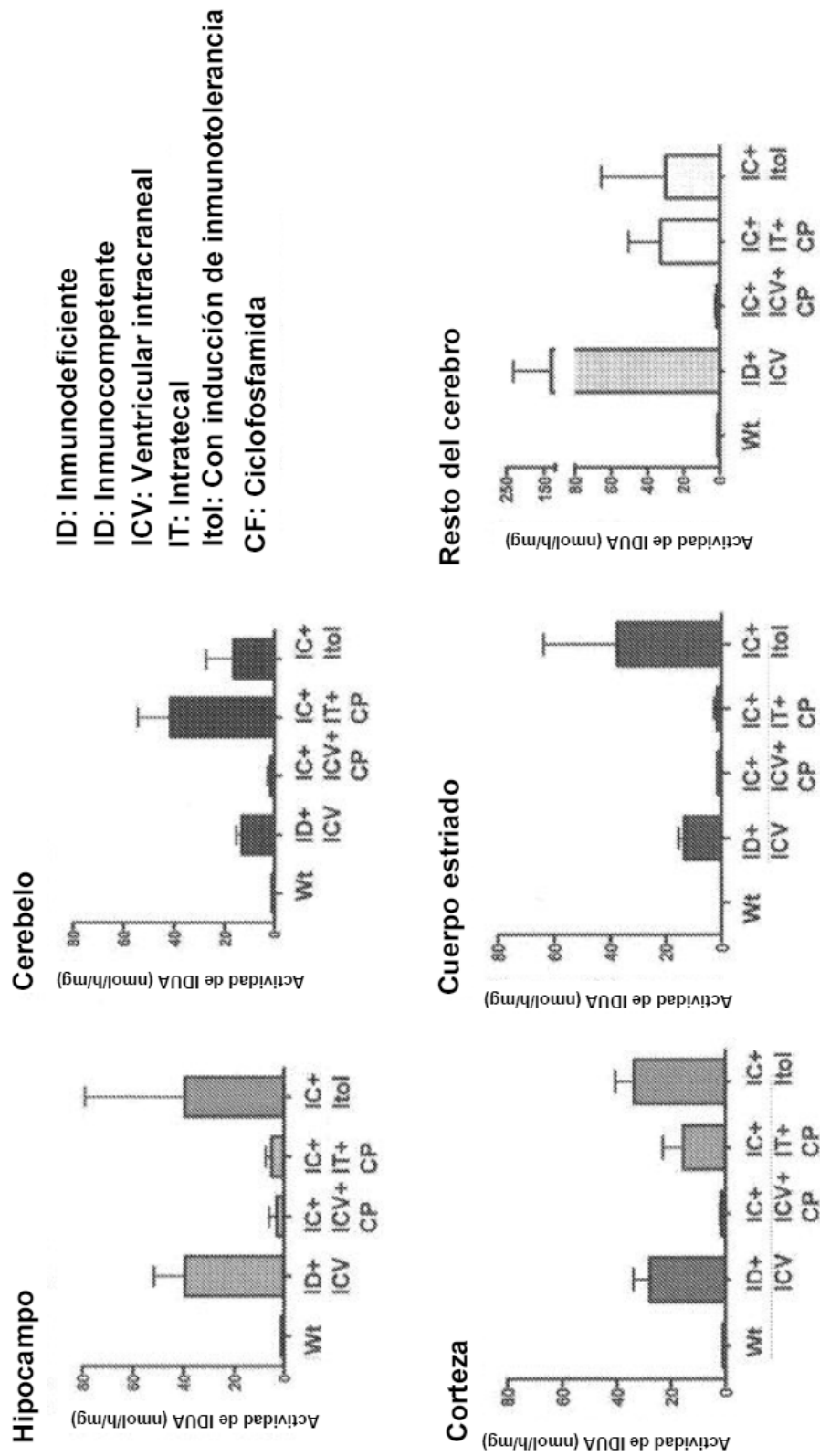


Figura 7

Actividad de GAG en cerebro de ratón. Los cerebros microdisccionados se analizaron para determinar la acumulación de GAG

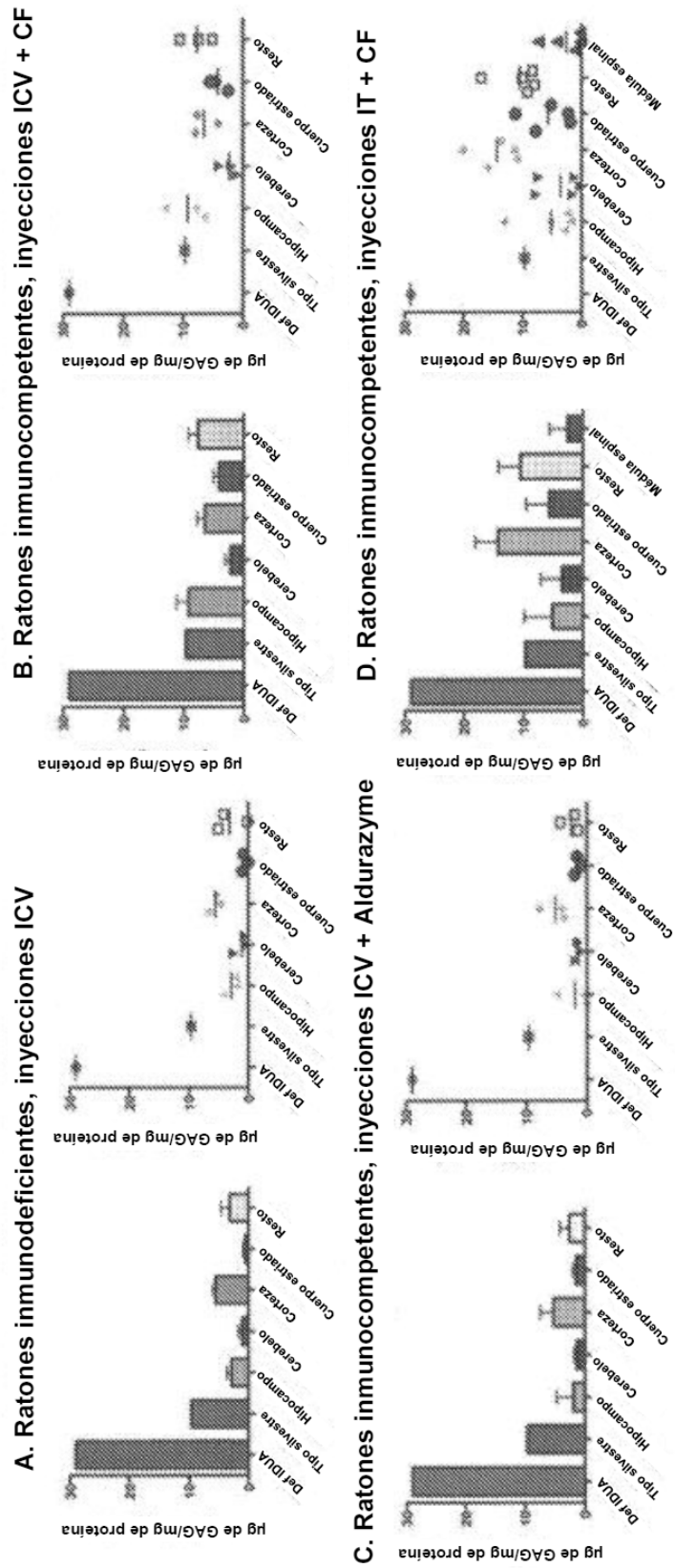


Figura 8

Figura 9. Diseño experimental

Vía de administración del vector	Competencia inmunitaria	Modulación inmunitaria	Edad de los animales al inyectarse	Punto final exp. (después de la <u>inyección</u>)
ICV	Inmunodeficiente	Ninguna Inmunosupresión c/CF (régimen parcial) Inducción de inmunotolerancia Ninguna Inmunosupresión c/CF (régimen completo)	4,5 meses 4,5 meses 3 meses 3 meses	10 semanas
ICV	Inmunocompetente			8 semanas
ICV	Inmunocompetente			11 semanas
ICV	Inmunocompetente			
ICV	Inmunocompetente			
IT	Inmunocompetente	Inmunosupresión c/CF (régimen completo) Inducción de tolerancia enzima Ninguna	3 meses 4,5 meses 4,5 meses	9 semanas
IT	Inmunocompetente			10 semanas
IT	Inmunocompetente			11 semanas

Abreviaturas:

ICV: Intracerebroventricular

IT: Intratecal

CF: Ciclofosfamida

Los experimentos se llevaron a cabo en ratones adultos con MPS I (con deficiencia de IDUA)
Todos los animales se inyectaron con 10 µl de vector AAV9 (3 x 10¹¹ partículas)

Figura 10. Suministro intracraneal a animales inmunodeficientes

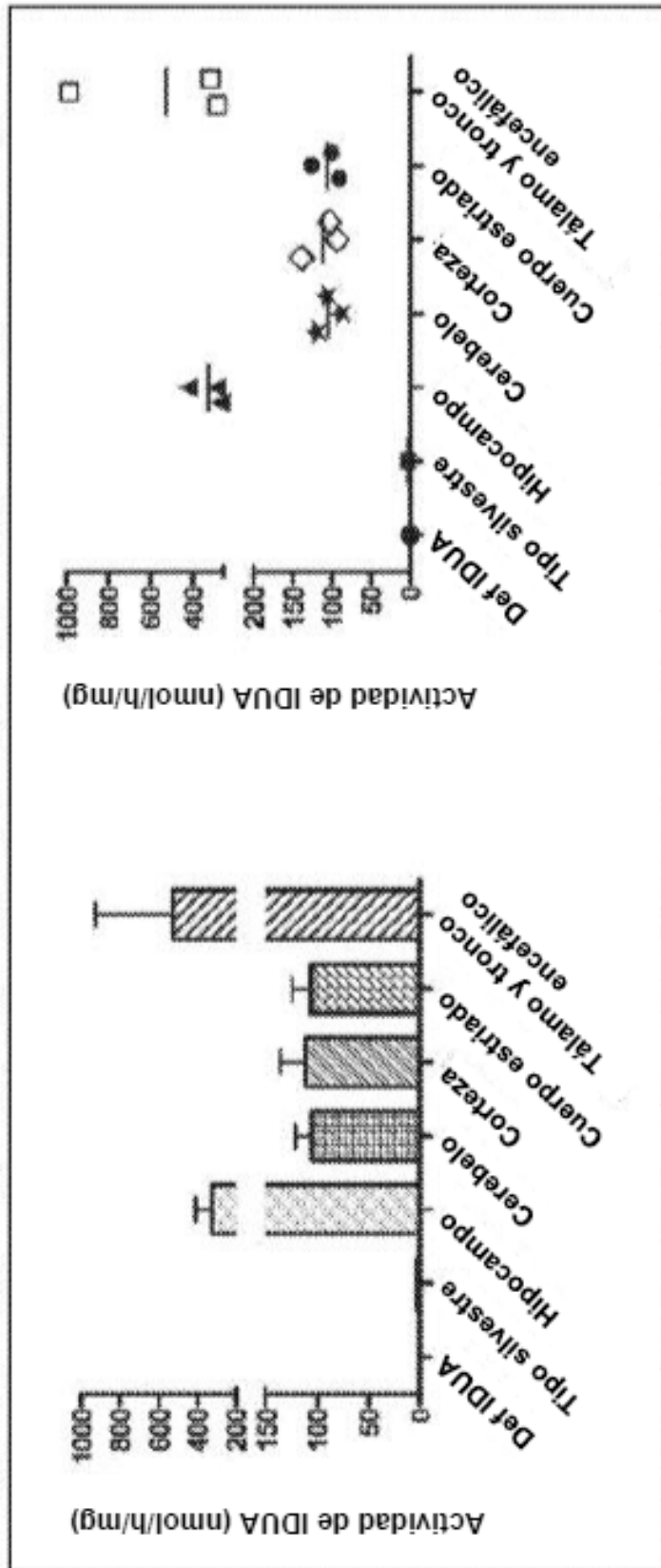


Figura 11. Suministro intracraneal a ratones inmunocompetentes + Inmunosupresión con ciclofosfamida

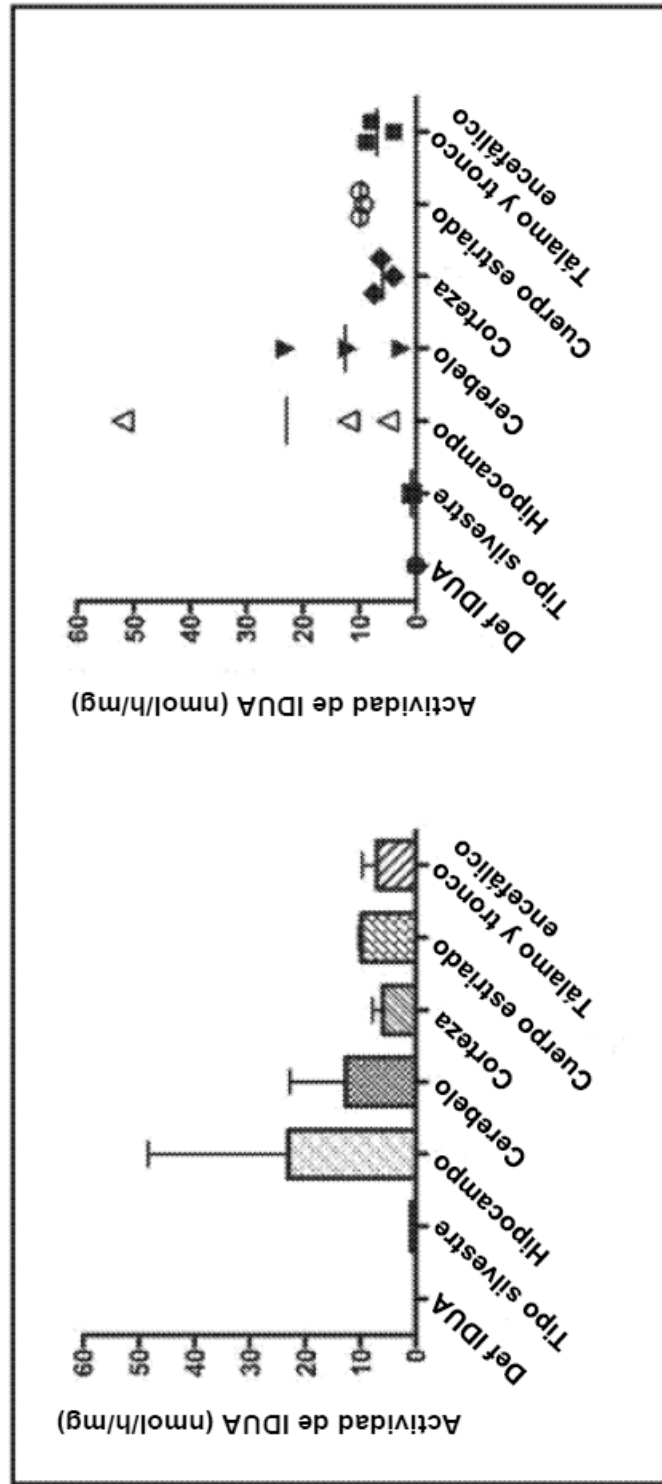


Figura 12. Suministro intracraneal a ratones inmunocompetentes + Inducción de inmunotolerancia con Aldurazyme

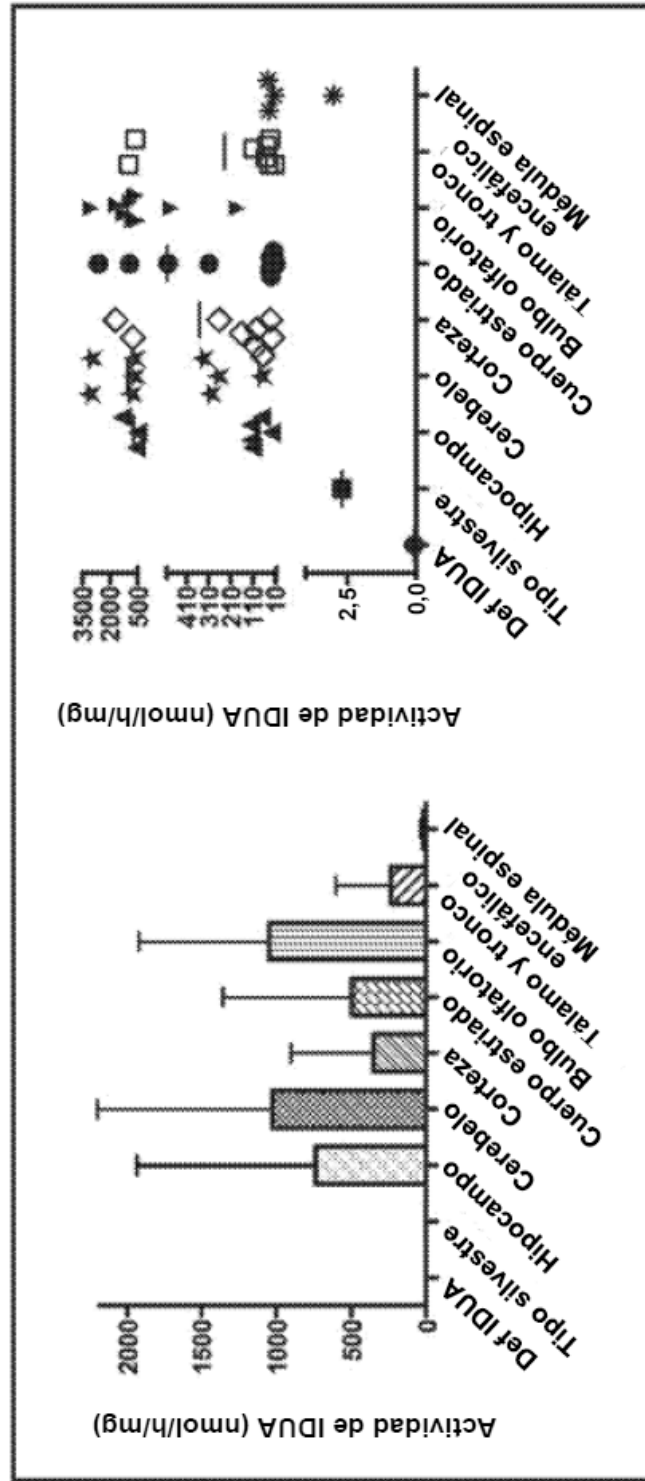
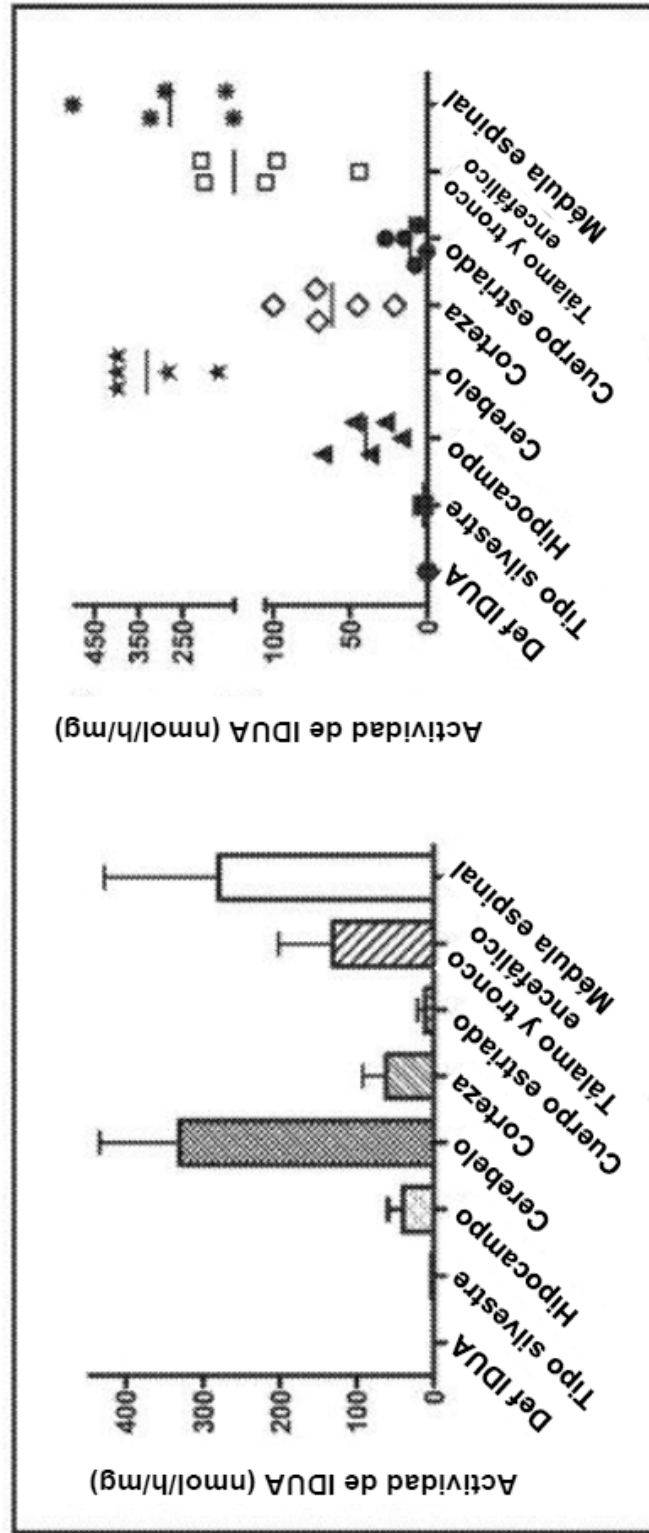


Figura 13. Suministro intratecal a ratones inmunocompetentes + Inmunosupresión con Ciclofosfamida



**Figura 14. Suministro intratecal a ratones inmunocompetentes
+ Inducción de inmunotolerancia con Aldurazyme**

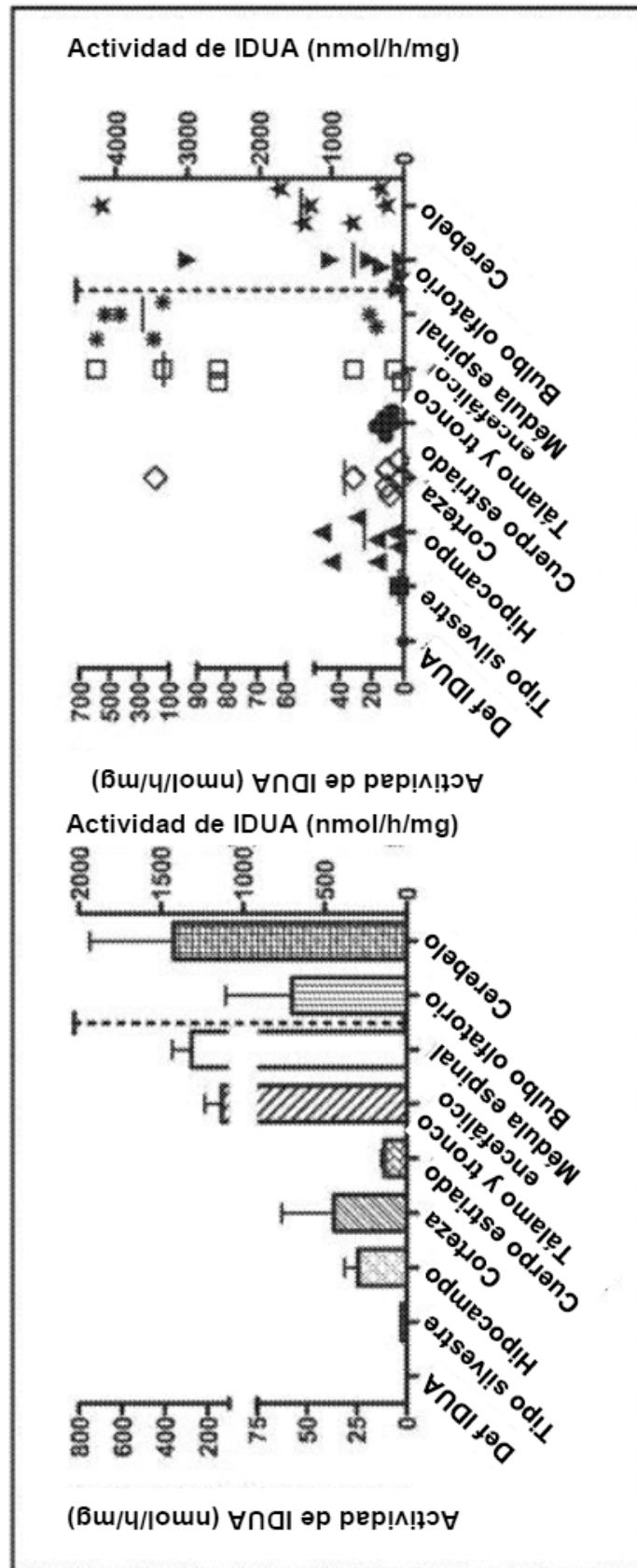


Figura 15. Suministro intratecal a ratones inmunocompetentes (Controles-Sin inmunosupresión, sin inducción de intolerancia

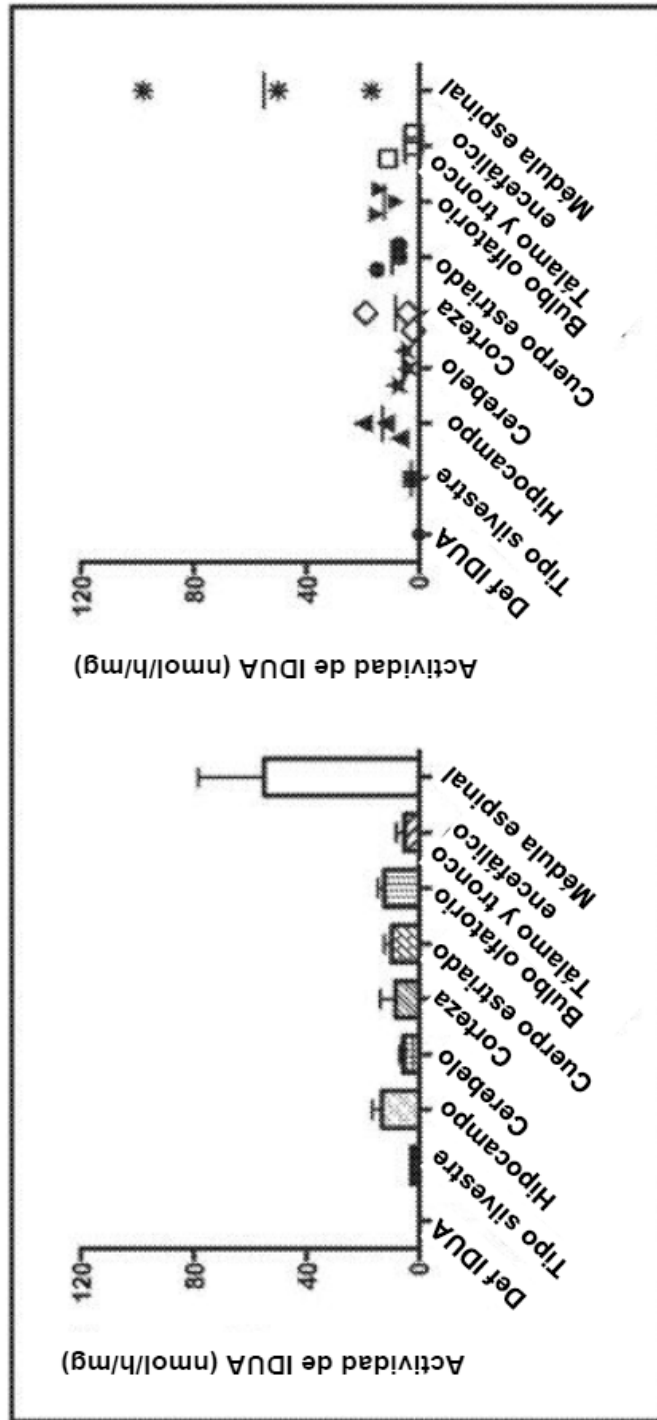


Figura 16. Normalización de glicosaminoglicanos después de la administración intracraneal o intratecal de AAV9-IDUA

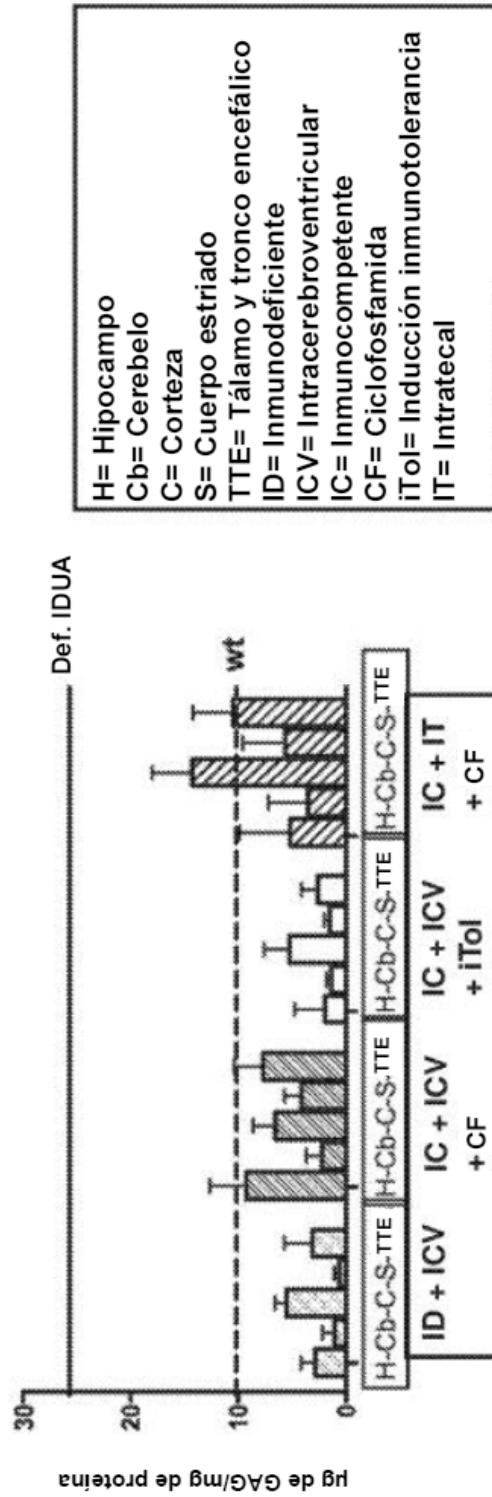
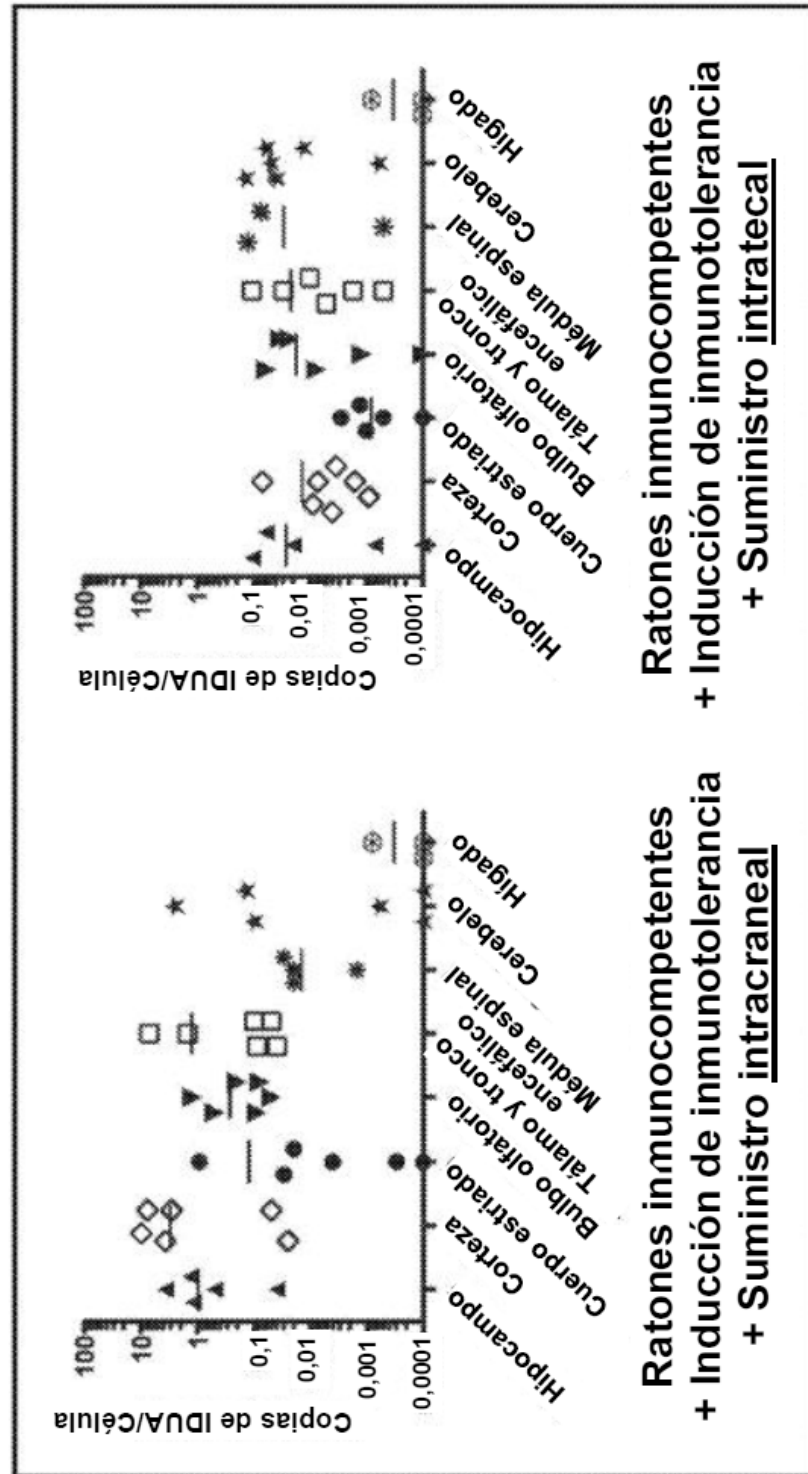


Figura 17. Número de copias del vector en el cerebro



INFUSIÓN ICV DE AAV8-MCS EN ANIMALES ADULTOS
POSTSINTOMÁTICOS DA COMO RESULTADO UNA
DEFICIENTE EXPRESIÓN DEL TRANSGEN

ACTIVIDAD DE IDUA SOLO DETECTADA EN UN ANIMAL TRATADO A LA EDAD DE 7 MESES	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	HIGA- DO
	OB	OB	HIP	HIP	STR	STR	CTX	CTX	BS	BS	CER	CER	BS	BS	CER	CER	ND
	ND	ND	ND	0,50	ND	0,26	0,39	0,76	ND	ND	1,24	2,58	ND	ND			

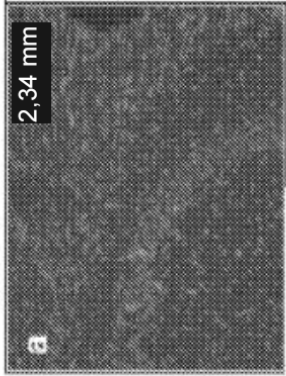
ACTIVIDAD DE IDUA
SOLO DETECTADA EN
UN ANIMAL TRATADO A
LA EDAD DE 7 MESES

COORDENADAS ANTERIOR-
POSTERIOR DESDE LA BREGMA (mm)

5,13 4,30 2,34



MPS | + AAV-6 SEMANAS



MPS | AAV-7 MESES

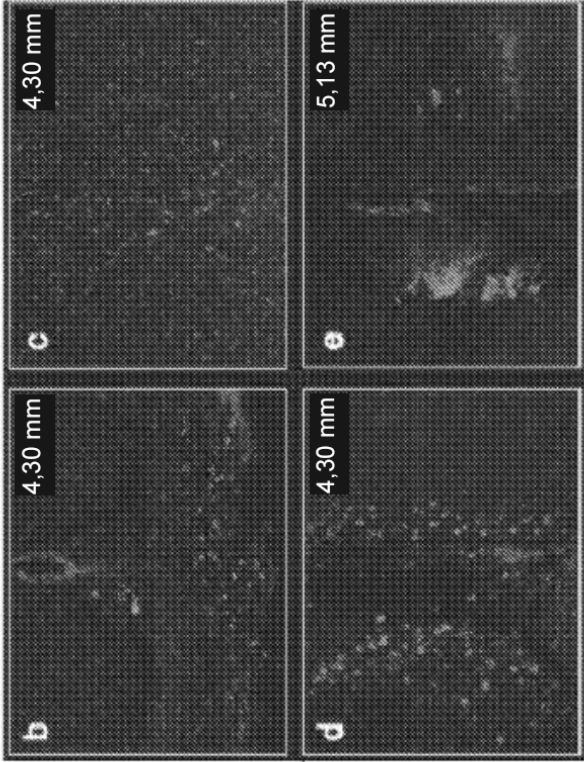


Figura 18

Figura 19. Suministro intranasal a animales inmunocompetentes + Inmunosupresión con ciclofosfamida

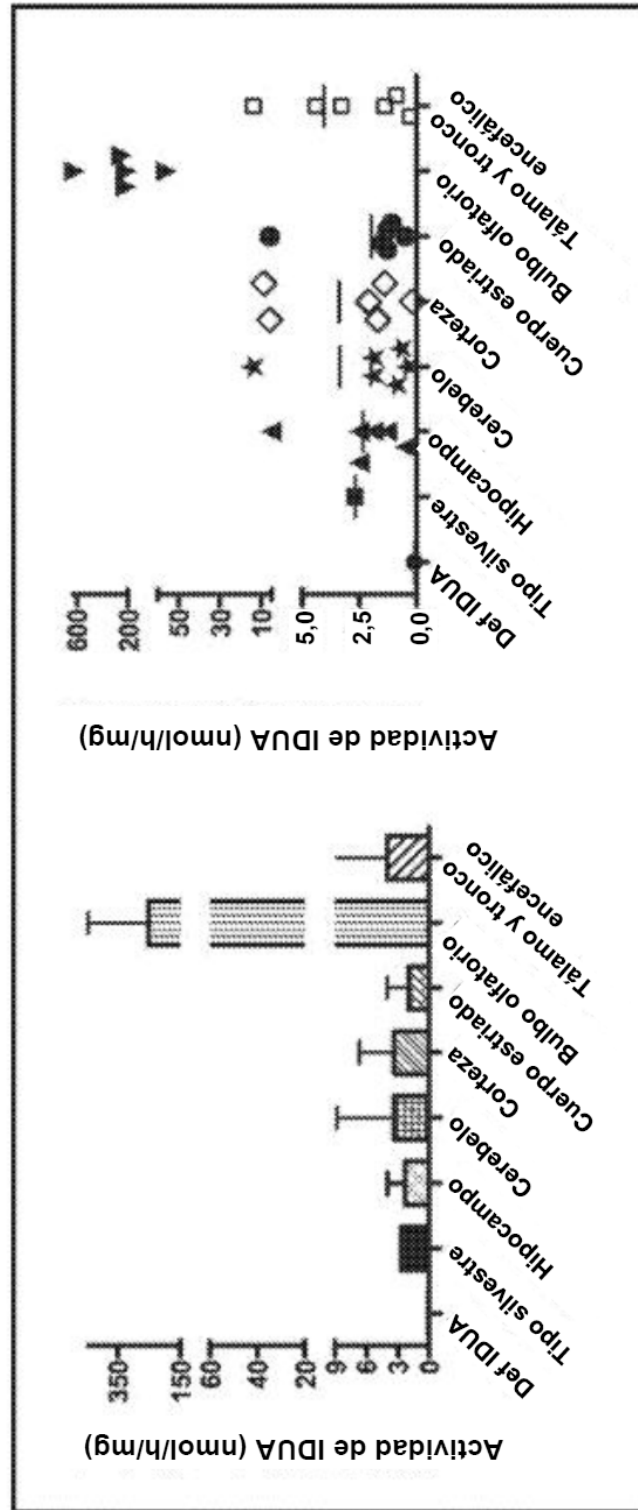


Figura 20. Número de copias del vector en el cerebro

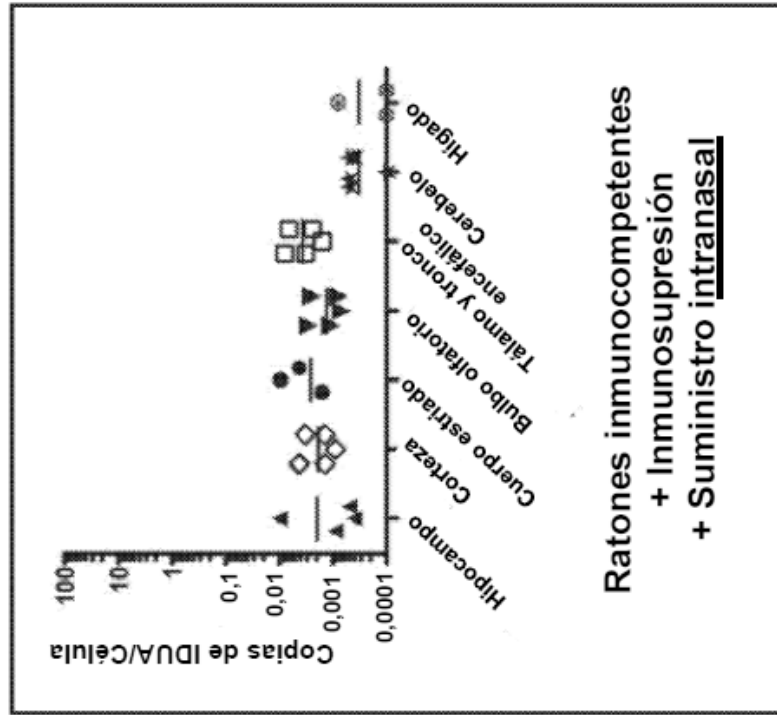


Figura 21. Infusión de AAV intranasal

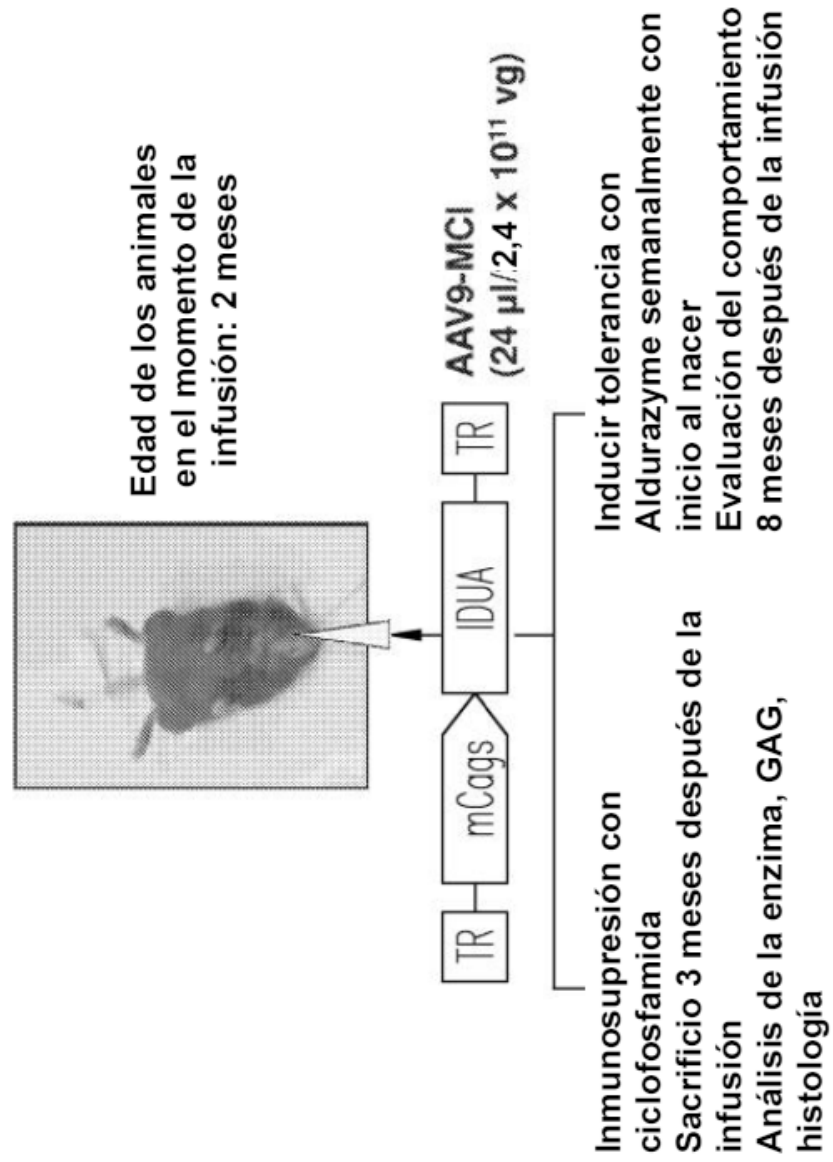


Figura 22. Restauración de la actividad de la enzima IDUA después del suministro intranasal

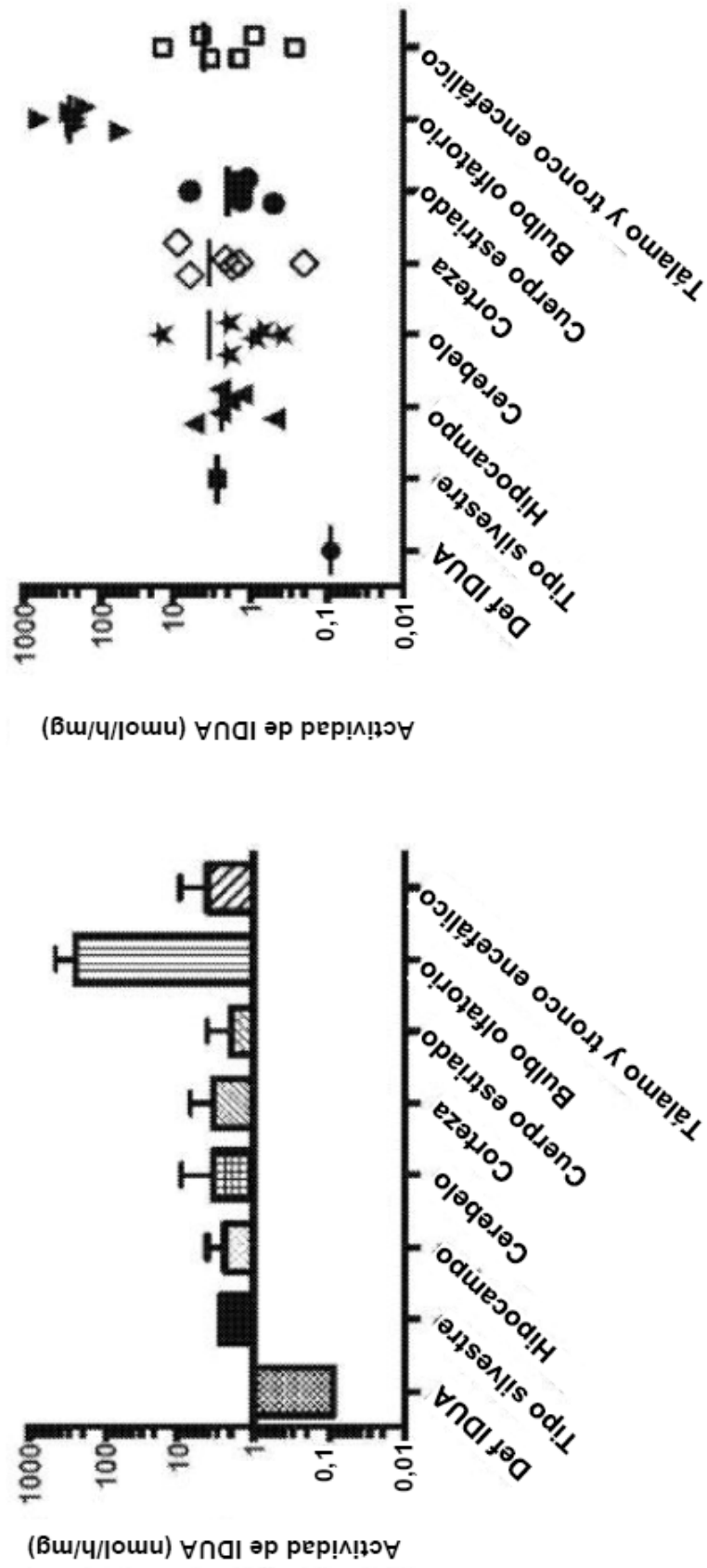


Figura 23. Actividad de GAG en el cerebro después del suministro intranasal de AAV9-IDUA

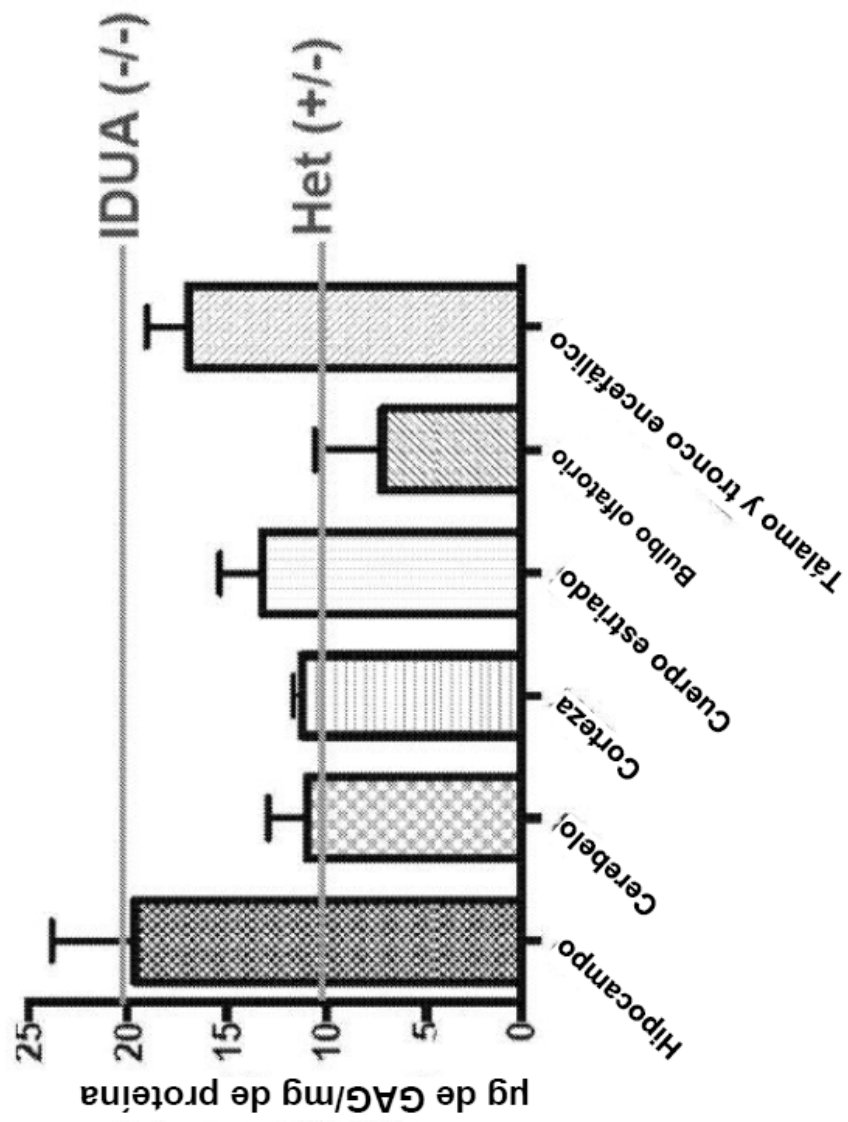


Figura 24. Inmunofluorescencia de IDUA

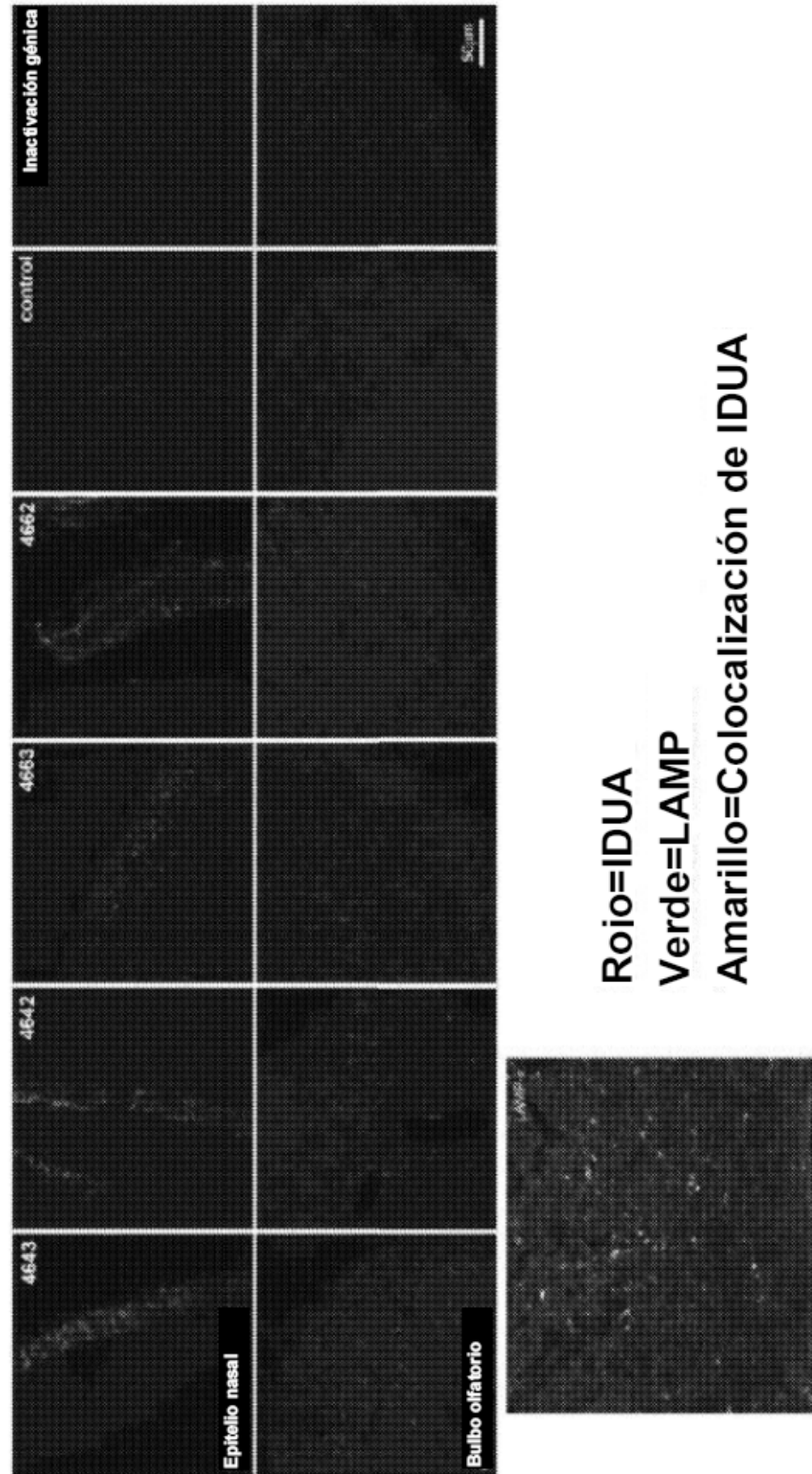


Figura 25. Inmunofluorescencia de GFP

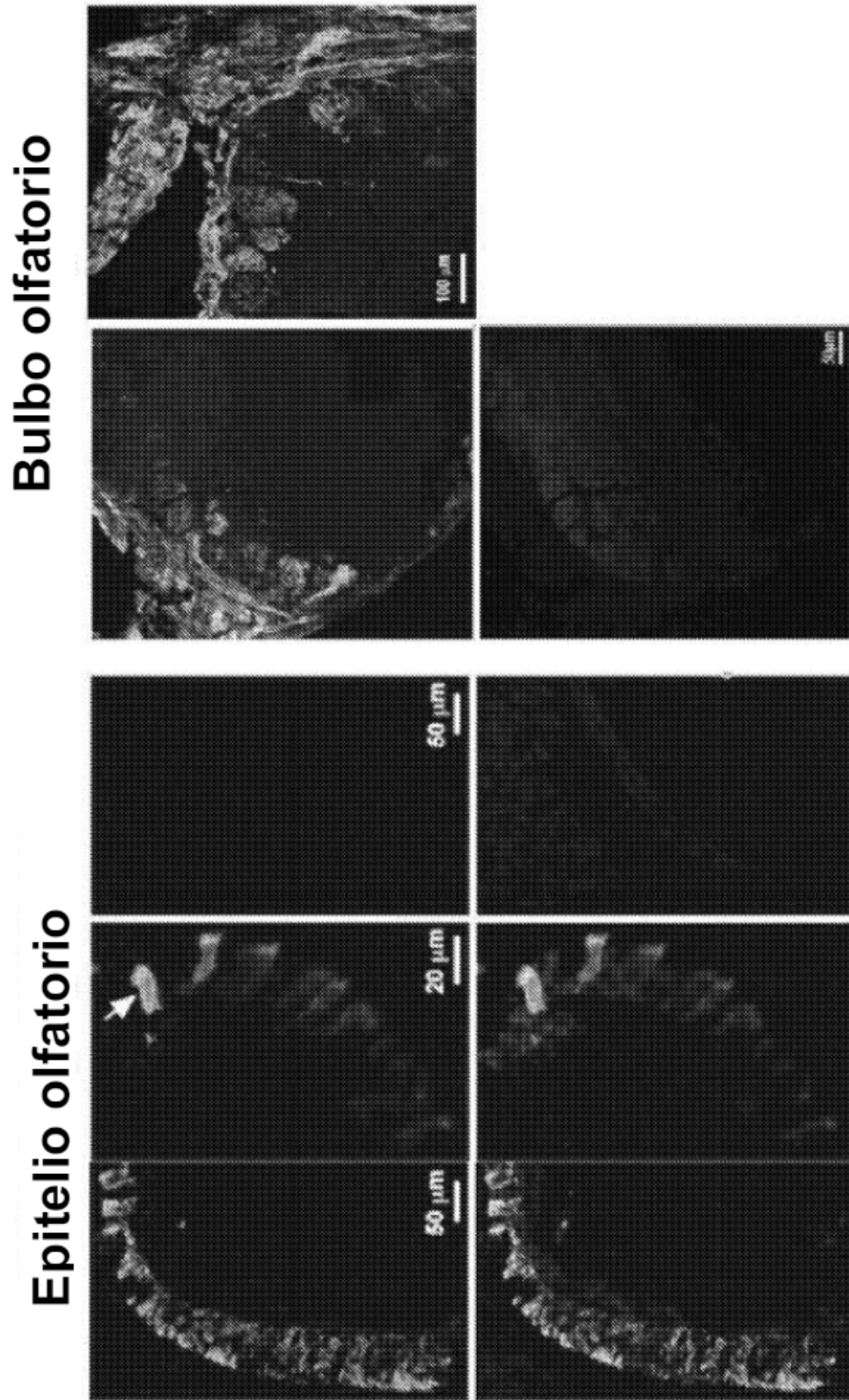


Figura 26A. Tinción con azul de toluidina para material de almacenamiento

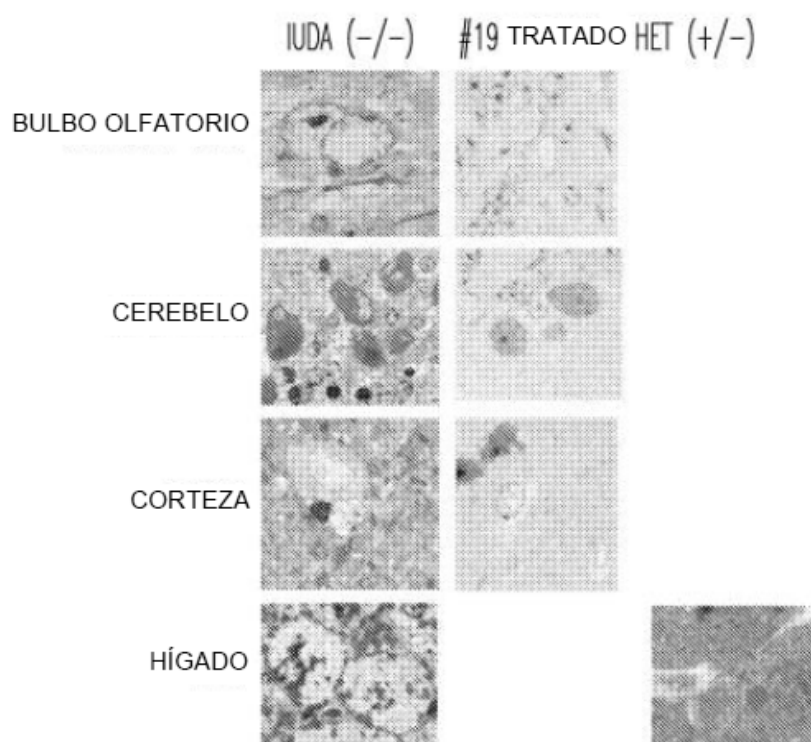
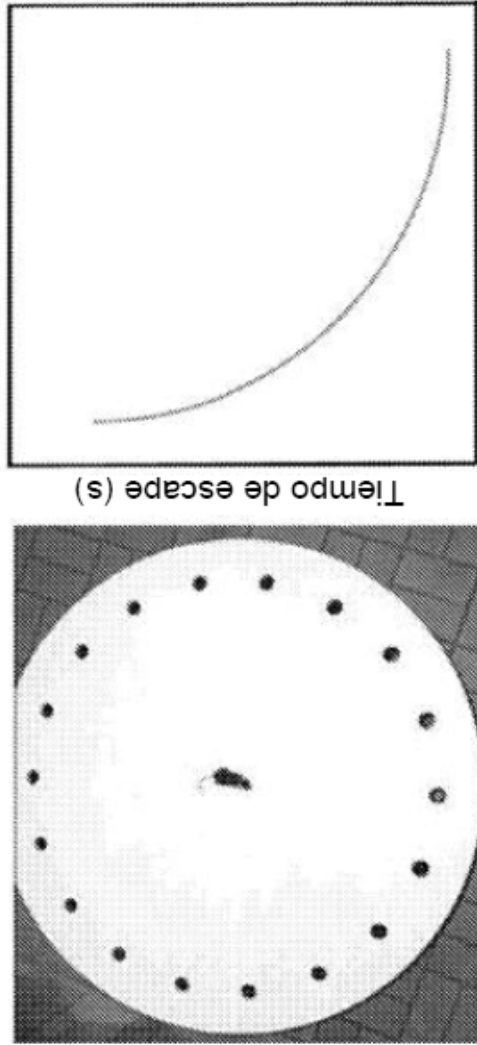


Figura 26B. Resumen de la patología de tejidos

# Ratón	Tratamiento	Hipotálamo	Cerebelo	Corteza	Cuerpo Estriado	Bulbo olfatorio	M/T/TE	Pulmones	Hígado
Het (+/-)	Control	+S	++S	0	+S	+S	0	0	0
19	Tratado IN	+S	0	+S	++S	+S	+S	+S	0
MPSI(-/-)	Control	+M	+++L	+M	+M	++M	+M	++M	++++M

0, sin vacuolas citoplasmáticas
 +, vacuolas citoplasmáticas en <10 % células
 ++, vacuolas citoplasmáticas en 10-25 % células
 +++, vacuolas citoplasmáticas en 25-50 % células
 ++++, vacuolas citoplasmáticas en >50 % células

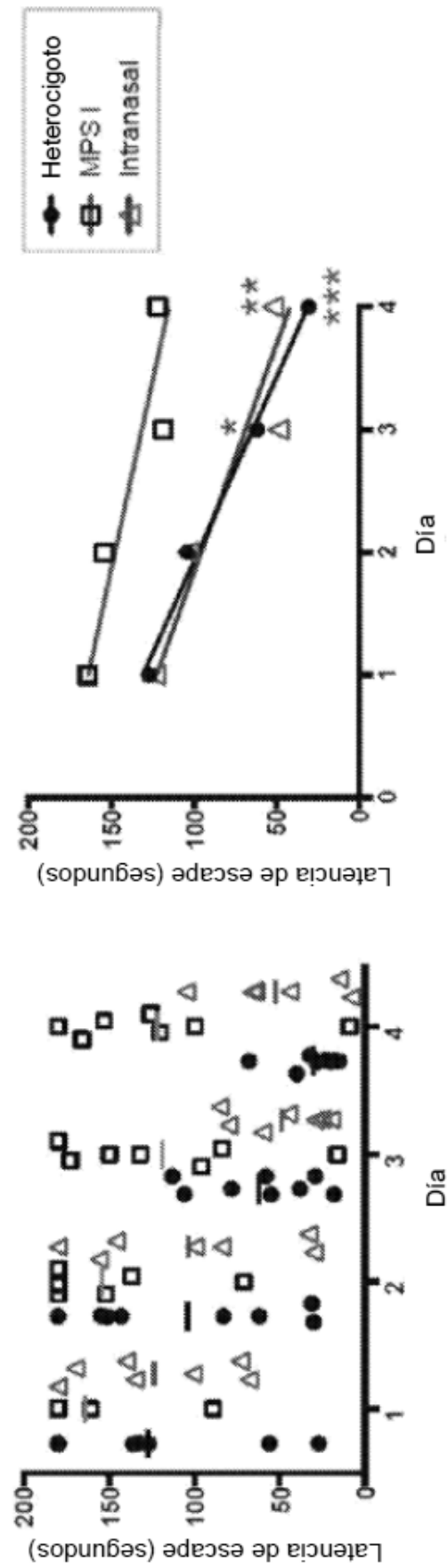
Figura 26C. Laberinto de Barnes: Aprendizaje y reconocimiento espacial



Días de entrenamiento

TODOS LOS ORIFICIOS EN EL LABERINTO ESTÁN BLOQUEADOS EXCEPTO 1 ORIFICIO. ESTE ES EL ORIFICIO DE ESCAPE. LOS RATONES TIENEN QUE ENCONTRAR EL ORIFICIO DE ESCAPE.
6 ENSAYOS POR DÍA DURANTE 4 DÍAS

Figura 26D. Laberinto de Barnes: Aprendizaje y reconocimiento espacial



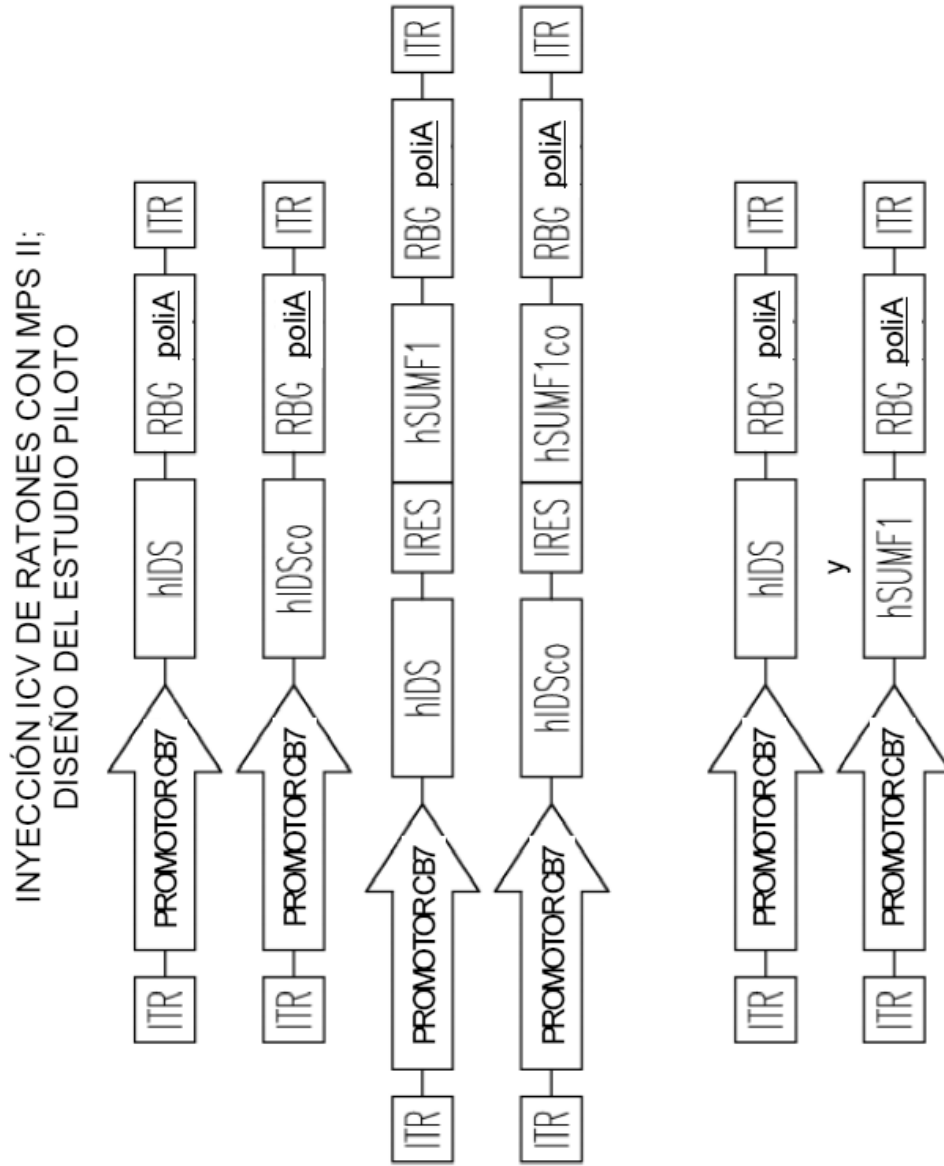


Figura 27A

EVALUACIÓN DE VECTOR IDS IN VIVO

VECTOR DE AAV	CEPA DE RATÓN	VÍA DE ADMINISTRACIÓN
NO TRATADO	NOD.Scid (IDS +)	IT
AAV9.hIDS	NOD.Scid (IDS +)	IT
AAV9.hIDSco	NOD.Scid (IDS +)	IT
AAV9.IDS-SUMF1	NOD.Scid (IDS +)	IT
AAV9.IDSco-SUMF1co	NOD.Scid (IDS +)	IT
AAV9.hIDS	C57BL/6 (IDS +)	IT
AAV9.hIDS	C57BL/6 (IDS +)	IV

Figura 27B

PERSISTENTE, ALTOS NIVELES DE ACTIVIDAD DE IDS EN PLASMA

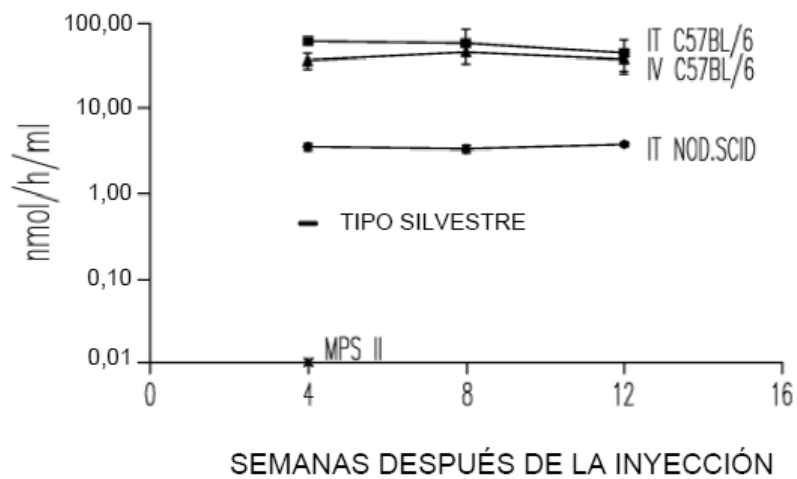


Figura 28

SIN AUMENTO EN LA ACTIVIDAD DE IDS EN EL CNS MÁS ALTA
QUE EN EL TIPO SILVESTRE DESPUÉS DE LA INYECCIÓN
INTRATECAL DE VECTORES AAV9-IDS

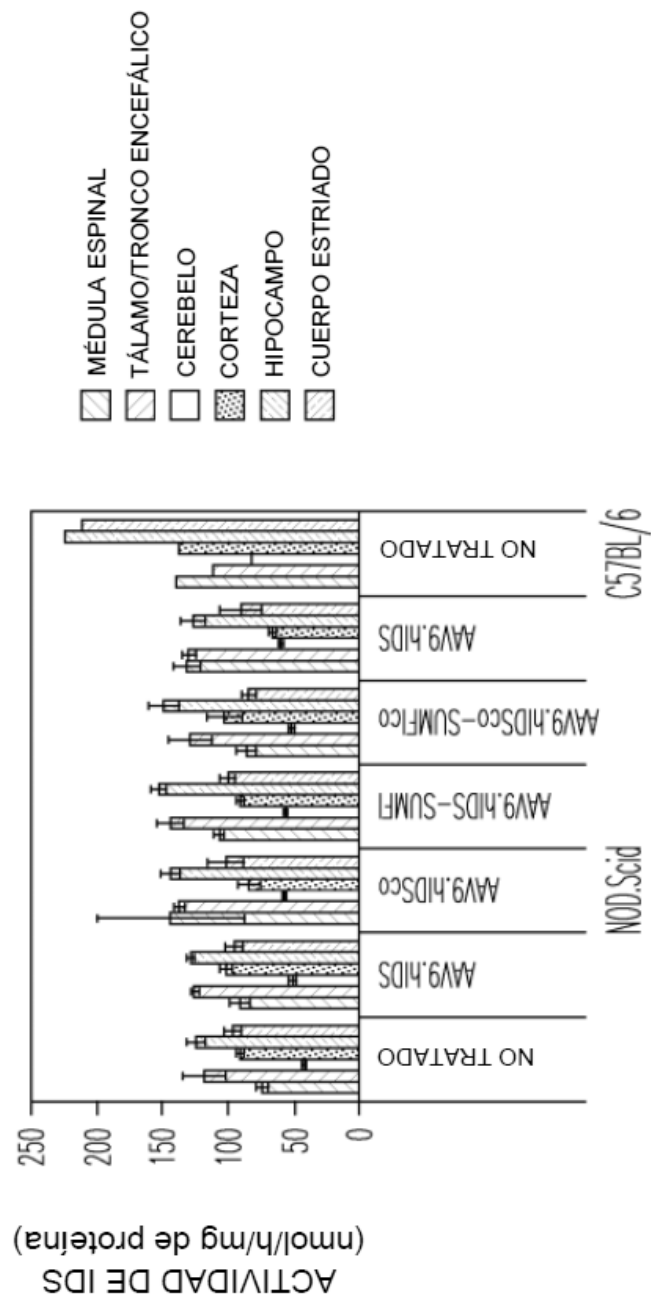


Figura 29

NIVELES DE TIPO SILVESTRE DE IDS EN EL CNS DESPUÉS DE LA INYECCIÓN ICV DE VECTORES AAV9-IDS

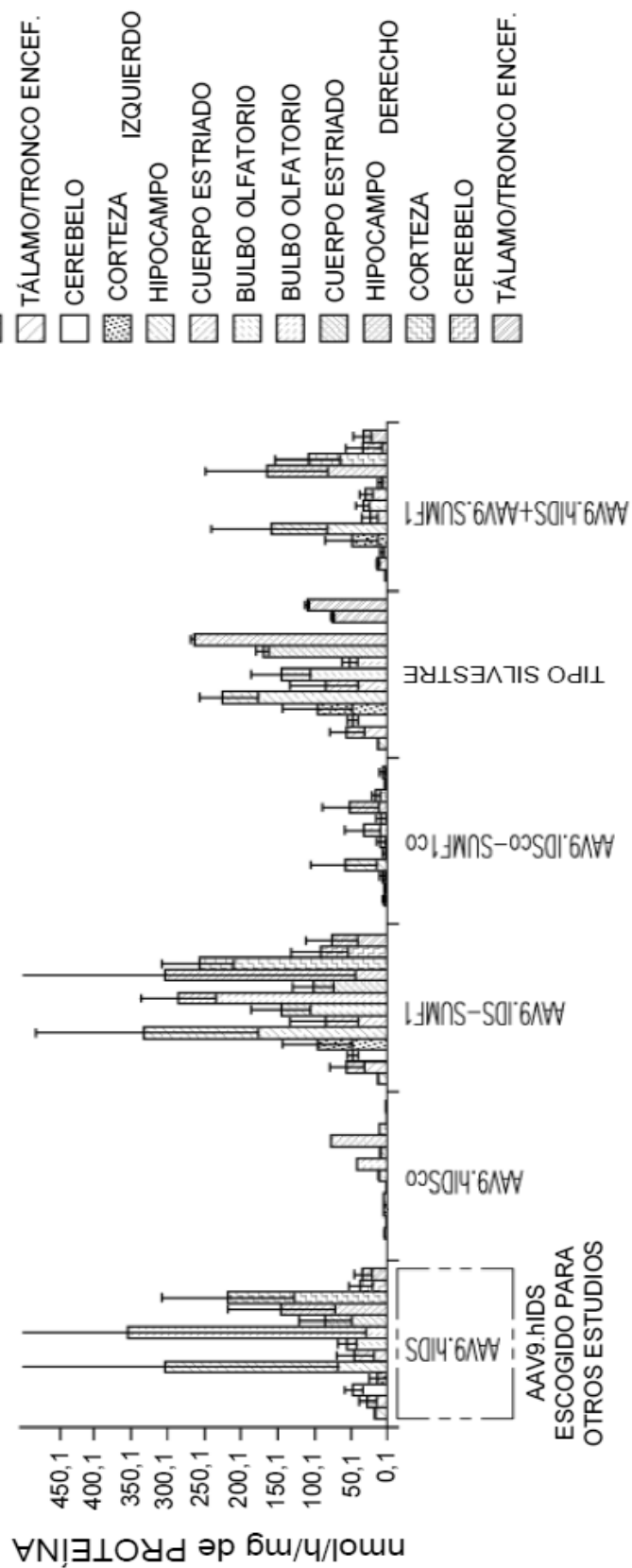


Figura 30A

NIVELES SORPRENDENTEMENTE ALTOS DE ACTIVIDAD DE IDS EN EL PLASMA DE RATONES INYECTADOS ICV

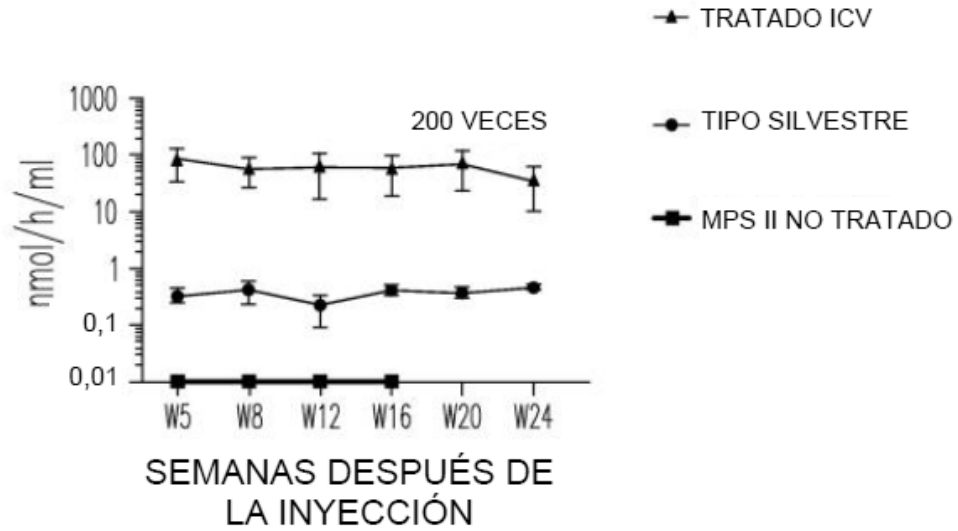


Figura 30B

NIVELES SORPRENDENTEMENTE ALTOS DE ACTIVIDAD DE IDS EN ÓRGANOS PERIFÉRICOS DE RATONES INYECTADOS ICV

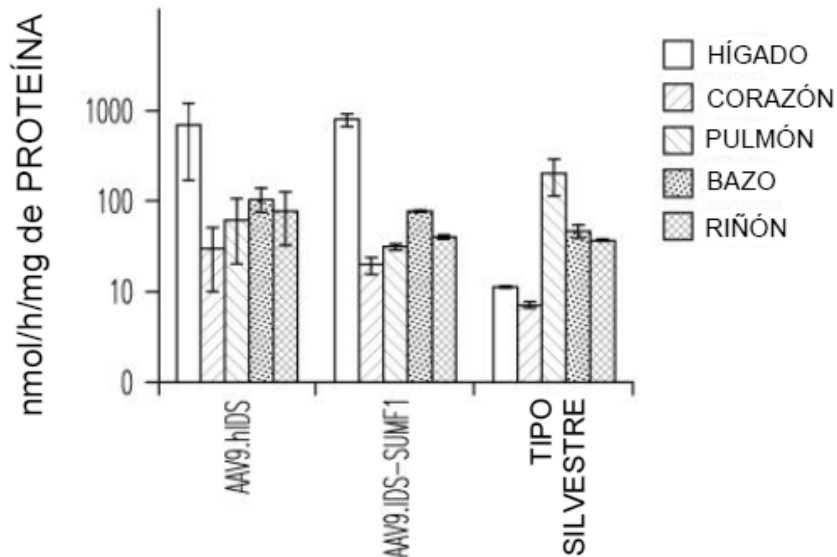


Figura 30C

CONTENIDO DE GAG REDUCIDO EN EL CNS DE ANIMALES INYECTADOS ICV

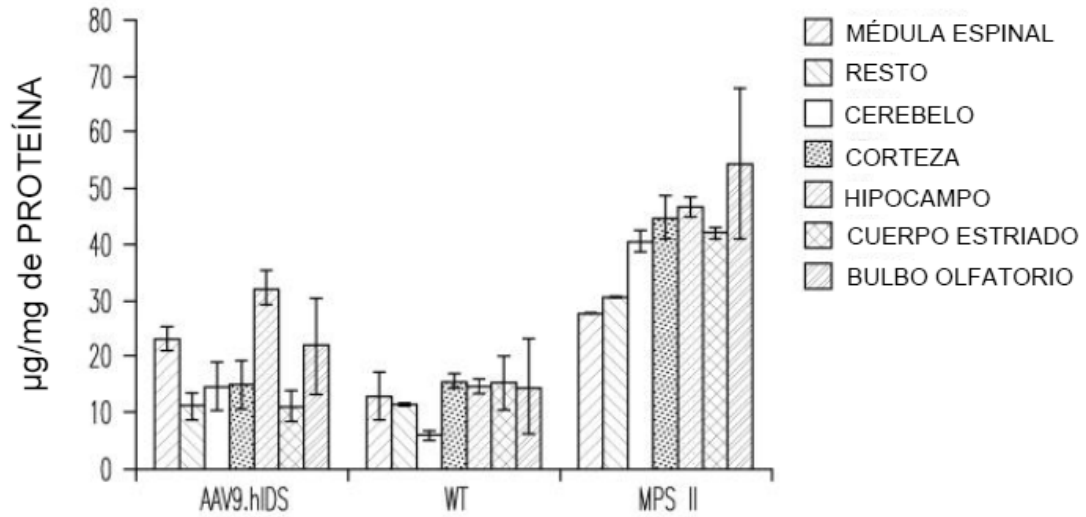


Figura 30D

LABERINTO DE BARNES

OBJETIVO: EVALUAR LA MEMORIA Y LA NAVEGACIÓN ESPACIAL

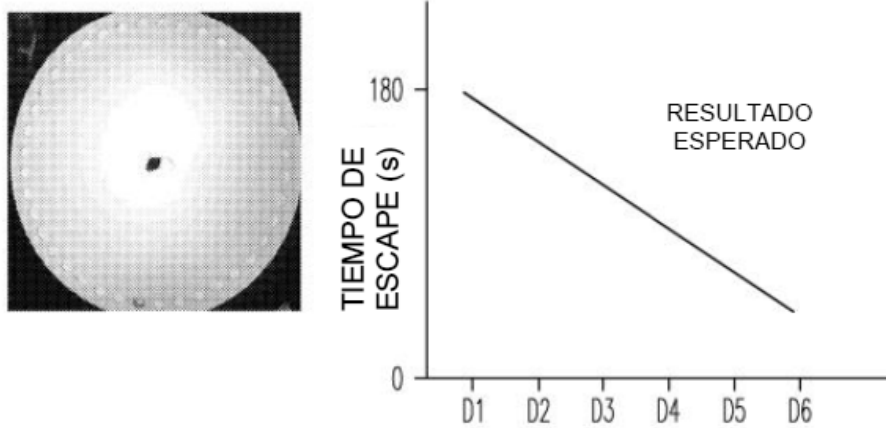


Figura 31A

DESEMPEÑO EN EL DÍA 1

DESEMPEÑO EN EL DÍA 4

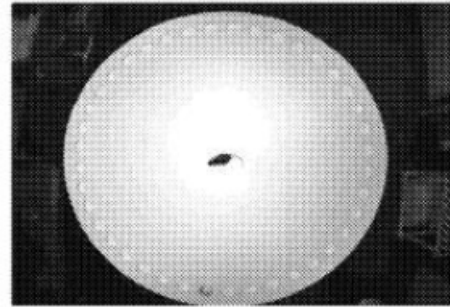
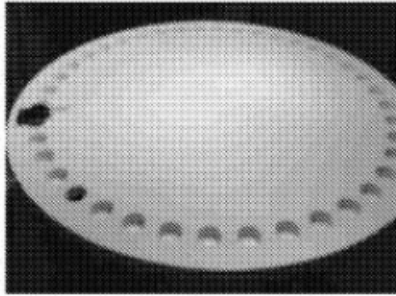


Figura 31B

RATONES CON MPS II MUESTRAN DÉFICIT
NEUROLÓGICO A LA EDAD DE 6 MESES

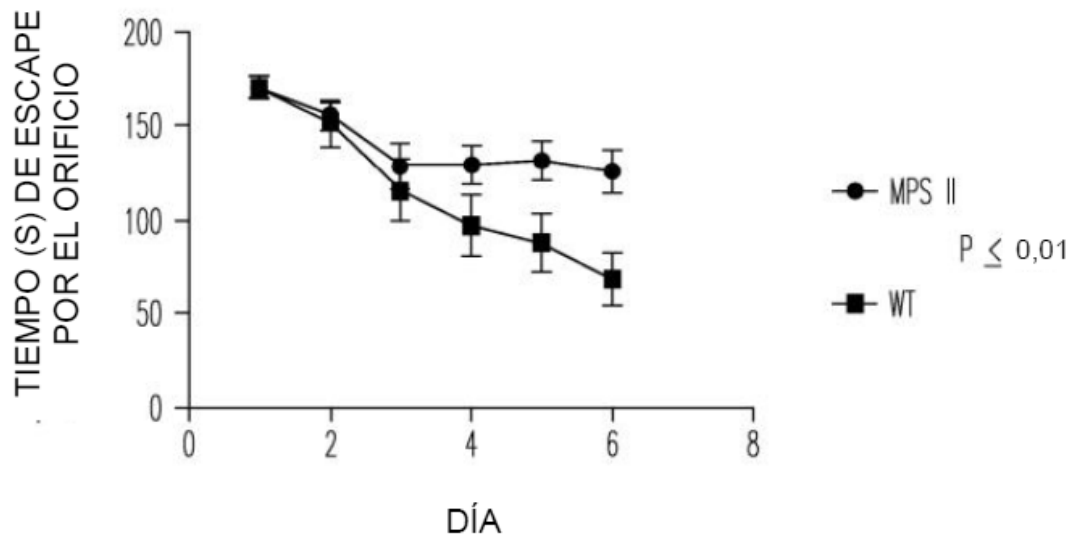


Figura 32

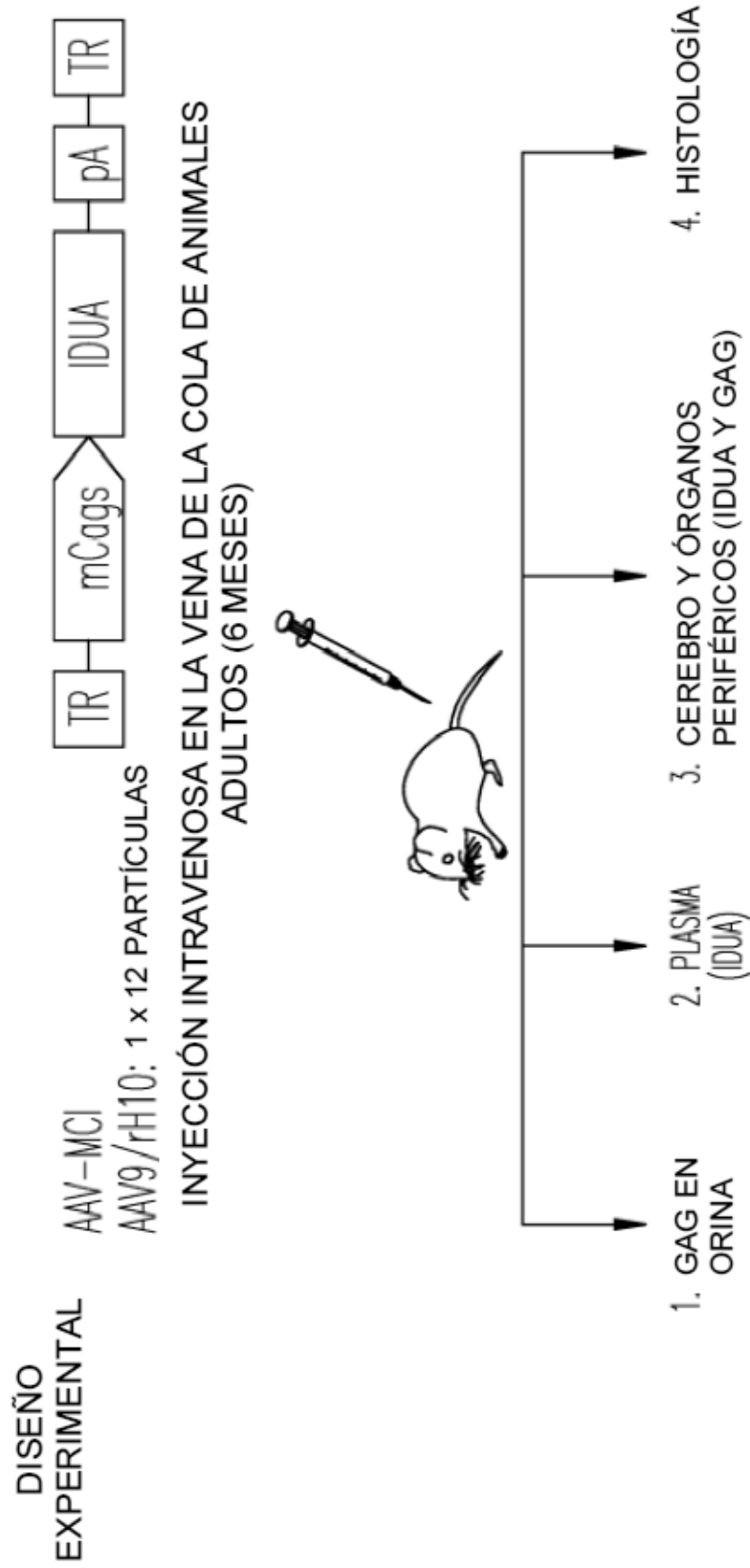


Figura 33

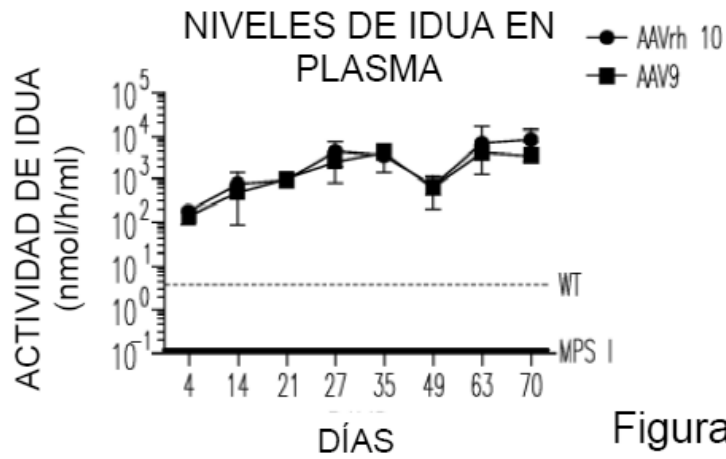


Figura 34A

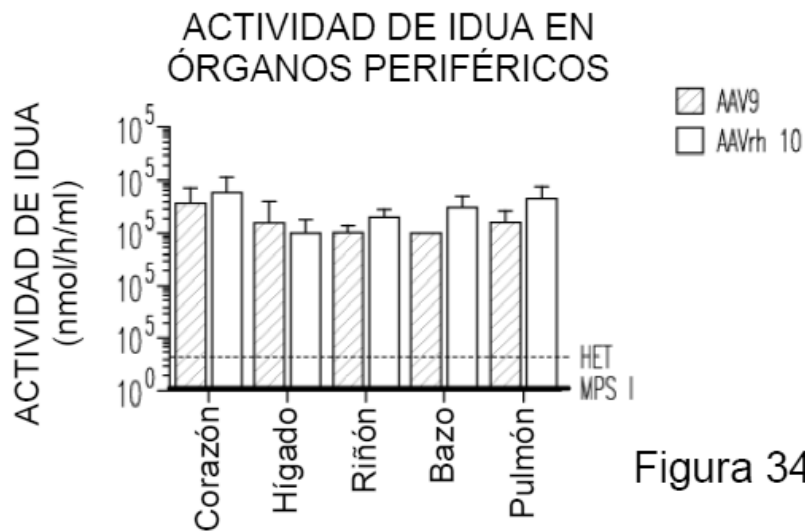


Figura 34B

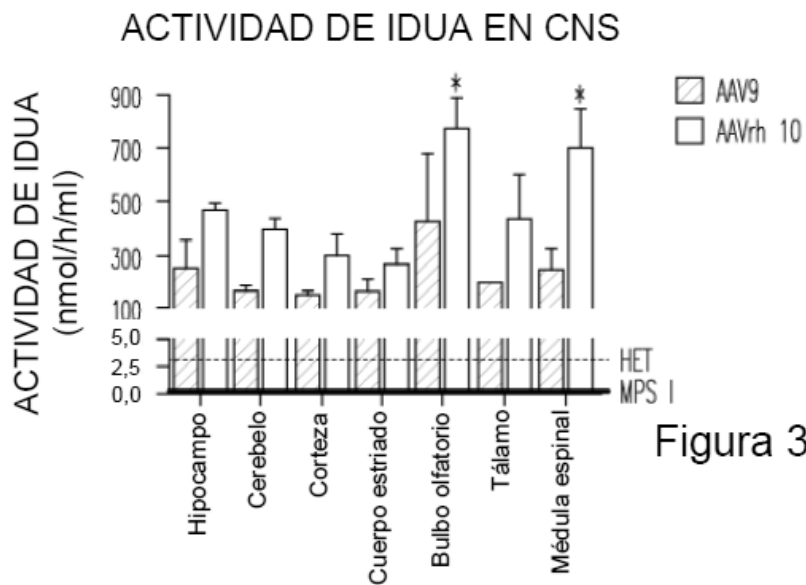


Figura 34C

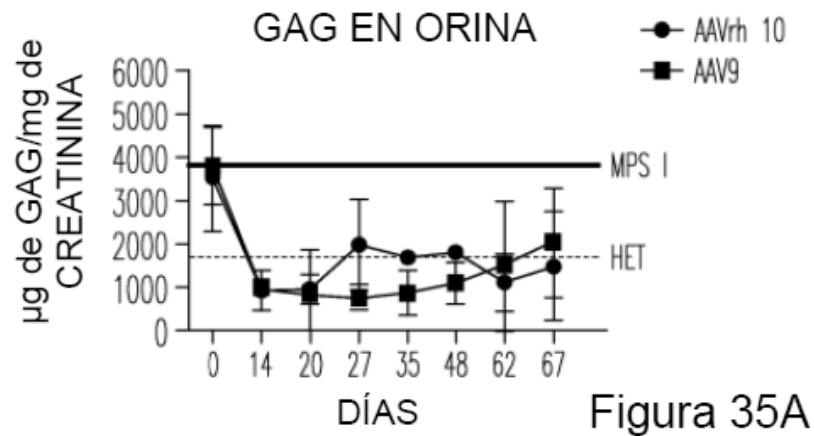


Figura 35A

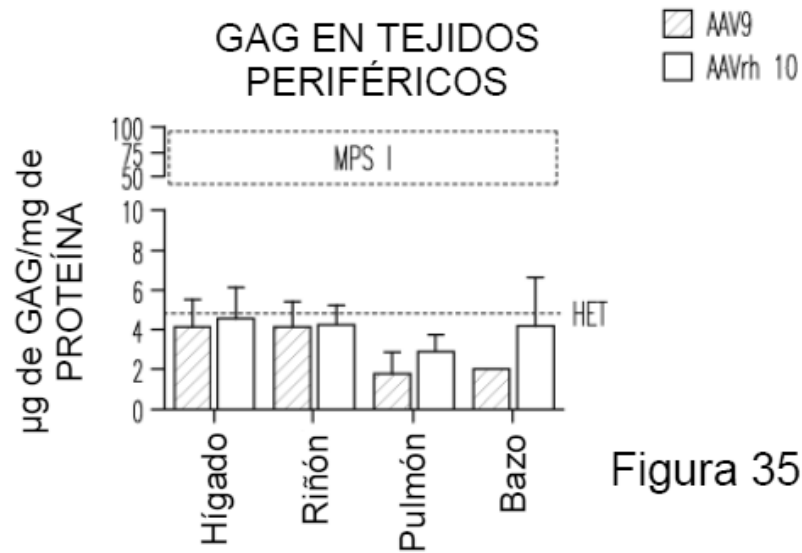


Figura 35B

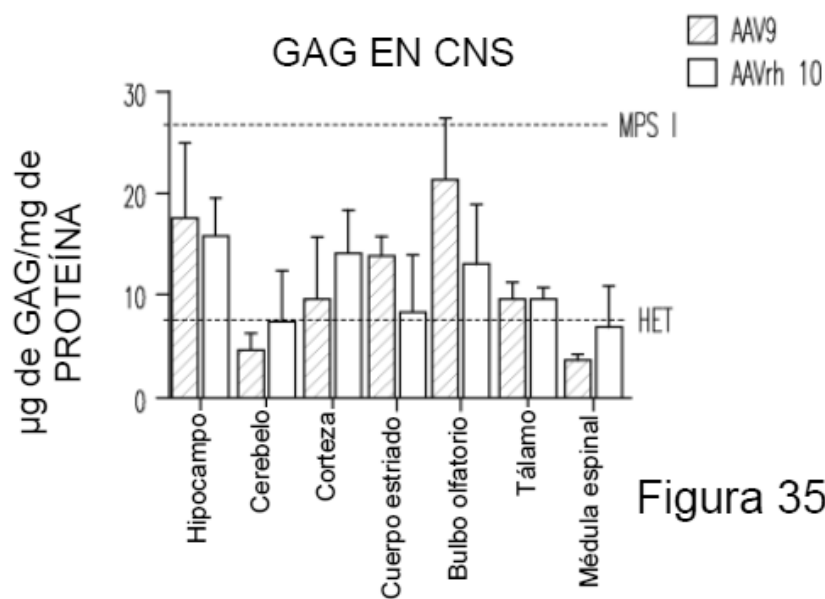


Figura 35C

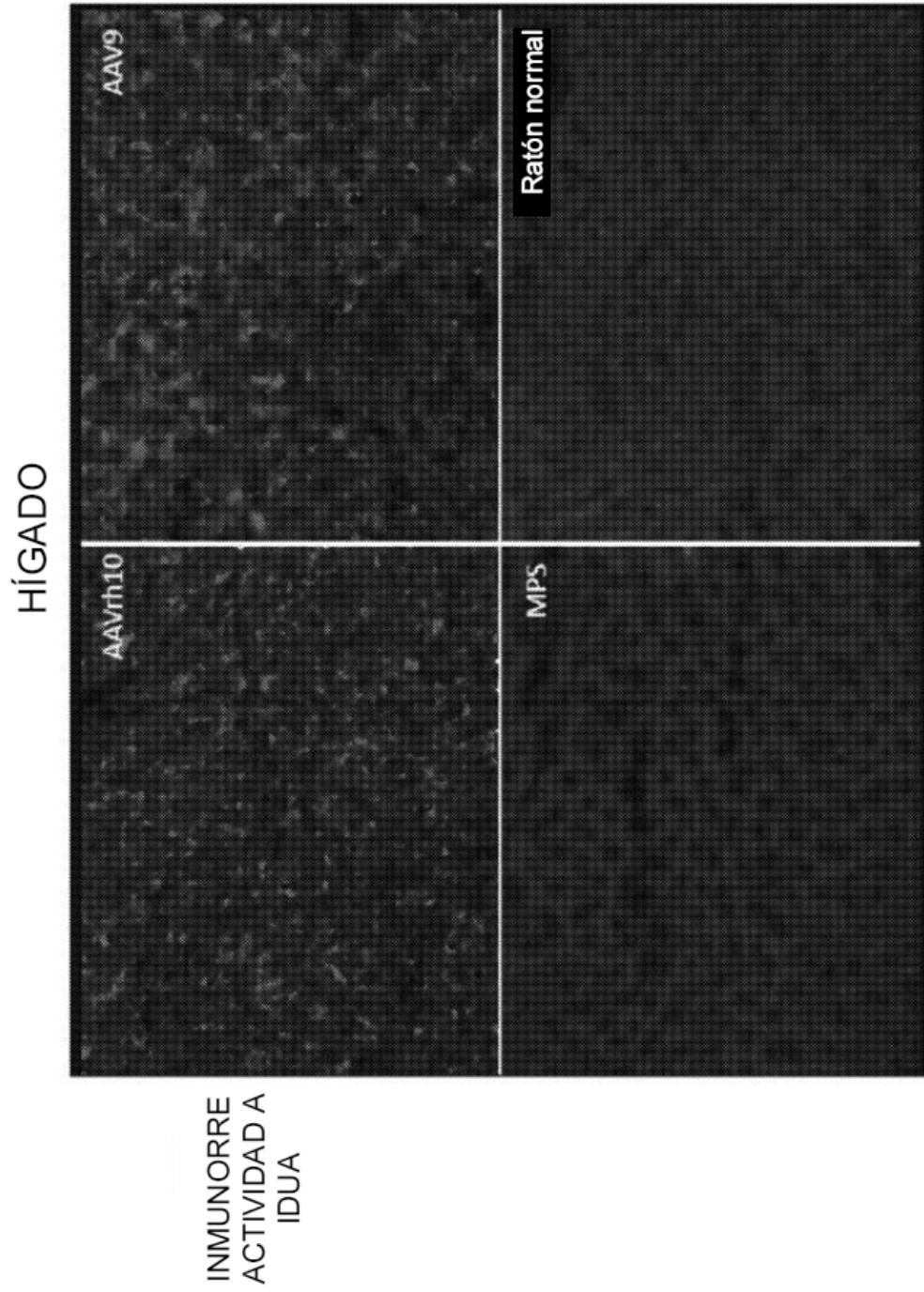


Figura 36A

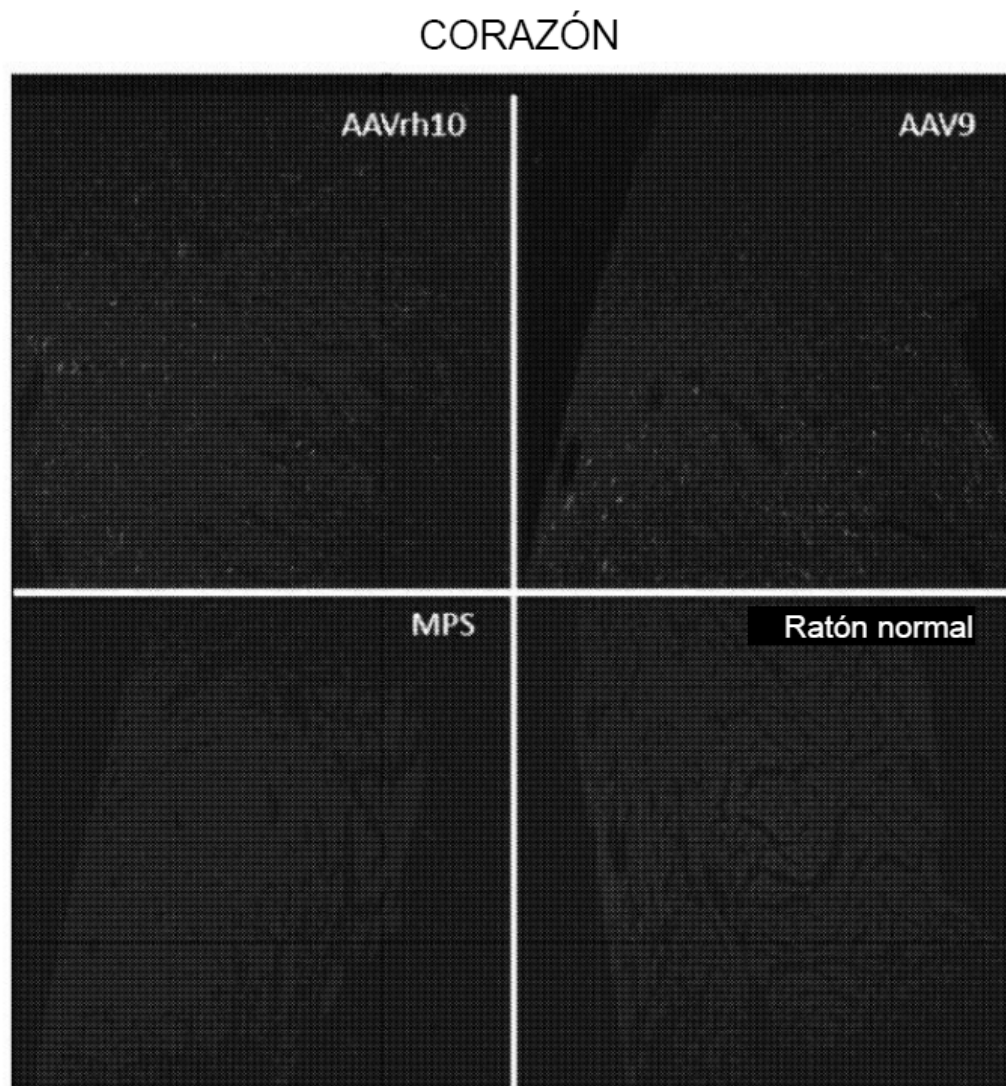


Figura 36B

PULMÓN

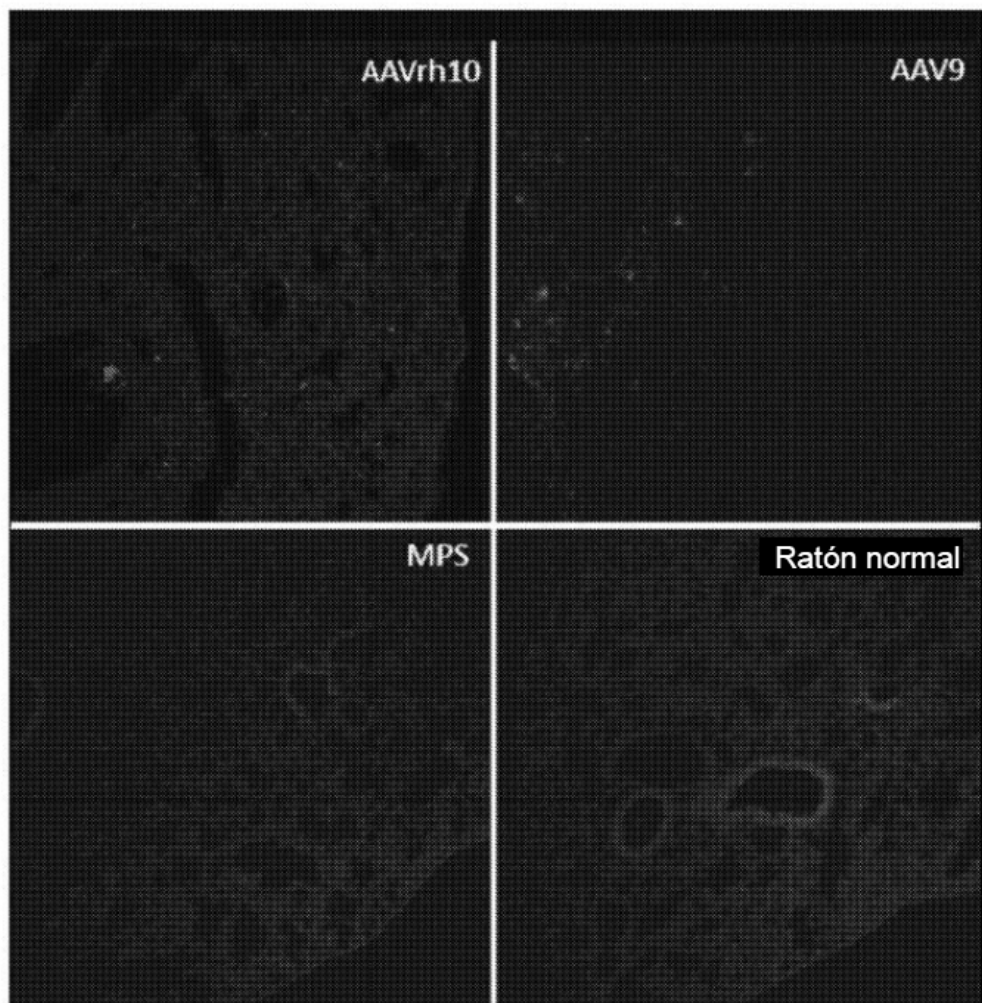


Figura 36C

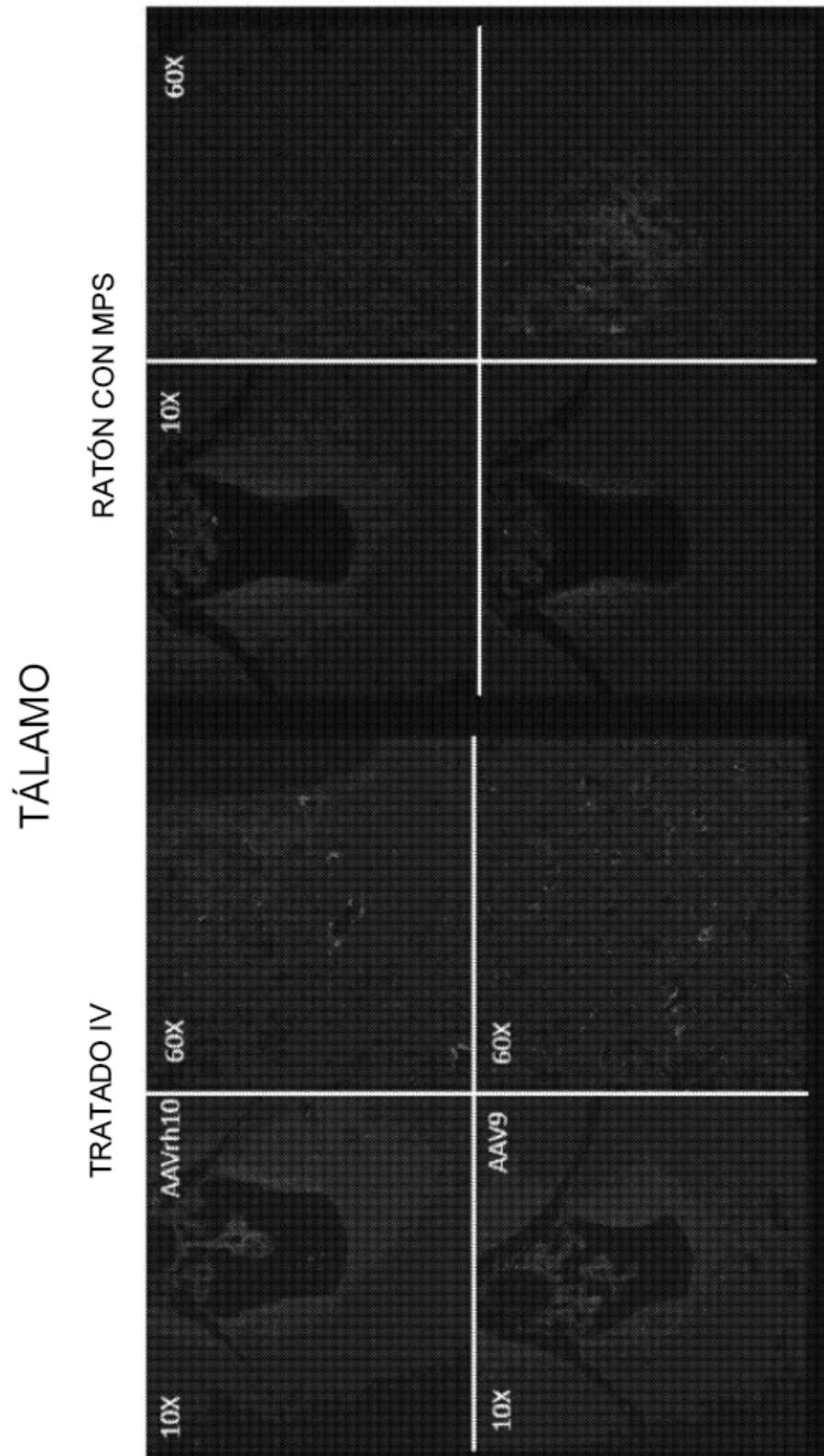


Figura 36D

HIPOCAMPO

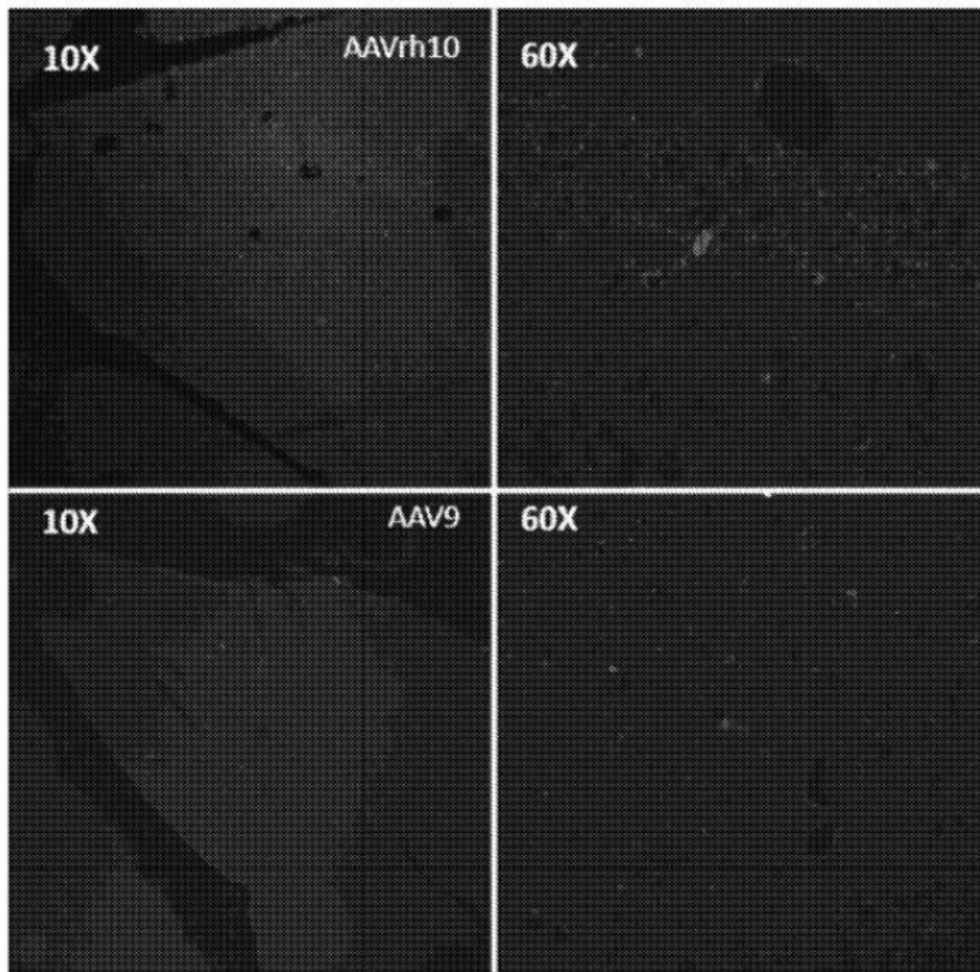


Figura 36E

CEREBELO

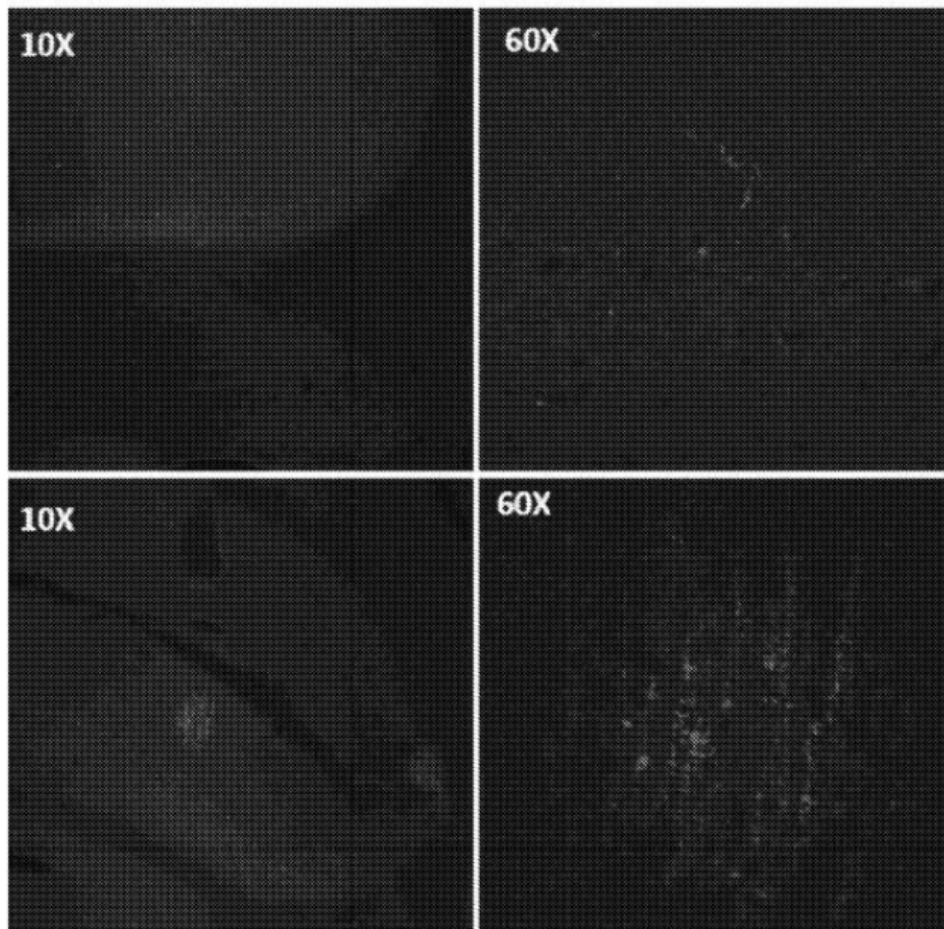


Figura 36F

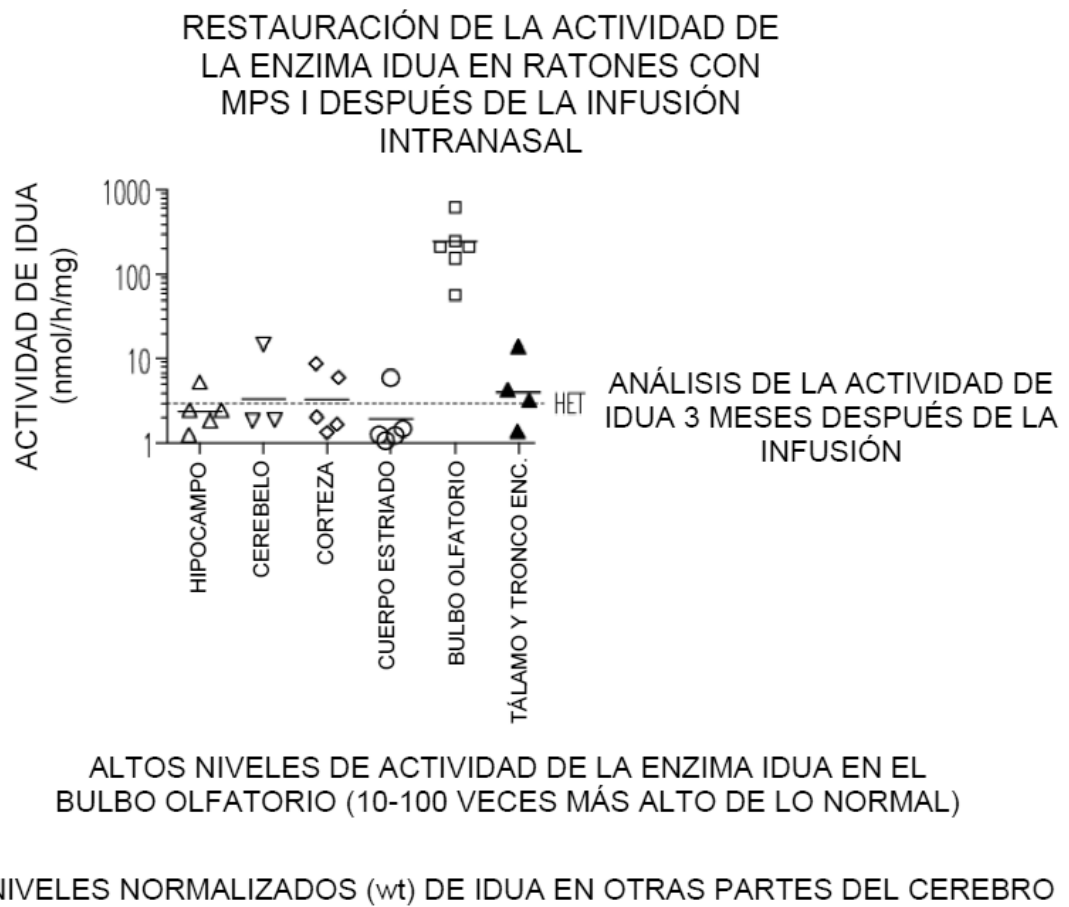


Figura 37

Reducción del material de almacenamiento en ratones tratados

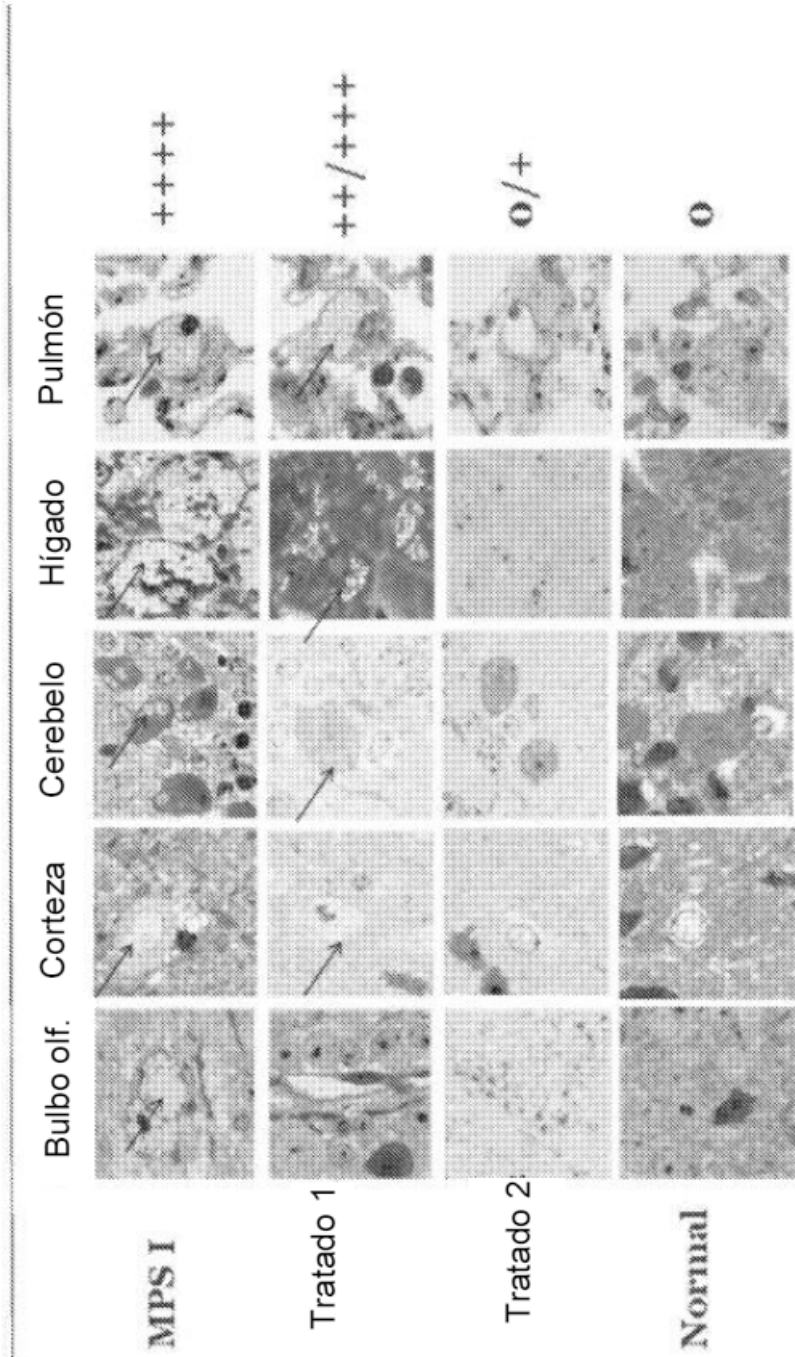
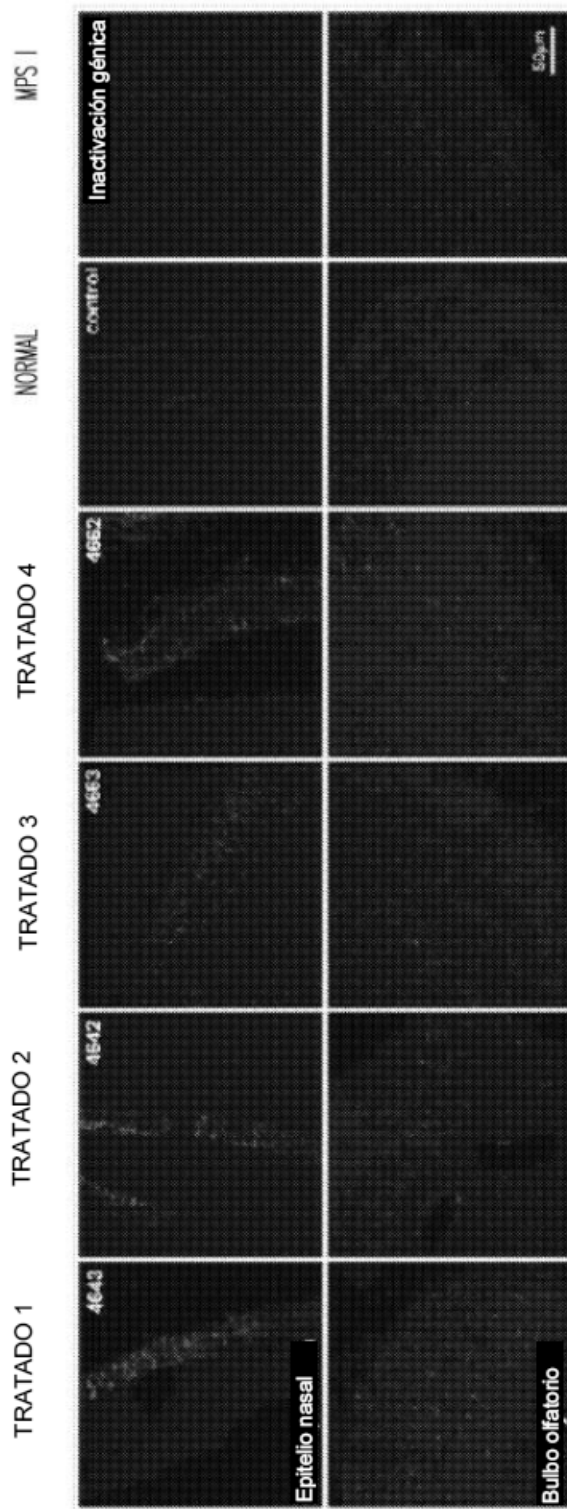


Figura 38

INMUNOFLUORESCENCIA DE IDUA
OBSERVADA SOLO EN EL BULBO OLFATORIO
EN EL CEREBRO



NO SE OBSERVÓ TRANSDUCCIÓN EN NINGUNA PARTE DEL CEREBRO.
EL BULBO OLFATORIO ES UN DEPÓSITO DE ALMACENAMIENTO PARA LA
DIFUSIÓN DE IDUA HACIA OTRAS PARTES DEL CEREBRO

Figura 39A

INMUNOFUORESCENCIA DE GFP EN EL
EPITELIO OLFATORIO

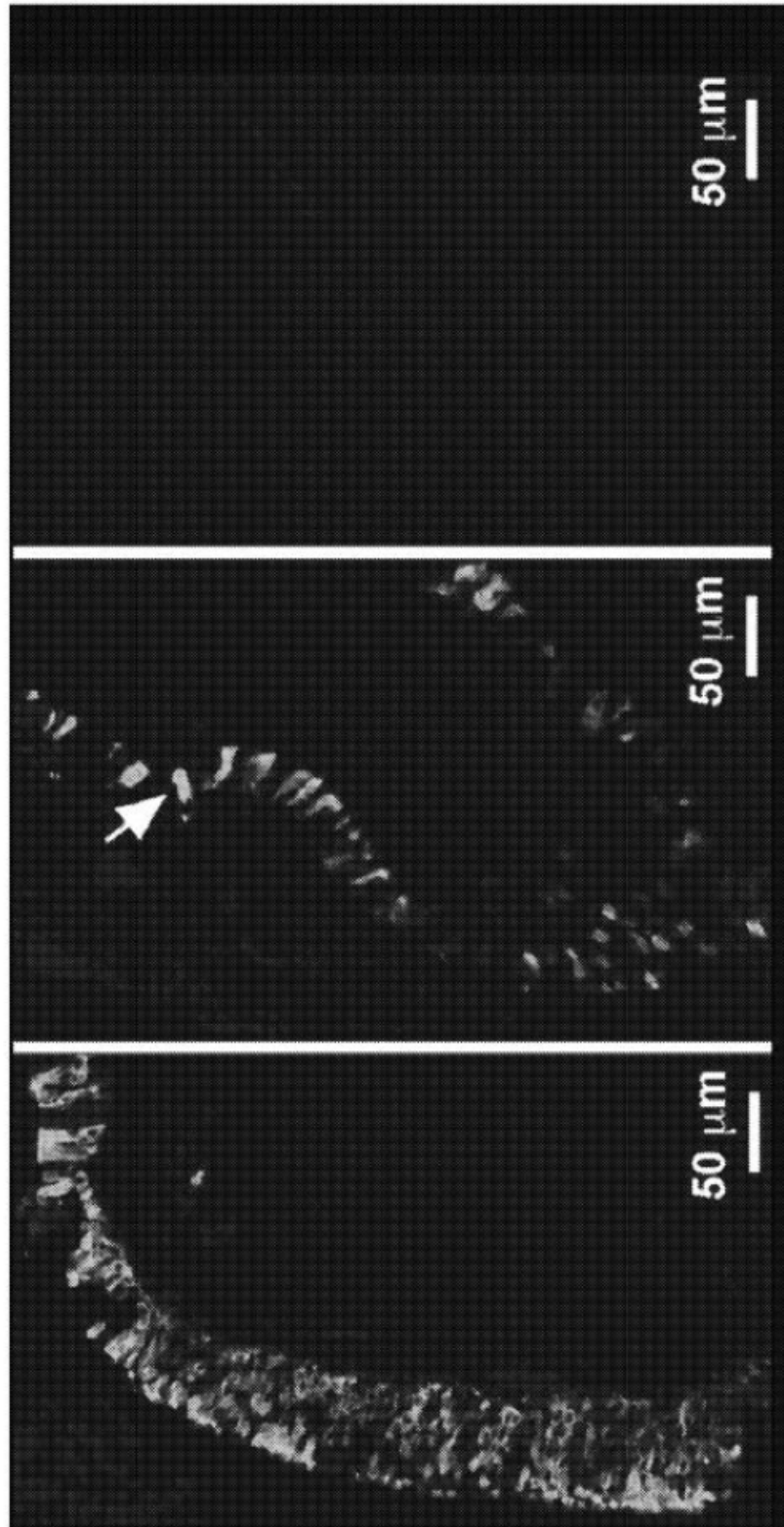


Figura 39B

INMUNOFLOURESCENCIA DE GFP OBSERVADA
SOLO EN EL BULBO OLFATORIO EN EL
CEREBRO

BULBO OLFATORIO

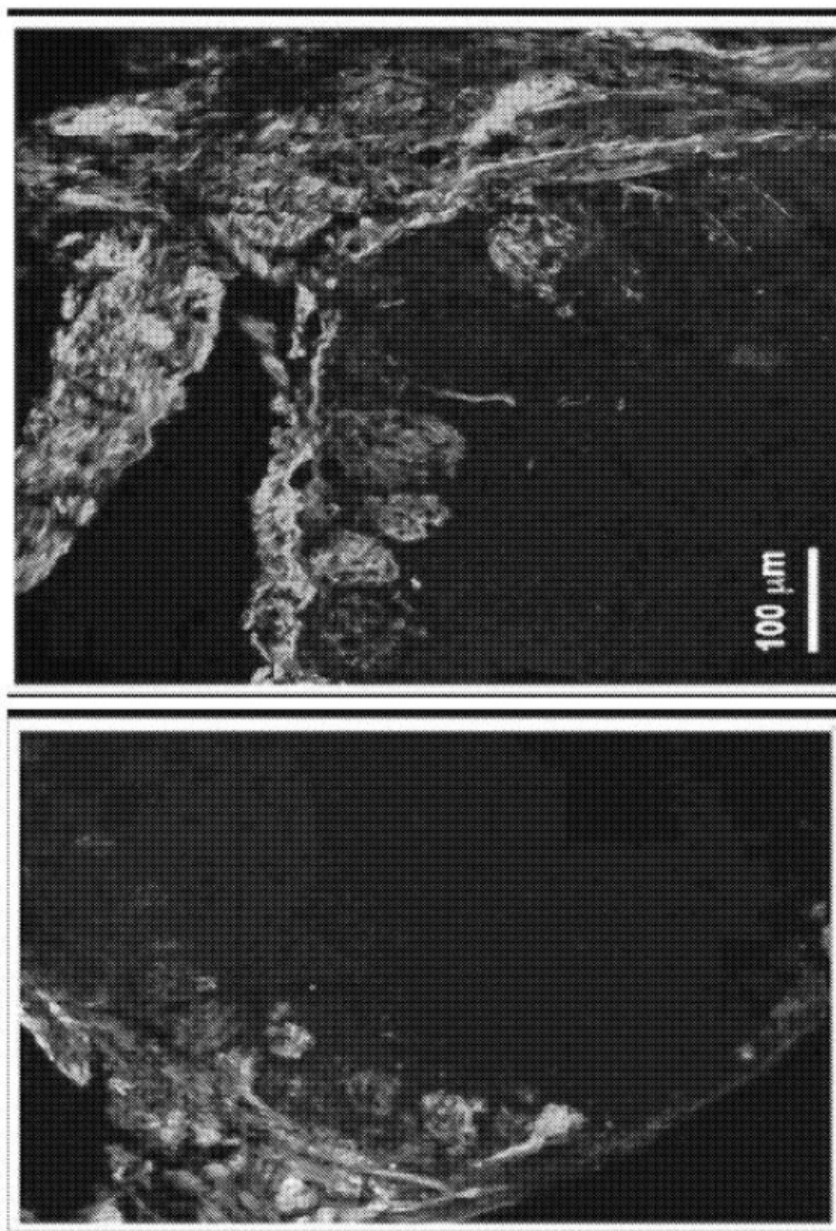


Figura 39C

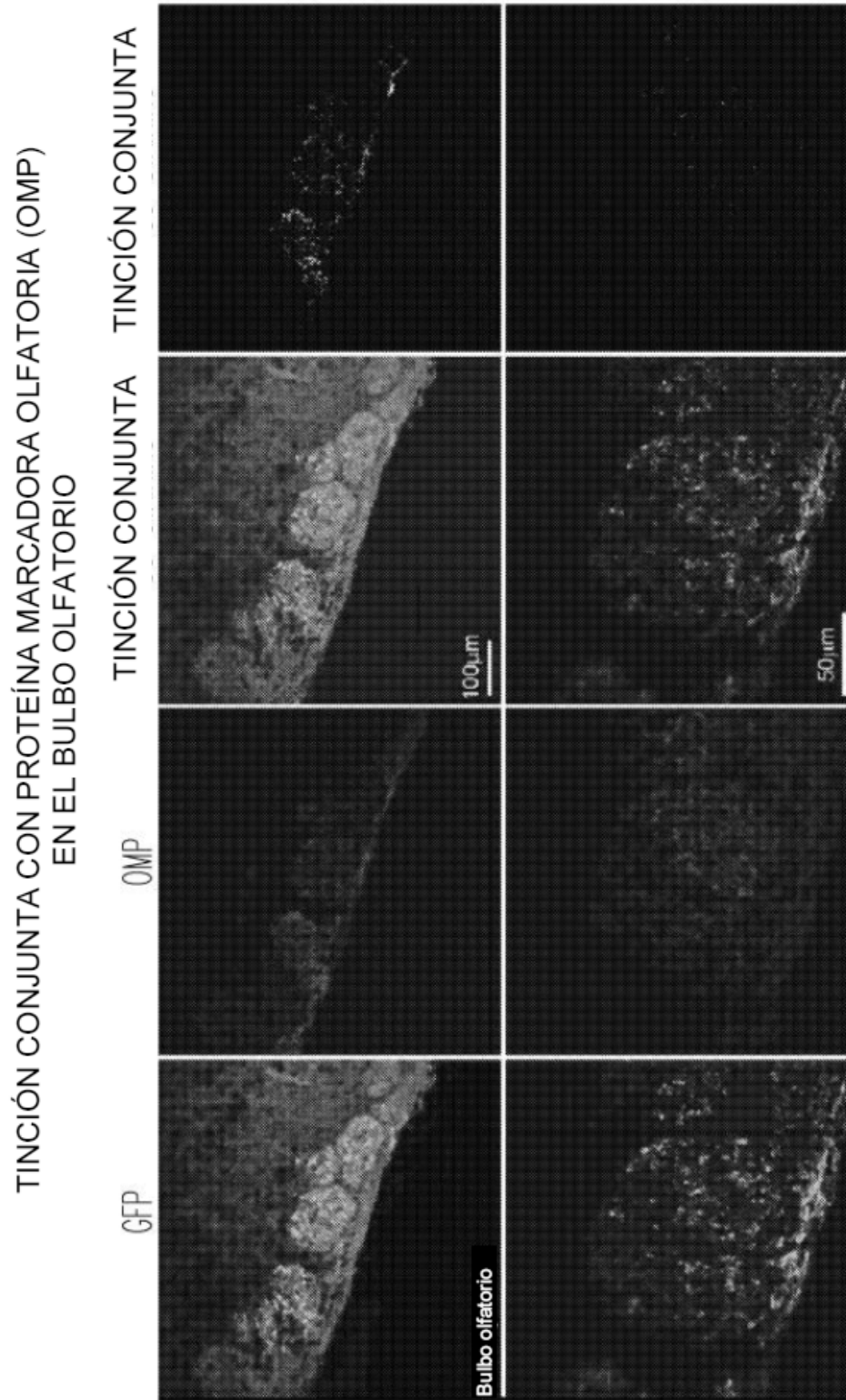
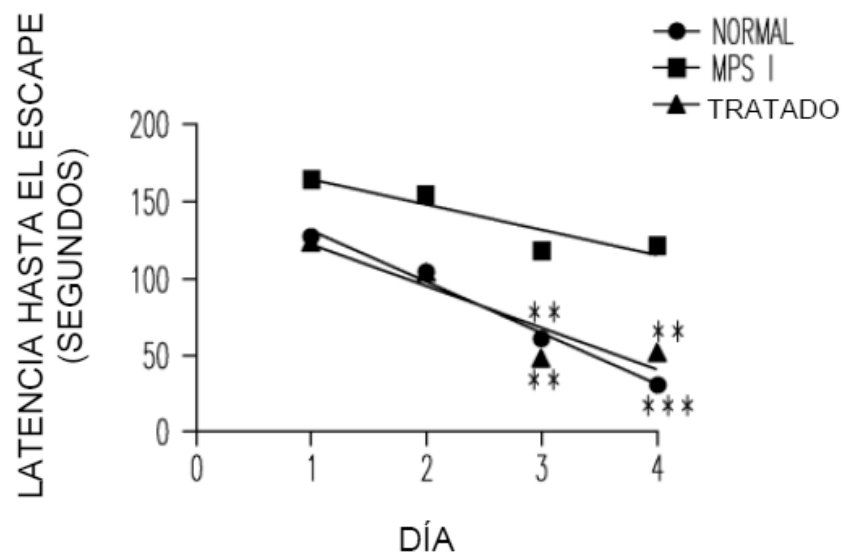


Figura 39D

FUNCIÓN NEUROCOGNITIVA
MEJORADA EN ANIMALES TRATADOS
POR VÍA INTRANASAL



LOS RATONES TRATADOS TIENEN UNA
HABILIDAD DE APRENDIZAJE ESPACIAL
MEJORADA SIGNIFICATIVAMENTE

** P<0,001
*** P<0,0001

Figura 40

PERFILES NEUROQUÍMICOS DE CEREBELO DE RATONES CON MPS (TRATADOS CON LARONIDASA)

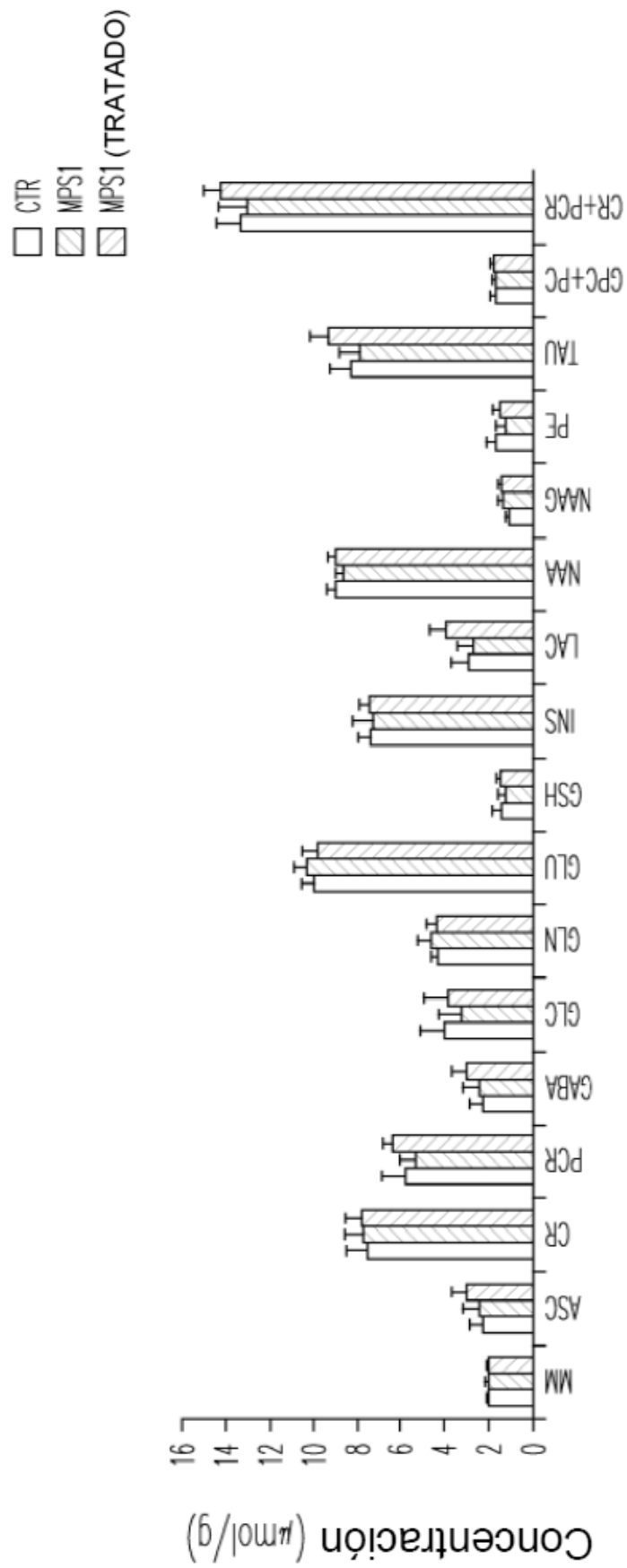


Figura 41A

PERFILES NEUROQUÍMICOS DE HIPOCAMPO DE RATONES CON MPS
(TRATADOS CON LARONIDASA)

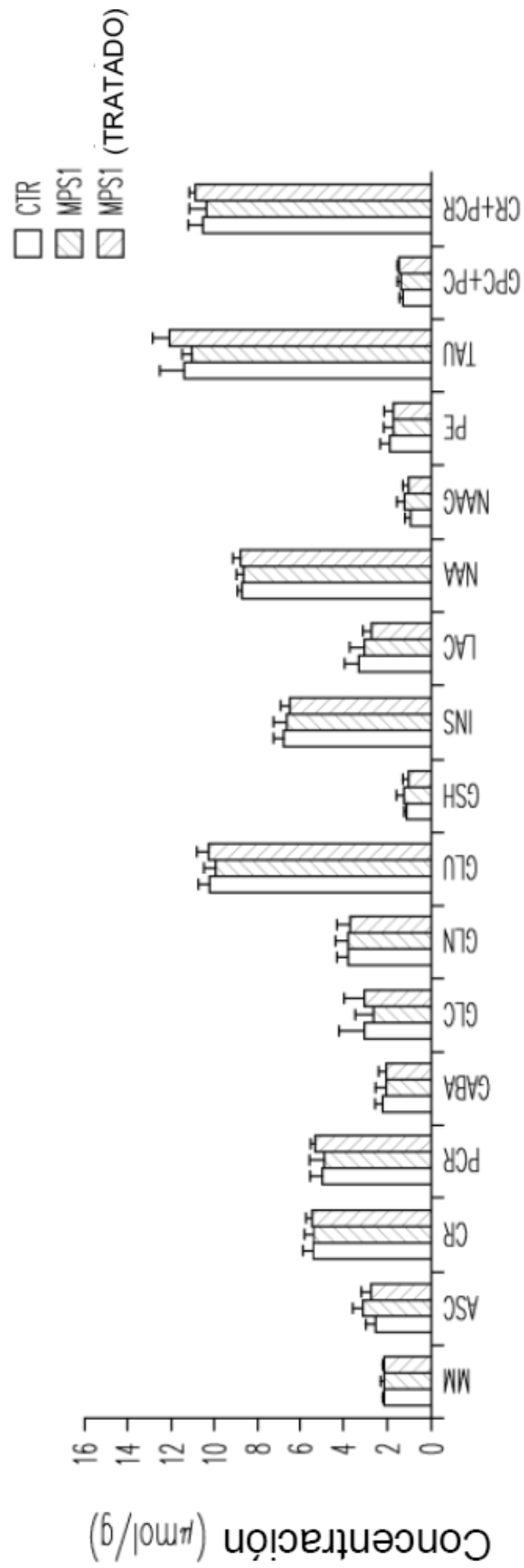


Figura 41B

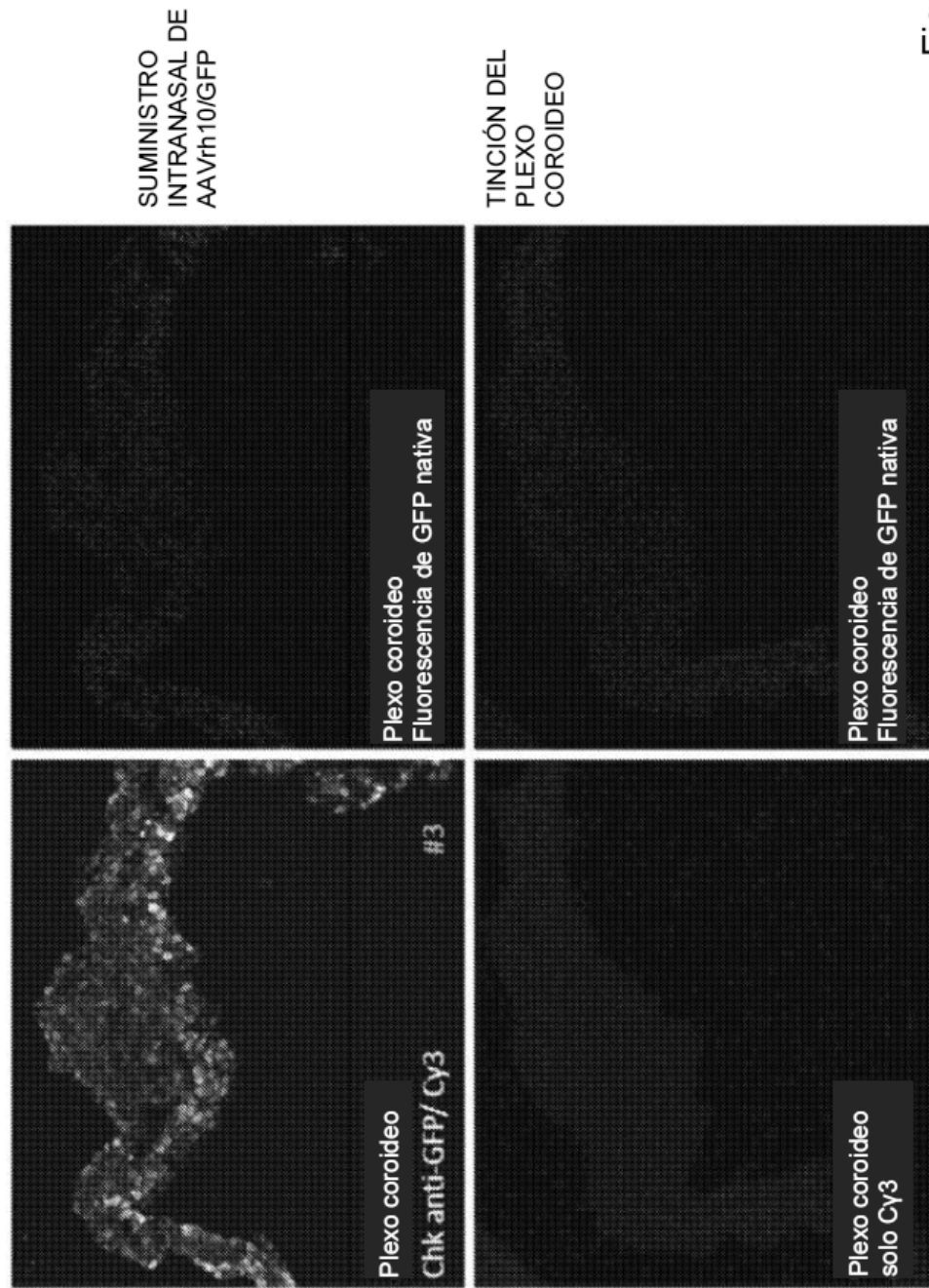


Figura 42