



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 326 893**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 51/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05017045 .5**

(96) Fecha de presentación : **26.05.1999**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1621626**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2006**

(54) Título: **Vectores AAV para la fabricación de medicamentos para administración potenciada por convección.**

(30) Prioridad: **27.05.1998 US 86949 P**
18.05.1999 US 134748 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.10.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.10.2009

(73) Titular/es: **Genzyme Corporation**
500 Kendall Street
Cambridge, Massachusetts 02142, US
The Regents of The University of California

(72) Inventor/es: **Bankiewicz, Krys;**
Cunningham, Janet y
Eberling, Jamie

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 326 893 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

Vectores AAV para la fabricación de medicamentos para la administración potenciada por convección.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a la administración eficaz de vectores virales al SNC. Más particularmente, la presente invención se refiere a terapia génica para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central (SNC), particularmente aquellos trastornos que involucran el neurotransmisor dopamina.

10 **Antecedentes de la invención**

Las afecciones del SNC son temas de gran importancia en la salud pública. Sólo la enfermedad de Parkinson (PD) afecta a más de un millón de personas en los Estados Unidos. Clínicamente, la PD se caracteriza por una disminución en los movimientos espontáneos, dificultad en el andar, inestabilidad postural, rigidez y temblor. La enfermedad de Parkinson es causada por la degeneración de las neuronas pigmentadas en la sustancia nigra del cerebro, lo que da como resultado una disponibilidad disminuida de dopamina. El metabolismo alterado de la dopamina también ha estado implicado en pacientes esquizofrénicos que muestran incrementos de dopamina en ciertas áreas del cerebro.

Actualmente, muchas afecciones del SNC tal como el PD se tratan por medio de administración sistémica de un agente terapéutico. La administración sistémica, sin embargo, a menudo es ineficiente debido a la incapacidad del fármaco de atravesar la barrera hematoencefálica y debido a que muchos fármacos provocan efectos secundarios periféricos. Por esto, muchos compuestos potencialmente útiles, tales como proteínas, no pueden administrarse sistémicamente. Si estos compuestos atraviesan exitosamente la barrera hematoencefálica, pueden también inducir efectos secundarios en el sistema nervioso central. El tratamiento de la PD actualmente incluye la administración oral del precursor de dopamina, L-dopa a menudo en combinación con un compuesto tal como carbidopa, un inhibidor periférico de la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) que descarboxila dopa a dopamina. En la mayoría de los pacientes, sin embargo, la producción de AADC en las regiones afectadas del cerebro se reduce a medida que la PD progresa y, consecuentemente, se requieren mayores y mayores dosis de L-dopa, dejando a los pacientes con beneficios terapéuticos disminuidos y efectos secundarios incrementados.

En vista de las limitaciones de las actuales terapias sistémicas, la administración genética es un procedimiento prometedor para el tratamiento de afecciones del SNC tales como PD. Se han descrito un número de sistemas basados en virus para los objetivos de transferencia genética, tales como sistemas retrovirales que son actualmente los sistemas más ampliamente usados con vectores virales para este objetivo. Para descripciones de diversos sistemas retrovirales, ver por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.219.740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7: 980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1: 5-14; Scarpa y col. (1991) *Virology* 180: 849-852; Burns y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8033-8037; y Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3: 102-109.

Los sistemas con virus adeno asociados (AAV) están emergiendo como los candidatos principales para usar en terapia génica. El AAV es un parvovirus de ADN dependiente de auxiliar (ayudante) que pertenece al género *Dependovirus*. El AAV necesita la infección con un virus ayudante no relacionado, ya sea adenovirus, un herpesvirus o vaccinia, con el fin de que se produzca una infección productiva. El virus ayudante aporta funciones accesorias que son necesarias para la mayoría de etapas en la replicación de AAV. Para una revisión de AAV, ver por ejemplo, Berns and Bohenzky (1987) *Advances in Virus Research* (Academic Press, Inc.) 32: 243-307.

El AAV infecta una gran variedad de tejidos y no ha provocado los efectos citotóxicos y las reacciones inmunes adversas en modelos animales que se vieron con otros vectores virales. (Ver, por ejemplo, Muzyczka, (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158: 97-129; Flotte y col., (1993) *PNAS USA* 90: 10613-10617; Kasseiser y col. (1992) *Gene Therapy* 1: 395-402; Yange y col. *PNAS USA* 91: 4407-4411; Conrad y col. (1996) *Gene Therapy* 3: 658-668; Yang y col. (1996) *Gene Therapy* 3: 137-144; Brynes y col. (1996) *J. Neurosci.* 16: 3045-3055). Dado que puede transducir tejido que no se divide, el AAV puede adaptarse bien para administrar genes al sistema nervioso central (SNC). La Patente de EE.UU. Número 5.677.158 describe procedimientos para hacer vectores AAV. Los vectores AAV que contienen genes terapéuticos bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV) han mostrado transducir cerebro de mamíferos y tener efectos funcionales en modelos de enfermedad.

Los vectores AAV que llevan transgenes se describieron, por ejemplo, en Kaplitt y col. (1994) *Nature Genetics* 8: 148-153; el Documento WO 95/28493 publicado el 26 de Octubre de 1995; el Documento WO 95/34670 publicado el 21 de Diciembre de 1995; During y col., (1998) *Gene Therapy* 5: 820-827; Mandel y col. (1998) *J. Neurosci.* 18: 4271-4284; Szczypka y col. (1999) *Neuron* 22: 167-178. Sin embargo, se ha constatado que la administración de vectores AAV al SNC es dificultosa. El AAV fue usado para transferir el gen de timidina quinasa (tk) a gliomas experimentales en ratones, y se ha demostrado la capacidad del AAV-tk de volver a estos tumores cerebrales sensibles a los efectos citocidas del ganciclovir. Okada y col. (1996) *Gene Therapy* 3: 959-964; Mizuno y col. (1998) *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 76-80. La infusión de un vector AAV-CMV conteniendo el gen de tirosina hidroxilasa humana (TH), una enzima involucrada en la conversión del aminoácido tirosina a dopa, dentro del cerebro de rata adulta dio como resultado la transducción tanto de neuronas como de glia (Kaplitt y col. (1995) *VIRAL VECTORS, GENE THERAPY AND NEUROSCIENCE APPLICATIONS*, Kaplitt and Loewy eds., 12: 193-210, Academic Press, San Diego; Bankiewicz y col. (1997) *Exper. Neurol.* 144: 147-156). La administración del mismo vector en el striatum de

monos dio como resultado una marcada expresión de TH durante hasta 2,5 meses (During y col., *supra*). Además, se probó AAV-CMV-TH en un modelo de Enfermedad de Parkinson en roedores donde causó una mejora significativa en el comportamiento rotacional de ratas con afecciones provocadas por 6-hidroxidopamina (Fan y col. (1998) *Human Gene Therapy* 9: 2527-2537; Mandel y col. (1997) *PNAS USA* 94: 14083-14088).

Sin embargo, mientras tales reseñas demuestran el potencial de AAV para dirigirse al SNC, también demuestran que la inyección directa de vectores AAV dentro del SNC da como resultado un número limitado de células transfectadas y que las células transfectadas están agrupadas en un área angosta cerca del tracto de la inyección. (Ver, por ejemplo, During y col., *supra*; Fan y col., *supra*). Como las inyecciones múltiples en el SNC provocan complicaciones indeseadas, existe aún una necesidad de encontrar procedimientos para administrar vectores AAV en áreas mayores del cerebro usando la menor cantidad de sitios de inyección. Además, la relación entre la dosis de vector inyectada y su distribución resultante en el tejido cerebral no ha sido reseñada anteriormente.

Además, la terapia génica para PD se ha centrado en la administración de al menos dos genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de dopamina, a saber TH y AADC. Estos procedimientos están sujetos a todos los problemas de administración discutidos anteriormente y, además, requieren que ambos genes se expresen en las cantidades apropiadas. Así, el tratamiento de PD usando AAV-AADC en combinación con L-dopa tampoco ha sido demostrado. El uso de administración potenciada por convección (CED) para administración de fármacos se conoce per se (documento WO 95/05864).

Sumario de la invención

La presente proporciona lo siguiente:

1. Uso de una composición que comprende viriones de virus adenoasociados recombinantes, codificando dichos viriones de virus adenoasociados recombinantes un polipéptido terapéutico, en la fabricación del medicamento,

para tratar un trastorno del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto que sufre de un trastorno del SCN,

en el que dichos viriones de virus adenoasociados recombinantes se administran mediante la administración potenciada por convección dentro del SNC usando una bomba de infusión o una bomba osmótica,

y en el que dicha composición se administra al cerebro del sujeto de tal forma que se logra distribución de dichos viriones de virus adenoasociados recombinantes sobre un área grande;

2. El uso de 1, en el que dicha administración potenciada por convención se lleva a cabo usando una bomba de infusión;

3. El uso de 1, en el que dicha administración potenciada por convención se lleva a cabo usando una bomba osmótica;

4. El uso de 1, en el que dichos viriones de virus adenoasociados recombinantes se administran al striatum;

5. El uso de 1, en el que la secuencia de ácido nucleico codifica aminoácido- aromático decarboxilasa (AADC);

6. El uso de 1 en el que el sujeto es un ser humano;

7. El uso de 1 en el que el trastorno del SNC es enfermedad de Parkinson, los viriones rAAV se administran en el striatum y en el que la secuencia de ácido nucleico codifica AADC;

8. El uso de una cualquiera de 1 a 7 que comprende además administrar al sujeto al menos un compuesto terapéutico adicional;

9. El uso de 8, en el que el al menos un compuesto terapéutico adicional es L-dopa;

10. El uso de 9, que comprende además la administración de L-dopa y, opcionalmente, carbidopa al sujeto.

Éstas y otras realizaciones del objeto de la invención se producirán fácilmente por aquellos de habilidad normal en la técnica a la vista de lo desvelado en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1, gráficos a a d, representa las respuestas a las dosis (expresión del transgén AAV-tk) en rata tras la administración intracraneal por medio de bomba de infusión. Se representan el volumen de tejido (Figura 1a); el área media (Figura 1b); la longitud (Figura 1c) y el número de células (Figura 1d) que expresan el transgén.

La Figura 2 es una reproducción en medio tono que muestra la marcación del tejido cerebral de rata tras la inyección de vectores AAV.

La Figura 3, gráficos a a d, representan la administración intracraneal de AAV-tk bien por medio de una bomba de infusión (BI) o bien por medio de una bomba osmótica (BO). Se representan el volumen de tejido (Figura 3a); el área media (Figura 3b); la longitud (Figura 3c) y el número de células (Figura 3d) que expresan el transgén. Las figuras 4a, 4b, 4c y 4d son reproducciones en medio tono que muestran tejido del SNC al que se le administró por infusión vector conteniendo el transgén tk. Las Figuras 4a y b muestran la expresión de tk en neuronas. Las Figuras 4c y d muestran la expresión en neuronas y la expresión glial cerca del sitio de la infusión con bomba osmótica.

La Figura 5 es una reproducción en medio tono que muestra análisis de bandas de Southern de tejidos de un sujeto al que se le infundió vector AAV-tk.

La Figura 6 representa la inmunotinción para AADC de cerebros de monos con lesiones por MPTP. El lado izquierdo (control) muestra una tinción restringida, mientras que el lado derecho (tratado con AAV-AADC) muestra una amplia inmunotinción de AADC.

La Figura 7 es una exploración FMT PET que representa la actividad de dopamina en los cerebros de monos lesionados unilateralmente por MPTP. El lado izquierdo (línea basal) muestra actividad restringida del lado lesionado, mientras que el lado derecho (8 semanas tras la administración de AAV-AADC) muestra niveles normales de actividad de dopamina.

La Figura 8, gráficos A a C representan un análisis bioquímico de niveles de L-dopa en monos con lesiones por MPTP. El gráfico A muestra que L-dopa se convierte en dopamina por acción de la enzima AADC. En regiones corticales, sin tener en cuenta el tratamiento con MPTP, se observa una pobre o ninguna conversión de L-dopa a dopamina. El striatum es rico en AADC, por lo tanto, la mayor parte de la L-dopa se convirtió en dopamina en esta región. En el striatum ipsilateral tras la administración de MPTP, la conversión de L-dopa a dopamina está afectada y es similar a la actividad cortical en monos tratados con AAV-Lac-Z. Ambos animales tratados con AAV-AADC mostraron niveles prácticamente normales de conversión de L-dopa a dopamina. El gráfico B representa el análisis de HVA. HVA es un metabolito del catabolismo de la dopamina. Como las regiones corticales no son capaces de convertir L-dopa en dopamina, los niveles de HVA son bajos. Como se muestra en el gráfico A, el striatum convierte L-dopa en dopamina, por lo tanto, la dopamina es catabolizada a HVA en esta región. Como no se ha restablecido la actividad de AADC en los monos tratados con AAV-Lac-Z los niveles de HVA en el striatum ipsilateral con MPTP son bajos. Los niveles de HVA son significativamente elevados en mono tratado con AAV-AADC en el striatum ipsilateral con MPTP. El gráfico C muestra los niveles de L-dopa que se midieron en las muestras de tejidos tras la administración de L-dopa. Debido a la diferente absorción de L-dopa los niveles tisulares difieren entre los monos. Son similares, sin embargo, dentro de cada sujeto. Los niveles tisulares de L-dopa se redujeron dramáticamente en el striatum ipsilateral con MPTP de monos tratados con AAV-AADC, desde que se restableció la enzima AADC. La actividad de AADC en esta región es muy fuerte, ya que los niveles tisulares de L-dopa son menores que en el striatum contralateral.

La Figura 9 es un gráfico que representa la actividad de la enzima AADC *in vitro*. Se incubaron muestras de tejidos con L-dopa como se describe en materiales y procedimientos. La actividad de la enzima AADC se determinó midiendo las velocidades de conversión de L-dopa en dopamina. Las regiones corticales contienen niveles bajos de AADC. La actividad de AADC en el striatum contralateral es alta, sin embargo, es variable ya que existe alguna lesión dopaminérgica en ese lado del cerebro. La actividad de AADC en el striatum ipsilateral con MPTP está significativamente reducida en mono tratado con AAV-Lac-Z mientras que está completamente restablecida en monos con AAV-DDC.

Descripción detallada de la invención

La puesta en práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique en contra, procedimientos convencionales de virología, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro de los usados en la técnica. Tales técnicas se explican en profundidad en la bibliografía. Ver, por ej. Sambrook, y col. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Current Edition); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, y col. eds. current edition); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, eds., Current Edition); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., Current Edition); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., Current Edition); *CRC Handbook of Parvoviruses*, vol. I & II (P. Tijessen, ed.); *Fundamental Virology*, 2ª Edición, vol. I & II (B. N. Fields and D. M. Knipe, eds.).

Como se usan en la presente memoria y en las reivindicaciones anexas, las formas en singular “un”, “una” y “el”, “la” incluyen las referencias en plural a menos que el contenido lo exprese claramente de en contra.

Definiciones

Al describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan como se indica a continuación.

“Transferencia génica” o “administración génica” se refiere a procedimientos o sistemas para insertar de manera fiable ADN extraño dentro de células huésped. Tales procedimientos pueden dar como resultado la expresión tran-

sitoria de ADN transferido no integrado, la replicación extracromosómica y la expresión de replicones transferidos (por ej. episomas), o la integración del material genético transferido en el ADN genómico de las células huésped. La transferencia génica provee un enfoque único para el tratamiento de enfermedades adquiridas y hereditarias. Se ha desarrollado una cantidad de sistemas para realizar transferencia génica en células de mamífero. Ver, por ej. la Patente de EE.UU. N° 5.399.346.

Por “vector” se quiere significar cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc. que es capaz de replicar cuando está asociado con los elementos de control adecuados y que puede transferir secuencias genéticas entre células. Por ello, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como también vectores virales.

Por “virus recombinante” se quiere decir un virus que ha sido genéticamente alterado, por ej. mediante la adición o inserción de una construcción de ácido nucleico heterólogo dentro de la partícula.

Por “virión AAV” se quiere decir una partícula de virus completa, tal como una partícula de virus AAV de tipo salvaje (wt) (que comprende un genoma de ácido nucleico lineal, de sola hebra de AAV asociado con un revestimiento de proteína de cápside de AAV). Con respecto a esto, las moléculas de ácido nucleico de AAV de hebra simple de sentido complementario, por ej. hebras “en sentido normal” o “antisentido”, pueden empaquetarse dentro de cualquier virión AAV y ambas hebras son igualmente infecciosas.

Un “virión AAV recombinante” o “virión rAAV” se define en el presente documento como un virus infeccioso, con replicación defectuosa, compuesto por una proteína de envoltura de AAV, encapsidando una secuencia de nucleótidos heterólogos de interés que está flanqueada en ambos lados por AAV ITRs. Un virión rAAV se produce en una célula huésped adecuada que ha tenido un vector de AAV, funciones de ayuda al AAV y funciones accesorias introducidas en la misma. De esta manera, la célula huésped se convierte en una célula capaz de codificar polipéptidos de AAV que se requieren para encapsidar el vector de AAV (conteniendo una secuencia de nucleótidos recombinante de interés) dentro de partículas de viriones recombinantes infecciosas para la posterior administración genética.

El término “transfección” se usa para referirse a la adquisición de ADN extraño por una célula, y una célula fue “transfectada” cuando se le ha introducido un ADN exógeno dentro de su membrana celular. Se conocen en general una cantidad de procedimientos de transfección en la técnica. Ver, por ej., Graham y col. (1973) *Virology*, 52: 456, Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Davis y col. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, y Chu y col. (1981) *Gene* 13: 197. Tales técnicas pueden usarse para introducir uno o más restos de ADN exógeno, tales como un vector de integración de nucleótidos y otras moléculas de ácido nucleico, dentro de células huésped adecuadas.

El término “célula huésped” significa, por ejemplo, microorganismos, células de levaduras, células de insectos y células de mamíferos, que pueden ser, o han sido, usadas como receptores de una construcción de ayuda al AAV, un plásmido vector de AAV, un vector de funciones accesorias u otro ADN transferido. El término incluye la progenie de la célula original que fue transfectada. Por ello, una “célula huésped” como se usa en este documento generalmente se refiere a una célula que se ha transfectado con una secuencia de ADN exógeno. Se entiende que la progenie de una única célula parental puede no ser necesariamente idéntica completamente en morfología o en genómica o en complemento de ADN total a la parental original, debido a mutación natural, accidental o deliberada.

Como se usa en el presente documento, el término “línea celular” se refiere a una población de células capaces de crecimiento o división de manera continua o prolongada *in vitro*. A menudo, las líneas celulares son poblaciones clónicas derivadas de una única célula progenitora. Se sabe también en la técnica que pueden producirse cambios espontáneos o inducidos en el cariotipo durante el almacenamiento o transferencia de tales poblaciones clónicas. Por lo tanto, las células derivadas de la línea celular referida pueden no ser precisamente idénticas a las células o cultivos ancestrales, y la línea celular referida incluye tales variantes.

El término “heterólogo” en referencia a secuencias de ácidos nucleicos tales como secuencias codificadoras o secuencias de control, significa secuencias que no se encuentran normalmente juntas, y/o no están normalmente asociadas con una célula en particular. Por lo tanto, una región “heteróloga” de una construcción de ácido nucleico o un vector es un segmento de ácido nucleico dentro de o unido a otra molécula de ácido nucleico que no se encuentra asociada con la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región heteróloga de una construcción de ácido nucleico podría incluir una secuencia codificadora flanqueada por secuencias que no se encuentran asociadas con la secuencia codificadora en la naturaleza. Otro ejemplo de una secuencia codificadora heteróloga es una construcción en la que la secuencia codificadora misma no se encuentra en la naturaleza (por ej. secuencias sintéticas con codones diferentes de los del gen nativo). De manera similar, una célula transformada con una construcción que no está normalmente presente en la célula podría considerarse heteróloga para los objetivos de esta invención. La variación alélica o los acontecimientos mutacionales que ocurren naturalmente no dan origen a ADN heterólogo, como se usa en este documento.

Una “secuencia codificadora” o una secuencia que “codifica” una proteína en particular, es una secuencia de ácido nucleico que es transcrita (en el caso de ADN) y traducida (en el caso de ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias regulatorias adecuadas. Los límites de la secuencia codificadora se determinan mediante un codón de inicio en el extremo 5' (amino) terminal y un codón de finalización de lectura

en el extremo 3' (carboxi) terminal. Una secuencia codificadora puede incluir, pero no está limitada a, ADNc de ARNm procariota o eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN procariota o eucariota, e incluso secuencias de ADN sintéticas. Usualmente se encontrará una secuencia de finalización de la transcripción en 3' hacia la secuencia codificadora.

Una secuencia de "ácido nucleico" se refiere a una secuencia de ADN o de ARN. El término engloba secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases de ADN y ARN conocidos tales como, pero no limitados a 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

El término "secuencias control" de ADN se refiere en conjunto a secuencias promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios de regulación secuencia arriba, orígenes de replicación, sitios de entrada de ribosomas internos ("IRES"), potenciadores y similares, que en conjunto proveen para la replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificadora en una célula receptora. No todas estas secuencias de control necesitan estar presentes siempre, siempre y cuando la secuencia codificadora seleccionada sea capaz de replicarse, transcribirse y traducirse en una célula huésped adecuada.

El término "región promotora" se usa en el presente documento para referirse a una región de nucleótidos que comprende una secuencia reguladora de ADN, en la que la secuencia reguladora deriva de un gen que es capaz de unir polimerasa de ARN e iniciar la transcripción de una secuencia codificadora, secuencia corriente abajo (dirección 3').

"Enlazados operativamente" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes descritos están configurados de manera tal que llevan a cabo su función habitual. Por ello, las secuencias de control enlazadas operativamente a una secuencia codificadora son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificadora. Las secuencias de control no necesitan estar contiguas a la secuencia codificadora, siempre y cuando funcionen para dirigir la expresión de la misma. Por ello, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias transcritas no traducidas intervinientes entre la secuencia promotora y la secuencia codificadora y la secuencia promotora puede aún ser considerada "enlazada operativamente" a la secuencia codificadora.

Por "aislado" cuando se hace referencia a una secuencia de nucleótidos, se quiere decir que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. Así, una "molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido particular" se refiere a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente libre de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido sujeto; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afectan perjudicialmente las características básicas de la composición.

Con el objeto de describir la posición relativa de secuencias de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico particular a lo largo de la presente solicitud, como cuando se describe una secuencia de nucleótido particular situada "secuencia arriba", "secuencia abajo", "3'" o "5'" en relación a otra secuencia, se entiende que esa es la posición de las secuencias en la hebra "con sentido" o "codificadora" de una molécula de ADN que se refiere como es habitual en la técnica.

Un "gen" se refiere a un polinucleótido que contiene al menos un marco de lectura abierto que es capaz de codificar un polipéptido o proteína particular tras ser transcrito o traducido. Cualquiera de las secuencias de polinucleótidos descritas en este documento puede usarse para identificar fragmentos mayores o secuencias codificadoras completas de los genes con las que están asociadas. Los expertos en la técnica conocen procedimientos para aislar secuencias de fragmentos mayores.

Como se describe en el presente documento, se considera que dos fragmentos de ácido nucleico "hibridan selectivamente". El grado de identidad de las secuencias entre dos moléculas de ácido nucleico afecta la eficacia y la fuerza de los eventos de hibridación entre tales moléculas. Una secuencia de ácido nucleico parcialmente idéntica inhibirá al menos parcialmente la hibridación de una secuencia completamente idéntica a una molécula blanco. La inhibición de hibridación de la secuencia completamente idéntica puede valorarse usando ensayos de hibridación bien conocidos en la técnica (por ej., prueba de bandas de Southern, prueba de bandas de Northern, hibridación de solución o similares, ver Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.). Tales ensayos pueden llevarse a cabo usando diferentes grados de selectividad, por ejemplo, usando condiciones que varían de baja a alta rigurosidad. Si se usan condiciones de baja rigurosidad, se puede valorar la ausencia de unión no específica usando una sonda secundaria que carece incluso de un grado parcial de identidad de secuencia (por ejemplo, una sonda que tiene menos de aproximadamente 30% de identidad de secuencia con la molécula blanco), tal que, en ausencia de uniones no específicas, la sonda secundaria no se hibridará con la diana.

Cuando se usa un sistema de detección basado en hibridación, se elige una sonda de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico diana y posteriormente, seleccionando las condiciones adecuadas, la sonda y la secuencia blanco “hibridan selectivamente”, o se unen una a la otra para formar una molécula híbrida. Una molécula de ácido nucleico que es capaz de hibridar selectivamente con una secuencia blanco bajo condiciones de “rigurosidad moderada” típicamente hibrida bajo condiciones que permiten la detección de una secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 10-14 nucleótidos de largo que tiene al menos aproximadamente un 70% de identidad con la secuencia de la sonda de ácido nucleico seleccionada. Las condiciones de hibridación rigurosa típicamente permiten la detección de secuencias de ácido nucleico diana de al menos aproximadamente 10-14 nucleótidos de largo que tienen una identidad de secuencia mayor que aproximadamente 90-95% con la secuencia de la sonda de ácido nucleico seleccionada. Las condiciones de hibridación útiles para la hibridación de sonda/blanco en las que la sonda y el blanco tienen un grado de identidad de secuencia específico pueden determinarse con los conocimientos de la técnica (ver, por ejemplo, *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, editores B.D. Hames y S.J. Higgins, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press).

Con respecto a las condiciones de rigurosidad para hibridación, es bien sabido en la técnica que pueden emplearse numerosas condiciones equivalentes para establecer una rigurosidad en particular variando, por ejemplo, los siguientes factores: la longitud y naturaleza de las secuencias sonda y blanco, la composición de base de las secuencias, las concentraciones de sales y otros componentes de la solución de hibridación, la presencia o ausencia de agentes bloqueantes en las soluciones de hibridación (por ej. formamida, sulfato de dextrano y polietilenglicol), la temperatura de hibridación y los parámetros de tiempo, así como variando las condiciones de lavado. La selección de una serie de condiciones particulares de hibridación se realiza siguiendo procedimientos estándar en la técnica (ver por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edition, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.).

El término “descarboxilasa de aminoácido aromático” o “AADC” se refiere a un polipéptido que descarboxila dopa para dar dopamina. Por lo tanto, el término incluye un polipéptido de AADC completo, fragmentos activos u homólogos funcionales del mismo.

Un “homólogo funcional” o un “equivalente funcional” de un polipéptido dado incluye moléculas derivadas de una secuencia polipeptídica nativa, así como también polipéptidos producidos recombinantemente o sintetizados químicamente que funcionan de manera similar a la molécula de referencia para obtener un resultado deseado. Por lo tanto, un homólogo funcional de AADC incluye derivados y análogos de aquellos polipéptidos -incluyendo cualquier adición, sustitución y/o delección de aminoácidos únicos o múltiples que tienen lugar internamente o en los extremos amino o carboxiterminal de los mismos- siempre que se mantenga intacta su actividad.

También se conocen en la técnica procedimientos para determinar la “identidad de secuencia” u “homología” de ácidos nucleicos y aminoácidos. Típicamente, tales técnicas incluyen determinar las secuencias de nucleótidos del ARNm para un gen y/o determinar la secuencia de aminoácidos codificados por el mismo, y comparar estas secuencias con una segunda secuencia de nucleótidos o aminoácidos. En general, “identidad” se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de dos secuencias de polinucleótidos o secuencias polipeptídicas, respectivamente. Se pueden comparar dos o más secuencias (polinucleótidos o aminoácidos) determinando su “identidad porcentual”. La identidad porcentual de dos secuencias ya sean ácidos nucleicos o secuencias de aminoácidos, es el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas dividido por la longitud de las secuencias más cortas y multiplicado por 100. Se provee un alineamiento aproximado para secuencias de ácidos nucleicos por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981). Este algoritmo puede aplicarse a secuencias de aminoácidos usando la matriz de valoración desarrollada por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff ed. 5 supl. 3: 353-358, *National Biomedical Research Foundation*, Washington, D.C., USA, y normalizada por Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14(6): 6745-6763 (1986). Se provee una implementación ejemplar de este algoritmo para determinar la identidad porcentual de una secuencia por el Genetics Computer Group (Madison, WI) en la aplicación de utilidad “BestFit”. Los parámetros predeterminados para este procedimiento se describen en el Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Versión 8 (1995) (disponible en Genetics Computer Group (Madison, WI)). Un procedimiento para establecer la identidad porcentual en el contexto de la presente invención es usar el paquete de programas MPSRCH registrado por la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). De este juego de paquetes puede usarse el algoritmo Smith-Waterman cuando se usan parámetros predeterminados para la tabla de valoración (por ejemplo, penalización abierta del hueco (gap) de 12, penalización por extensión de hueco de uno, y un hueco de seis). El valor “Match” refleja la “identidad de secuencias” a partir de los datos generados. Otros programas adecuados para calcular la identidad porcentual o similitud entre secuencias se conocen generalmente bien en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineamiento es BLAST, usado con parámetros predeterminados. Por ejemplo, pueden usarse BLASTN y BLASTP con los siguientes parámetros predeterminados: código genético = estándar; filtro = ninguno; hebra = ambas; límite = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; organizadas por = HIGH SCORE; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones de GenBank CDS + proteína Swiss + actualización Sp + PIR. Los detalles de estos programas pueden encontrarse en la siguiente dirección de internet:

<http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Alternativamente, la homología puede determinarse por medio de hibridación de polinucleótidos bajo condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido por digestión con nucleasa(s) específicas de hebra

única y determinación de tamaño de los fragmentos digeridos. Dos ADN, o dos secuencias polipeptídicas son “sustancialmente homólogas” una con la otra cuando las secuencias exhiben al menos aproximadamente 80%-85%, de preferencia al menos aproximadamente 90% y de mayor preferencia al menos aproximadamente 95%-98% de identidad de secuencia sobre una longitud definida de las moléculas, como se determina usando los procedimientos expuestos anteriormente. Como se usa en este documento, sustancialmente homólogo también se refiere a secuencias que muestran identidad completa con el ADN o la secuencia de polipéptidos especificados. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas pueden identificarse en un experimento de hibridación Southern bajo, por ejemplo, condiciones de rigurosidad, definidas para ese sistema particular. La definición de las condiciones de hibridación adecuadas se encuentra dentro del conocimiento de la técnica. Ver, por ej., Sambrook y col., *supra*; *DNA Cloning, supra*; *Nucleic Acid Hybridization, supra*.

“Administración potenciada por convección” se refiere a cualquier administración de agentes no manual. En el contexto de la presente invención, pueden obtenerse ejemplos de administración potenciada por convección (CED) de AAV mediante bombas de infusión o con bombas osmóticas.

El término “sistema nervioso central” o “SNC” incluye todas las células y tejidos del cerebro y médula espinal de un vertebrado. Por ello, el término incluye, pero no está limitado a, células neuronales, células gliales, astrocitos, líquido cefalorraquídeo (LCR), espacios intersticiales, hueso, cartílago y similares. La “cavidad craneana” se refiere al área debajo de la calavera (cráneo). Varias regiones del SNC han sido asociadas con diversos comportamientos y/o funciones. Por ejemplo, los ganglios basales del cerebro se ha asociado con funciones motoras, particularmente con el movimiento voluntario. Los ganglios basales están compuestos por seis núcleos emparejados: el núcleo caudado, el putamen, el globus pallidus, o pallidus el núcleo accumbens, el núcleo subtalámico y la sustancia nigra. El núcleo caudado y el putamen, aunque separados por la cápsula interna, comparten propiedades citoarquitectónicas, químicas y fisiológicas y a menudo se los conoce como el corpus striatum, o simplemente “el striatum”. La sustancia nigra, que se degenera en los pacientes con Parkinson, provee actividad dopaminérgica importante al ganglio basal.

Los términos “sujeto”, “individuo” o “paciente” se usan de manera indistinta en el presente documento y se refieren a un vertebrado, de preferencia un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no están limitados a roedores, simios, seres humanos, animales de granja, animales deportivos y mascotas.

Una “cantidad eficaz” es una cantidad suficiente para producir el resultado beneficioso o deseado. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones.

Perspectiva General de la Invención

El objetivo principal de la presente invención es el desarrollo de procedimientos que permiten la administración eficaz del vector viral AAV en el SNC de animales. Anteriormente, los investigadores tuvieron solo mínimos éxitos administrando vectores virales a extensas áreas del cerebro. Usando dispositivos de administración potenciados por convección (en la presente invención, bombas osmóticas o de infusión), los vectores AAV pueden administrarse a muchas células sobre grandes áreas del cerebro. Además, los vectores administrados expresan eficazmente los transgenes en las células del SNC (por ej., neuronas o células gliales).

Usando los procedimientos de administración de vectores AAV descritos en este documento, pueden crearse nuevos tratamientos de terapia génica para afecciones del SNC (por ej., Enfermedad de Parkinson). En una forma de realización, la enfermedad de Parkinson (PD) se trata combinando terapia sistémica con L-dopa y/o carbidopa con la administración al SNC (por ej., vía CED) de vectores AAV que llevan un transgén que codifica AADC, una enzima involucrada en el metabolismo de la dopamina.

Las ventajas de la invención incluyen, pero no están limitadas a (i) administración eficaz y extensa de vectores virales (tales como AAV) al SNC; (ii) expresión de ácidos nucleicos (por ej., transgenes) llevados por los vectores virales; (iii) identificación de un régimen terapéutico para la Enfermedad de Parkinson que incluye la administración de un transgén en combinación con la administración de un profármaco; y (iv) la capacidad de controlar de manera no invasiva la terapia génica del SNC usando exploración PET.

Construcción de vectores virales

Los vehículos para administrar genes útiles en la práctica de la presente invención pueden construirse usando metodologías bien conocidas en la técnica de biología molecular (ver, por ejemplo, Ausubel o Maniatis, *supra*). Típicamente, los vectores virales que llevan transgenes son ensamblados a partir de polinucleótidos que codifican el/los transgen(es), los elementos reguladores adecuados y los elementos necesarios para la producción de proteínas virales que intervienen en la transducción celular. En la invención, se usan vectores virales adeno asociados (AAV).

Procedimientos Generales

Un procedimiento preferido para obtener los componentes nucleotídicos del vector viral es PCR. Los procedimientos generales para PCR se muestran en MacPherson y col., PCR: A PRACTICAL APPROACH, (IRL Press en Oxford University Press, (1991)). Las condiciones de PCR para cada aplicación pueden determinarse empíricamente. El éxito de la reacción está influenciado por una cantidad de parámetros. Entre estos parámetros se encuentran la temperatura

y tiempo de apareamiento, tiempo de la extensión, concentración de Mg^{2+} y ATP, pH y la concentración relativa de cebadores, moldes y desoxirribonucleótidos. A continuación, en los Ejemplos se describen ejemplos de cebadores. Tras la amplificación, los fragmentos resultantes pueden detectarse por medio de electroforesis en gel de agarosa seguida de visualización con tinción de bromuro de etidio e iluminación ultravioleta.

5

Otro procedimiento para obtener polinucleótidos es mediante digestión enzimática. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos pueden generarse por medio de digestión de vectores apropiados con enzimas de restricción de reconocimiento adecuadas. Los fragmentos resultantes pueden posteriormente unirse de manera apropiada.

10

Los polinucleótidos se insertan dentro de los genomas de los vectores usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden ponerse en contacto el inserto y el ADN del vector, bajo condiciones adecuadas, con una enzima de restricción para crear extremos complementarios o inespecíficos en cada molécula que pueden aparearse entre sí y unirse con una ligasa. Alternativamente, pueden unirse conectores de ácido nucleico sintéticos al extremo terminal de un polinucleótido. Estos conectores sintéticos pueden contener secuencias de ácidos nucleicos que corresponden a un sitio de restricción particular en el ADN del vector. Se conocen también en la técnica otros medios útiles.

15

Vectores Retrovirales y Adenovirales

20

Se han usado una cantidad de sistemas basados en virus para la administración de genes. Por ejemplo, se conocen sistemas retrovirales y generalmente usan líneas de encapsidado que tienen un provirus defectuoso integrado (el "ayudante") que expresa todos los genes del virus pero no puede encapsidar su propio genoma debido a una delección de la señal de encapsidado, conocida como secuencia psi. Por ello, la línea celular produce corazas virales vacías. Las líneas productoras pueden derivarse de líneas de encapsidado que, junto con el ayudante, contienen un vector viral que incluye secuencias necesarias en *cis* para la replicación y el encapsidado del virus, conocidas como repeticiones terminales largas (LTRs). El gen de interés puede insertarse en un vector y encapsidarse en las cápsulas virales sintetizadas por el ayudante retroviral. El virus recombinante puede ser posteriormente aislado y administrado a un sujeto. (Ver, por ej., la Patente de EE.UU. n° 5.219.740). Los vectores retrovirales representativos incluyen pero no están limitados a vectores tales como LHL, N2, LNSAL, LSHL y LHL2 descritos en por ej., la Patente de EE.UU. N° 5.219.740, así como derivados de estos vectores, tales como el vector N2 modificado descrito en este documento. Los vectores retrovirales pueden construirse usando técnicas bien conocidas en la técnica. Ver, por ej. la Patente de EE.UU. N° 5.219.740; Mann y col. (1983) *Cell* 33: 153-159.

30

35

Los sistemas basados en adenovirus han sido desarrollados para administración de genes y son adecuados para administrar genes de acuerdo con los procedimientos descritos en este documento. Los adenovirus humanos son virus de ADN de doble hebra que entran en las células por endocitosis mediada por receptores. Estos virus son particularmente adecuados para transferir genes por que son fáciles de cultivar y manipular y exhiben una amplia variedad de huéspedes *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, los adenovirus pueden infectar células humanas de origen hematopoyético, linfóide y mieloide. Además, los adenovirus infectan células blanco quiescentes así como replicantes. A diferencia de los retrovirus que se integran en el genoma del huésped, los adenovirus persisten extracromosómicamente y por ello se ve minimizado el riesgo asociado con mutagénesis por inserción. El virus se produce fácilmente en valoraciones altas y es estable de modo que se puede purificar y almacenar. Aún en la forma replicativa, los adenovirus causan solo un bajo nivel de morbilidad y no están asociados con neoplasias humanas. De acuerdo con esto, se han desarrollado vectores adenovirus que aprovechan estas ventajas. Para consultar una descripción de vectores adenovirus y sus usos ver, por ej., Haj-Ahmad and Graham (1986) *J. Virol.* 57: 267-274; Bett y col. (1993) *J. Virol.* 67: 5911-5921; Mittereder y col. (1994) *Human Gene Therapy* 5: 717-729; Seth y col. (1994) *J. Virol.* 68: 933-940; Barr y col. (1994) *Gene Therapy* 1: 51-58; Berkner, K.L. (1988) *BioTechniques* 6: 616-629; Rich y col. (1993) *Human Gene Therapy* 4: 461-476.

50

Vectores de Expresión AAV

En la presente invención, los vectores virales son vectores AAV. Por "vector AAV" se entiende un vector derivado de un serotipo viral adeno asociado, incluyendo pero no limitado a AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAVX7, etc. Los vectores AAV pueden tener uno o más de los genes de AAV de tipo salvaje con delecciones totales o parciales, de preferencia los genes rep y/o cap, pero mantienen las secuencias ITR funcionales de flanco. Las secuencias ITR funcionales son necesarias para rescate, replicación y encapsidación del virión AAV. Por ello, en este documento se define un vector AAV que incluye al menos aquellas secuencias necesarias en *cis* para replicación y encapsidación (por ej., ITRs funcionales) del virus. Las ITRs no son necesariamente las secuencias de nucleótidos de tipo salvaje, y pueden estar alteradas, por ej., mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos, siempre que las secuencias provean para el rescate, replicación y encapsidación.

60

Los vectores de expresión AAV se construyen usando técnicas conocidas para proveer al menos como componentes unidos operativamente en la dirección de la transcripción, elementos de control que incluyen una región de inicio de la transcripción, el ADN de interés y una región de terminación de la transcripción. Los elementos de control se seleccionan para ser funcionales en una célula de mamíferos. La construcción resultante que contiene los componentes unidos operativamente está ligada (5' y 3') a secuencias AAV ITR funcionales.

65

Por "repeticiones terminales invertidas de virus adeno asociados" o "AAV ITRs" se quiere decir las regiones reconocidas por la técnica halladas en cada extremo del genoma AAV que funcionan en *cis* como orígenes de replicación de ADN y como señales de encapsidación para el virus. AAV ITRs, junto con la región codificadora AAV *rep*, proveen para la escisión y rescate eficaces de, y para la integración de una secuencia de nucleótidos interpuerta entre dos ITRs de flanco dentro del genoma de una célula de mamífero.

Se conocen las secuencias de nucleótidos de regiones AAV ITR. Ver, por ej., Kotin, R. M. (1994) *Human Gene Therapy* 5: 793-801; Berns, K.I. "Parvoviridae and their Replication" en *Fundamental Virology*, 2ª edición, (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds.) para la secuencia de AAV-2. Como se usa en este documento, un "AAV ITR" no necesariamente tiene la secuencia de nucleótidos del tipo salvaje, puede estar alterada, por ej., por la inserción, delección o sustitución de nucleótidos. Adicionalmente, la AAV ITR puede derivarse de cualquiera de los varios serotipos de AAV, incluyendo pero sin limitación, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAVX7, etc. Además, los ITRs 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector AAV no necesariamente son idénticos o derivados del mismo serotipo o aislado AAV, siempre que funcionen como se pretende, es decir, permitiendo la escisión y rescate de la secuencia de interés del genoma de la célula huésped o vector, y permitiendo la integración de la secuencia heteróloga dentro del genoma de la célula receptora cuando los productos del gen AAV Rep están presentes en la célula.

Adicionalmente, las AAV ITRs pueden derivarse de cualquiera de los varios serotipos de AAV, incluyendo sin limitación, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAVX7, etc. Además, los ITRs 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector de expresión AAV no necesariamente tienen que ser idénticos o derivados del mismo serotipo o aislado AAV, siempre que funcionen como se pretende, es decir, permitiendo la escisión y rescate de la secuencia de interés del genoma de la célula huésped o vector, y permitiendo la integración de la molécula de ADN dentro del genoma de la célula receptora cuando los productos del gen AAV Rep están presentes en la célula.

Las moléculas de ADN adecuadas para usar en vectores AAV tendrán un tamaño menor que aproximadamente 5 kilobases (kb) e incluirán, por ejemplo, un gen que codifica una proteína defectuosa o faltante de un sujeto receptor o un gen que codifica una proteína que tiene un efecto biológico o terapéutico deseado (por ej., una función antibacteriana, antiviral o antitumoral). Las moléculas de ADN preferidas incluyen aquellas involucradas en el metabolismo de la dopamina, por ejemplo, AADC o TH. Los vectores AAV-AADC y AAV-TH se describieron, por ejemplo, en Bankiewicz y col. (1997) *Exper't Neurol.* 144: 147-156; Fan y col. (1998) *Human Gene Therapy* 9: 2527-2535 e International Publication WO 95/28493, publicado el 26 de Octubre de 1995.

La secuencia de nucleótidos seleccionada, tal como AADC u otro gen de interés, se une operativamente a elementos de control que dirigen la transcripción o expresión del mismo en el sujeto *in vivo*. Tales elementos de control pueden comprender secuencias de control normalmente asociadas con el gen seleccionado. Alternativamente, pueden usarse secuencias de control heterólogas. Las secuencias de control heterólogas útiles generalmente incluyen aquellas derivadas de secuencias que codifican genes de mamíferos o virales. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, el promotor temprano de SV40, el promotor LTR de virus de tumor mamario de ratón, el promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP); un promotor de virus herpes simplex (HSV), un promotor de citomegalovirus (CMV) tal como la región promotora inmediata temprana de CMV (CMVIE), un promotor de virus del sarcoma de rous (RSV), promotores sintéticos, promotores híbridos, y similares. Además, las secuencias derivadas de genes no virales, tales como el gen de metalotioneína murino, encontrarán utilidad en este documento. Tales secuencias promotoras están disponibles comercialmente en, por ej., Stratagene (San Diego, CA).

Para los objetivos de la presente invención, serán de uso particular tanto los promotores heterólogos como otros elementos de control, tales como promotores inducibles y específicos del SNC, potenciadores y similares. Los ejemplos de promotores heterólogos incluyen el promotor CMB. Los ejemplos de promotores específicos del SNC incluyen aquellos aislados de los genes de proteína básica de mielina (MBP), de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y de la enolasa específica neuronal (NSE). Los ejemplos de promotores inducibles incluyen elementos de ADN que reaccionan con ecdisona, tetraciclina, hipoxia y aúfin.

El vector de expresión AAV que se encuentra en la molécula de ADN de interés unido por AAV ITRs, puede construirse insertando directamente la(s) secuencia(s) seleccionada(s) en el genoma de AAV que tuvo el marco de lectura abierto de AAV principal ("ORFs") escindido para ello. Pueden también deleccionarse otras porciones del genoma de AAV, siempre que se mantenga una porción suficiente de ITRs para permitir las funciones de replicación y encapsidación. Tales construcciones pueden diseñarse usando técnicas bien conocidas en la técnica. Ver, por ej., las Patentes de EE.UU. N° 5.173.414 y 5.139.941; Publicaciones Internacionales N° WO 92/01070 (publicada el 23 de Enero de 1992) y WO 93/03769 (publicada el 4 de Marzo de 1993); Lebkowski y col. (1988) *Molec. Cell. Biol.* 8: 3988-3996; Vincent y col. (1990) *Vaccines 90* (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B.J. (1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3: 533-539; Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158: 97-129; Kotin, R.M. (1994) *Human Gene Therapy* 5: 793-801; Shelling and Smith (1994) *Gene Therapy* 1: 165-169; y Zhou y col. (1994) *J. Exp. Med.* 179: 1867-1875.

Alternativamente, las AAV ITR pueden escindirse del genoma viral o del vector AAV que contiene el mismo y pueden condensarse 5' y 3' de una construcción de ácido nucleico seleccionada que está presente en otro vector usando técnicas de unión estándar, tales como aquellas descritas en Sambrook y col., *supra*. Por ejemplo, las uniones pueden lograrse en Tris-Cl 20 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, 33 µg/ml BSA, NaCl 10 mM-50 mM, y ya sea ATP 40

μ M, 0,01-0,02 (Weiss) unidades de ligasa de ADN T4 a 0°C (para unión complementaria “de extremos pegajosos”) ó ATP 1 mM, 0,3-0,6 (Weiss) unidades de ligasa de ADN T4 a 14°C (para unión inespecífica “de extremos romos”). Las uniones intermoleculares “de extremos pegajosos” usualmente se llevan a cabo a concentraciones de ADN total de 30-100 μ g/ml (concentración total final 5-100 nM). Los vectores AAV que contienen ITRs se describieron en, por ej., la

5 Patente de EE.UU. N° 5.139.941. En particular, varios vectores AAV que se describen en esa patente están disponibles en la American Type Culture Collection (“ATCC”) con Números de Acceso 53222, 53223, 53224, 53225 y 53226.

Adicionalmente, pueden producirse sintéticamente genes quiméricos para incluir secuencias AAV ITR en 5' y 3' de una o más secuencias del ácido nucleico seleccionado. Pueden usarse de preferencia codones para expresión de

10 secuencias de genes quiméricos en células de SNC de mamíferos. La secuencia quimérica completa está ensamblada a partir de oligonucleótidos superpuestos preparados por procedimientos estándar. Ver por ej., Edge, *Nature* (1981) 292: 756; Nambair y col. *Science* (1984) 223: 1299; Jay y col. *J. Biol. Chem.* (1984) 259: 6311.

Con el fin de producir viriones rAAV, se introduce un vector de expresión AAV dentro de una célula huésped

15 adecuada usando técnicas conocidas, tales como mediante transfección. Se conocen en la técnica de una cantidad de técnicas de transfección. Ver, por ej., Graham y col. (1973) *Virology*, 52: 456, Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Davis y col. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier y Chu y col. (1981) *Gene* 13: 197. Los procedimientos de transfección particularmente

20 adecuados incluyen coprecipitación con fosfato de calcio (Graham y col. (1973) *Virol.* 52: 456-467), microinyección directa en células cultivadas (Capecchi, M. R. (1980) *Cell* 22: 479-488), electroporación (Shigekawa y col. (1988) *BioTechniques* 6: 742-751), transferencia genética mediada por liposomas (Mannino y col. (1988) *BioTechniques* 6: 682-690), transducción mediada por lípidos (Felgner y col. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7417), y administración de ácido nucleico usando microproyectiles de alta velocidad (Klein y col. (1987) *Nature* 327: 70-73).

Para los objetivos de la invención, las células huésped adecuadas para producir viriones rAAV incluyen micro-organismos, células de levadura, células de insectos y células de mamíferos que pueden, o han sido usadas, como

25 receptoras de una molécula de ADN heterólogo. El término incluye la progenie de la célula original que fue transfectada. Por ello, una “célula huésped” como se usa en este documento generalmente se refiere a una célula que fue transfectada con una secuencia de ADN exógeno. Resultan de preferencia en la práctica de esta invención las células

30 de línea celular humana estable, 293 (fácilmente disponible en, por ej. la American Type Culture Collection bajo el Número de Acceso ATCC CRL1573). Particularmente, la línea celular humana 293 es una línea celular embrionaria de riñón humano que fue transformada con fragmentos de ADN de adenovirus tipo-5 (Graham y col. (1977) *J. Gen. Virol.* 36: 59), y expresa los genes adenovirales E1a y E1b (Aiello y col. (1979) *Virology* 94: 460). La línea celular de 293 es fácilmente transfectada y provee una plataforma particularmente conveniente para producir viriones rAAV.

35 *Funciones de ayuda al AAV*

Las células huésped que contienen los vectores de expresión AAV descritos anteriormente deben volverse capaces de proveer funciones de ayuda al AAV con el fin de replicar y encapsidar las secuencias de nucleótidos flanqueadas

40 por las AAV ITRs para producir viriones rAAV. Las funciones de ayuda al AAV son generalmente secuencias codificadoras derivadas de AAV que pueden expresarse para proveer productos génicos de AAV que, a su vez, funcionen en *trans* para una replicación de AAV productiva. Las funciones de ayuda al AAV se usan en este documento para complementar funciones necesarias de AAV que faltan en los vectores de expresión AAV. Por ello, las funciones de ayuda al AAV incluyen una, o ambas de las AAV ORFs principales, a saber las regiones codificantes *rep* y *cap*, u

45 homólogos funcionales de las mismas.

Los productos de expresión Rep mostraron tener muchas funciones, incluyendo, entre otras: reconocimiento, unión y corte del origen AAV de la replicación de ADN; actividad ADN helicasa; y modulación de transcripción de promotores AAV (u otros heterólogos). Los productos de expresión Cap aportan funciones de encapsidación necesarias. Las

50 funciones de ayuda al AAV se usan en este documento para complementar funciones de AAV en *trans* que faltan en los vectores AAV.

El término “construcción de ayuda al AAV” se refiere generalmente a una molécula de ácido nucleico que incluye secuencias de nucleótidos que proveen funciones de AAV eliminadas en un vector AAV que se usará para producir

55 un vector transductor para administrar una secuencia de nucleótidos de interés. Las construcciones de ayuda al AAV son usadas comúnmente para proveer la expresión transitoria de genes AAV *rep* y/o *cap* para complementar funciones AAV faltantes que son necesarias para la replicación lítica de AAV; sin embargo, las construcciones de ayuda carecen de AAV ITRs y no pueden por si mismas replicarse ni encapsidarse. Las construcciones de ayuda al AAV pueden estar en forma de un plásmido, fago, transposón, cósmido, virus o virión. Se han descrito una cantidad de construcciones

60 de ayuda al AAV, tales como los plásmidos comúnmente usados pAAV/Ad y pIM29+45 que codifican los productos de expresión Rep y Cap. Ver, por ej., Samulski y col. (1989) *J. Virol.* 63: 3822-3828; y McCarty y col. (1991) *J. Virol.* 65: 2936-2945. Se han descrito una cantidad de otros vectores que codifican los productos de expresión Rep y/o Cap. Ver, por ej., la Patente de EE.UU. 5.139.941.

Por “región codificadora de AAV *rep*” se quiere decir la región reconocida en la técnica del genoma de AAV que codifica las proteínas de replicación Rep 78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40. Estos productos de expresión Rep mostraron tener muchas funciones, incluyendo reconocimiento, unión y corte del origen AAV de la replicación de ADN; actividad

65 ADN helicasa; y modulación de transcripción de promotores AAV (u otros heterólogos). Los productos de expresión

Rep son necesarios en conjunto para la replicación del genoma de AAV. Para una descripción de la región codificadora de AAV *rep*, ver, por ej., Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158: 97-129; y Kotin, R. M. (1994) *Human Gene Therapy* 5: 793-801. Los homólogos adecuados de la región codificadora de AAV *rep* incluyen el gen *rep* del herpesvirus 6 humano (HHV-6) que también se sabe que media la replicación del ADN de AAV-2 (Thompson y col. (1994) *Virology* 204: 304-311).

Por “región codificadora de AAV *cap*” se quiere decir la región reconocida en la técnica del genoma de AAV que codifica las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3, u homólogos funcionales de las mismas. Estos productos de expresión Cap aportan las funciones de encapsidado necesarias en conjunto para encapsidar el genoma viral. Para una descripción de la región codificadora AAV *cap*, ver, por ej., Muzyczka and Kotin, R. M. (*supra*).

Las funciones de ayuda al AAV se introducen en la célula huésped transfectando la célula huésped con una construcción de ayuda al AAV previa a, o concurrentemente con, la transfección del vector de expresión AAV. Las construcciones de ayuda al AAV se usan de este modo para proveer al menos la expresión transitoria de los genes de AAV *rep* y/o *cap* para complementar las funciones de AAV faltantes necesarias para una infección de AAV productiva. Las construcciones de ayuda al AAV carecen de AAV ITRs y no pueden por sí mismas replicarse ni encapsidarse. Estas construcciones pueden estar en forma de un plásmido, fago, transposón, cósmido, virus o virión. Se han descrito una cantidad de construcciones de ayuda al AAV, tales como los plásmidos comúnmente usados pAAV/Ad y pIM29+45 que codifican los productos de expresión Rep y Cap. Ver, por ej., Samulski y col. (1989) *J. Virol.* 63: 3822-3828; y McCarty y col. (1991) *J. Virol.* 65: 2936-2945. Se ha descrito una cantidad de otros vectores que codifican los productos de expresión Rep y/o Cap. Ver, por ej., la Patente de EE.UU N°: 5.139.941.

Tanto los vectores de expresión de AAV como las construcciones de ayuda al AAV pueden construirse conteniendo uno o más marcadores seleccionables opcionales. Los marcadores adecuados incluyen genes que confieren resistencia a antibióticos o sensibilidad a antibióticos, imparten color a, o cambian las características antigénicas de aquellas células que han sido transfectadas con una construcción de ácido nucleico conteniendo el marcador seleccionable cuando las células se cultivan en un medio selectivo apropiado. Varios genes marcadores seleccionables que son útiles en la práctica de la invención incluyen el gen de resistencia a la higromicina B (que codifica fosfotransferasa de aminoglucósido (APH)) que permite la selección en células de mamífero al conferir resistencia a G418 (disponible en Sigma, St. Louis, Mo.). Los expertos en la técnica conocen otros marcadores adecuados.

Funciones Accesorias de AAV

La célula huésped (o célula de encapsidación) debe ser capaz de proveer funciones no derivadas de AAV, o “funciones accesorias”, con el fin de producir viriones rAAV. Las funciones accesorias son funciones virales y/o celulares no derivadas de AAV de las cuales AAV depende para su replicación. Por ello, las funciones accesorias incluyen al menos aquellas proteínas y ARNs no pertenecientes a AAV que son necesarias en la replicación de AAV, incluyendo aquellas involucradas en la activación de la transcripción del gen de AAV, en el corte y empalme de ARNm de AAV específico de fase, en la replicación de ADN de AAV, en la síntesis de productos de expresión Cap y en el ensamblaje de la cápside de la AAV. Las funciones accesorias basadas en virus pueden derivar de cualquier virus ayudante conocido.

Particularmente, las funciones accesorias pueden introducirse y posteriormente expresarse en las células huésped usando procedimientos conocidos en la técnica. Comúnmente, las funciones accesorias se proveen por medio de infección de las células huésped con un virus ayudante no relacionado. Se conoce una cantidad de virus ayudantes adecuados, incluyendo adenovirus; herpesvirus tales como los virus herpes simplex tipo 1 y tipo 2; y virus de vaccinia. Las funciones accesorias no virales también tienen utilidad en este documento, tales como aquellas provistas por sincronización celular usando cualquiera de los agentes conocidos. Ver, por ej. Buller y col. (1981) *J. Virol.* 40: 241-247; McPherson y col. (1985) *Virology* 147: 217-222; Schlehofer y col. (1986) *Virology* 152: 110-117.

Alternativamente, pueden proveerse funciones accesorias usando un vector de función accesoria. Los vectores de funciones accesorias incluyen secuencias de nucleótidos que proveen una o más funciones accesorias. Un vector de función accesoria es capaz de introducirse en una célula huésped adecuada con el fin de sustentar la producción eficiente de viriones AAV en la célula huésped. Los vectores de función accesoria pueden estar en forma de un plásmido, fago, transposón o cósmido. Los vectores accesorios pueden también estar en forma de uno o más fragmentos lineales de ADN o ARN que, cuando están asociados con los elementos de control y enzimas adecuados, pueden ser transcritos o expresados en una célula huésped para proveer funciones accesorias. Ver, por ej., la Publicación Internacional N° WO 97/17548, publicada el 15 de Mayo de 1997.

Las secuencias de ácidos nucleicos que proveen funciones accesorias pueden obtenerse de fuentes naturales, tales como del genoma de una partícula de adenovirus, o construidas usando procedimientos recombinantes o sintéticos conocidos en la técnica. En relación a esto, las funciones accesorias derivadas de adenovirus han sido ampliamente estudiadas, y se ha identificado y parcialmente caracterizado una cantidad de genes de adenovirus involucrados en funciones accesorias. Ver, por ej., Carter, B.J. (1990) “Adeno-Associated Virus Ayudante Functions”, en *CRC Handbook of Parvoviruses*, vol. I (P. Tijssen, ed.), y Muzyczka, N. (1992) *Curr. Topics. Microbiol. and Immun.* 158: 97-129. Se cree que, específicamente, las regiones tempranas de genes de adenovirus E1a, E2a, E4, VAI RNA y posiblemente, E1b participan en el proceso accesorio. Janik y col. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1925-1929. Se describieron también las funciones accesorias derivadas de herpesvirus. Ver, por ej., Young y col. (1979) *Prog. Med. Virol.* 25: 113.

Se han descrito también las funciones accesorias derivadas del virus vaccinia. Ver, por ej., Carter, B.J. (1990), *supra.*, Schlehofer y col. (1986) *Virology* 152: 110-117.

Como consecuencia de la infección de una célula huésped con un virus ayudante, o de la transfección de una célula huésped con un vector de función accesorias, las funciones accesorias se expresan lo que transactiva la construcción de ayuda al AAV para producir proteínas Rep y/o Cap de AAV. Los productos de expresión Rep escinden el ADN recombinante (incluyendo el ADN de interés) del vector de expresión de AAV. Las proteínas Rep también sirven para duplicar el genoma de AAV. Las proteínas Cap expresadas se ensamblan formando cápsides y el genoma de AAV recombinante se encapsida en dichas cápsides. De ello resulta la replicación productiva de AAV, y el ADN se encapsida para formar viriones rAAV.

Tras la replicación de AAV recombinante, los viriones rAAV pueden purificarse de la célula huésped usando una variedad de procedimientos convencionales de purificación, tal como gradientes de CsCl. Además, si se usa infección para expresar las funciones accesorias, los virus ayudantes residuales pueden inactivarse, usando procedimientos conocidos. Por ejemplo, los adenovirus pueden inactivarse calentando a temperaturas de aproximadamente 60°C durante, por ej. 20 minutos o más. Este tratamiento inactiva eficazmente sólo al virus ayudante ya que AAV es extremadamente estable mientras que el adenovirus ayudante es lábil frente al calor.

Los viriones rAAV resultantes están así listos para usar en la administración de ADN al SNC (por ej. cavidad craneana) del sujeto.

Administración de Vectores Virales

En general, los procedimientos de administración de vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vías intraarterial, intramuscular, intravenosa, intranasal y oral. Generalmente, los viriones rAAV pueden introducirse en células del SNC usando técnicas de transducción *in vivo* e *in vitro*. Si se transducen *in vitro*, la célula receptora deseada se retirará del sujeto, se transducirá con viriones rAAV y se reintroducirá en el sujeto. Alternativamente, pueden usarse células singeneicas o xenogeneicas cuando esas células no generan una respuesta inmune inapropiada en el sujeto.

Se han descrito procedimientos adecuados para la administración e introducción de células transducidas en un sujeto. Por ejemplo, las células pueden transducirse *in vitro* combinando viriones de AAV recombinantes con células del SNC por ejemplo, en un medio adecuado, y seleccionando aquellas células que contienen el ADN de interés usando técnicas convencionales tales como prueba de bandas de Southern y/o PCR, o usando marcadores seleccionables. Las células transducidas pueden posteriormente incluirse en formulaciones dentro de composiciones farmacéuticas, que se describen con mayor detalle a continuación, y esa composición puede introducirse en un sujeto mediante diversas técnicas, tales como injertando, mediante inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal.

Para la administración *in vivo*, los viriones rAAV se incluirán en formulaciones de composiciones farmacéuticas y generalmente se administrarán parenteralmente, por ej., por inyección intramuscular directamente en músculo esquelético o cardíaco o por inyección dentro del SNC.

Sin embargo, ya que los procedimientos convencionales tales como inyección no han demostrado proveer una administración de los vectores virales en extensión en el cerebro del sujeto, la presente invención se centra en el descubrimiento de que los vectores de AAV se administran eficientemente al SNC mediante sistemas de administración potenciados por convección (CED). Los autores de la presente invención son los primeros en describir y demostrar que CED pueden administrar AAV eficazmente, sobre regiones extensas del cerebro de un animal (por ej. striatum). Como se describe en detalle y ejemplifica y a continuación, estos procedimientos son adecuados para una variedad de vectores AAV, por ejemplo vectores AAV que llevan genes indicadores (por ej. timidina quinasa (tk)) o genes terapéuticos (por ej. AADC y tk).

Cualquier dispositivo para administración potenciada por convección puede ser apropiado para administración de vectores virales. En una forma de realización de preferencia, el dispositivo es una bomba osmótica o una bomba de infusión. Tanto la bomba osmótica como la bomba de infusión se encuentran disponibles comercialmente de una diversidad de proveedores (por ejemplo Alzet Corporation, Hamilton Corporation, Alza, Inc. Palo Alto, California). Típicamente, un vector viral se administra por medio de dispositivos CED como se describe a continuación. Se inserta un catéter, cánula u otro dispositivo de inyección en el tejido del SNC del sujeto elegido. En vista de las enseñanzas de este documento, un experto en la técnica puede fácilmente determinar qué área general del SNC es un blanco apropiado. Por ejemplo, cuando se administra AAV-AADC para tratar PD, el striatum es un área blanco adecuada del cerebro. Se dispone de mapas estereotácticos y dispositivos de posicionamiento, por ejemplo de ASI Instruments, Warren, MI. El posicionamiento puede también llevarse a cabo usando mapas anatómicos obtenidos por formación de imágenes con TC y/o RMI del cerebro del sujeto para ayudar a guiar el dispositivo de inyección hacia el blanco objetivo. Además, dado que los procedimientos descritos en este documento pueden practicarse de manera tal que áreas relativamente grandes del cerebro asuman los vectores virales, se necesitan menos cánulas de infusión. Dado que las complicaciones quirúrgicas están relacionadas con el número de penetraciones, los procedimientos descritos en este documento sirven también para reducir efectos secundarios que se observan con las técnicas de administración convencionales.

Las composiciones farmacéuticas comprenderán material genético suficiente para producir una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de interés, por ej. una cantidad suficiente para reducir o mejorar los síntomas del estado morbo en cuestión o una cantidad suficiente para brindar el beneficio deseado. Las composiciones farmacéuticas contendrán un excipiente aceptable farmacéuticamente. Tales excipientes incluyen cualquier agente farmacéutico que no induzca por si mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición y que pueda administrarse sin una toxicidad no deseada. Los excipientes aceptables farmacéuticamente incluyen, pero no están limitados a sorbitol, Tween80 y líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Pueden incluirse también sales farmacéuticamente aceptables en esto, por ejemplo sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Adicionalmente, pueden estar presentes en tales vehículos sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH y similares. Se encuentra disponible una completa discusión acerca de excipientes farmacéuticamente aceptables en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N. J. 1991).

Como resulta evidente para aquellos expertos en la técnica en vista de las enseñanzas de esta memoria descriptiva, se puede determinar empíricamente una cantidad eficaz de vector viral que se debe añadir. La administración puede efectuarse en una dosis, de manera continua o intermitente a través del curso del tratamiento. Los procedimientos para determinar los medios y dosificaciones más eficaces de administración se conocen bien por los expertos en la técnica y variarán con el vector viral, la composición de la terapia, las células blanco y el sujeto a tratar. Pueden realizarse administraciones únicas y múltiples siguiendo el patrón y el nivel de dosis seleccionado por el médico que trata.

Se debería entender que más de un transgén podría expresarse por el vector viral administrado. Alternativamente, pueden también administrarse al SNC vectores separados, cada uno expresando uno o más transgenes diferentes. Además, se desea también que los vectores virales administrados por los procedimientos de la presente invención se combinen con otras composiciones y terapias adecuadas. Por ejemplo, como se describe en detalle en los Ejemplos a continuación, la enfermedad de Parkinson puede tratarse administrando conjuntamente un vector AAV que expresa AADC en el SNC (por ej. dentro del núcleo caudado o putamen del striatum) y agentes adicionales, tales como precursores de dopamina (por ej. L-dopa) inhibidores de la síntesis de dopamina (por ej. carbidopa), inhibidores de catabolismo de dopamina (por ej., inhibidores MAO), los agonistas o antagonistas de dopamina pueden administrarse previamente o subsiguientemente o simultáneamente con el vector que codifica AADC. Por ejemplo, L-dopa y, opcionalmente carbidopa pueden administrarse sistémicamente. De esta manera, se restituye la dopamina que se reduce de forma natural en los pacientes con PD, aparentemente por la expresión de AADC que es capaz de convertir L-dopa en dopamina. En casos en que el transgén (por ej. AADC) está bajo el control de un promotor inducible, pueden administrarse ciertos compuestos administrados sistémicamente tales como muristerona, ponasteron, tetraciclina o aúfin con el objeto de regular la expresión del transgén.

Tratamiento de Afecciones del SNC

Los vectores virales que expresan transgenes terapéuticos pueden usarse para tratar diversos trastornos del SNC al proveer proteínas o polipéptidos terapéuticos. En la presente invención, los vectores AAV se administran al SNC por medio de los procedimientos CED descritos en este documento ya que estos procedimientos proveen la primera forma eficaz de distribuir extensamente vectores AAV en el SNC. Ejemplos no limitantes de trastornos del SNC que se pueden tratar incluyen tumores, daño resultante de apoplejía y enfermedades neurodegenerativas.

Enfermedad de Parkinson

En una realización preferida de la presente invención, se usan vectores AAV que proveen la enzima AADC para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Como se describió anteriormente, la enfermedad de Parkinson es el resultado de una pérdida selectiva de neuronas nigroestriatales dopaminérgicas, lo que genera una pérdida de entrada desde la sustancia nigra hacia el striatum. Se han creado modelos animales de PD, por ejemplo, tratando ratas o primates con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) para destruir células dopaminérgicas o lesionando primates con la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropiridina (MPTP), que produce una enfermedad similar al Parkinson.

La presente invención provee la primera evidencia de que la actividad dopaminérgica puede ser restituida en pacientes con Parkinson (por ej., monos lesionados con MPTP), por medio de la administración de vectores AAV que llevan el transgén para AADC en combinación con la administración sistémica (por ej. oral) de L-dopa y, opcionalmente, de carbidopa. Las sugerencias previas para la terapia génica del Parkinson estuvieron enfocadas hacia la deficiencia de tirosina hidroxilasa según progresa la enfermedad. Estas sugerencias, por lo tanto, exigen el restablecimiento de la síntesis de dopamina en la vía nigroestriatal por medio de la expresión exitosa de al menos tres transgenes con el fin de generar dopamina *in situ*: el gen de tirosina hidroxilasa; el gen para el cofactor biotreno, GTP-ciclohidroxilasa-1; y el gen para AADC. Además de los problemas asociados con la administración de tres genes en niveles adecuados, la regulación de los niveles de dopamina resultaría difícil de controlar usando este enfoque.

Los autores de la presente invención demostraron que un transgén (por ej., AADC) en combinación con L-dopa provee beneficios terapéuticos. AADC es la enzima involucrada en la etapa final de la biosíntesis de dopamina, convirtiendo L-dopa en dopamina. Por ello, representa una clara ventaja en el enfoque terapéutico con AADC para restituir la actividad dopaminérgica que sólo debe administrarse un gen y la regulación de los niveles de dopamina es posible

controlando los niveles periféricos de L-dopa. Además, administrando sólo el gen AADC, la L-dopa puede usarse como un profármaco para regular los niveles de dopamina en el striatum.

Dado que los nucleótidos que codifican AADC administrados por medio de vectores AAV parecen expresarse fundamentalmente en las neuronas del striatum, otra ventaja terapéutica importante es la provisión en el tratamiento de un mecanismo tamponador para L-dopa. Se atribuyen muchos efectos secundarios, tales como disquinesias, al tamponado ineficaz del cerebro Parkinsoniano. Los procedimientos descritos en este documento evitan este problema permitiendo el almacenamiento de L-dopa no metabolizada en las neuronas. Como se ejemplifica a continuación la administración de AADC al striatum tratado con MPTP permite la conversión de L-dopa en dopamina y el siguiente metabolismo a DOPAC y HVA por las neuronas del striatum. En base a los datos obtenidos con FMT PET, parece que las neuronas del striatum pueden también almacenar dopamina, ya que se visualizó FMT en esta región. De hecho, las tasas de conversión de L-dopa a dopamina tras la transferencia del gen AADC fueron tan altas e importantes como las observadas en el striatum normal (ver, por ej., Figura 7). Además, aunque la enfermedad de Parkinson es una afección progresiva, no es probable que un proceso degenerativo en curso afecte la expresión de AADC en las neuronas del striatum ya que éstas no son típicamente afectadas por la enfermedad de Parkinson idiopática.

La degeneración del sistema dopaminérgico en pacientes con enfermedad de Parkinson idiopática no es uniforme. La vía nigroestriatal degenera a una velocidad mucho más rápida que la vía mesolímbica, dejando a los pacientes con un desequilibrio entre la actividad de las dos vías. A medida que progresa la enfermedad, se necesitan niveles más altos de L-dopa para compensar la degeneración de la vía nigroestriatal, pero esto también da como resultado mayores niveles de dopamina en aumento en los núcleos accumbens y otras partes del sistema mesolímbico. Tal sobreestimulación puede ser responsable de algunos de los efectos secundarios asociados con el tratamiento con L-dopa tales como alucinaciones. De manera similar, el MPTP deja al sistema dopaminérgico mesolímbico relativamente libre (ver, Figura 7, no hay presencia de innervación dopaminérgica en el caudado y en el putamen, se ve una lesión parcial en el núcleo accumbens). Como se muestra en la Figura 7, AAV-AADC puede restituir el desequilibrio casi hasta la normalidad, por lo tanto, es posible que se necesiten dosis menores de L-dopa tras la restitución de los niveles de enzima AADC y el aumento de las tasas de conversión de L-dopa en dopamina. Esto puede reducir la sobreestimulación del sistema mesolímbico, dando como resultado menos efectos secundarios relacionados con L-dopa/carbidopa.

Como se explicó anteriormente, los vectores AAV-AADC se administran por medio de los procedimientos CED descritos en este documento. Como se ejemplifica a continuación, tales procedimientos de administración proveen una distribución y expresión extensa en las neuronas del SNC y por lo tanto proveen un régimen de tratamiento nuevo para PD.

Ejemplos

A continuación se dan ejemplos de formas de realización específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen ilustrativamente y no pretenden limitar el alcance de la presente invención en ningún caso.

Se realizaron esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ej. cantidades, temperaturas, etc.), pero debería tenerse en cuenta, por supuesto, algún error experimental y alguna desviación experimental.

Ejemplo 1

Construcción y producción de AAV-tk

El vector AAV-tk se construyó poniendo el gen de timidina quinasa (tk) del virus herpes simplex bajo el control transcripcional del promotor inmediato temprano del citomegalovirus (CMV) en un plásmido basado en pUC (disponible en Roche Molecular Biochemicals). Se colocó un intrón de β -globina directamente secuencia arriba del gen tk y se colocó poli-A de hormona de crecimiento humana secuencia abajo. El módulo entero se flanqueó por repeticiones terminales invertidas de AAV (ITRs), que son necesarias para la expresión genética, replicación y encapsidación de las partículas virales.

Los viriones AAV recombinantes se produjeron en células 293 humanas (fácilmente disponibles en por ej., la American Type Culture Collection bajo el Número de Acceso ATCC CRL1573) como sigue. Se cultivó la línea celular 293 en DMEM completo (Biowhittaker) conteniendo 4,5 g/l de glucosa, suero de ternera fetal inactivado por calor al 10% (FCS; Hyclone), y glutamina 2 mM. Se cotransfectaron células 293 subconfluentes por precipitación con fosfato de calcio (ver, por ej. Sambrook, y col.) con el módulo de expresión AAV-tk flanqueado por ITRs y plásmidos ayudantes derivados tanto de AAV (pw1909, conteniendo los genes de AAV rep y cap) como de adenovirus (pLadenol, conteniendo genes ARN E2a, E4 y VA_I, VA_{II} adenovirales). Después de 6 horas, se cambió el medio por DMEM sin suero y se continuó la incubación a 37°C en CO₂ al 5% durante 72 horas. Se lisaron las células sedimentadas en tampón Tris (Tris 100 mM/NaCl 150 mM, pH 8-0) en tres ciclos de congelación/descongelación y se clarificaron los lisados de restos celulares por centrifugación a 10.000 g durante 15 minutos. Para formar sedimentos con las proteínas no virales, se centrifugó el lisado clarificado a 10.000 durante 15 minutos tras agregar CaCl₂ hasta una concentración final 25 mM y se incubó durante 1 hora a 0°C. Se agregó polietilenglicol 8000 (PEG) al sobrenadante resultante (concentración final = 8%); se incubó esta solución durante 3 horas a 0°C y se centrifugó a 3.000 g durante

30 minutos. El sedimento conteniendo el vector se solubilizó en Hepes Na 50 mM/NaCl 150 mM/EDTA 25 mM, pH 8,0 y se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos para formar un sedimento y eliminar el material insoluble.

Se llevó a cabo la centrifugación en gradiente isopícnico de cloruro de cesio y se recuperó AAV-tk del gradiente resultante aislando las fracciones con densidad promedio de 1,38 g/ml. Se usó otra vez PEG para concentrar el vector, que posteriormente se resuspendió en Hepes Na 25 mM/NaCl 150 mM, pH 7,4 y se centrifugó como se describió para eliminar el material insoluble. Se trató la solución madre con ADNasa y se determinó el título del vector por medio de hibridación mancha-transferencia cuantitativa.

Ejemplo 2

Administración in vivo de AAV-tk: dosificaciones y procedimientos

Para determinar la dosis apropiada de AAV a introducir dentro del cerebro, se llevó a cabo el siguiente estudio. Se usó el striatum para probar la respuesta a las dosis del vector AAV debido a su área relativamente extensa de tejido homogéneo y debido a que es un blanco para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y otras afecciones del sistema nervioso central.

Además, se determinaron procedimientos eficaces para administrar el vector en el SNC. La inyección estereotáctica simple de agentes terapéuticos ha mostrado dar como resultado un volumen limitado de distribución en el cerebro (Kroll y col. (1996) Neurosurgery 38: 746-754). Por lo tanto, se usaron bombas de infusión lenta para mantener un gradiente de presión durante la administración intracraneal. Los estudios previos en los que se administraron moléculas pequeñas, medianas y grandes al cerebro demostraron que las bombas de infusión lenta dan como resultado una distribución tisular extensa y homogénea.

Para investigar qué procedimiento de administración por inyección intracraneana del vector es más eficaz, se administraron $2,5 \times 10^{10}$ partículas de AAV-tk a ratas usando la bomba de infusión Harvard (Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA) o bombas osmóticas subcutáneas Alzet (Alza Scientific Products, Palo Alto, CA). Se anestesiaron ratas hembra Sprague-Dawley (250-300 g) de Charles River Laboratories (Wilmington MA) con una inyección intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg de peso corporal) y xilazina (10 mg/kg de peso corporal) y se prepararon para cirugía. Durante la cirugía, se mantuvo la sedación con isoflurano (Attrane, Omeda PPD Inc., Liberty NJ) y las velocidades de flujo de O_2 se mantuvieron en 0,3-0,5 l/min. Se fijó la cabeza de cada rata en un aparato estereotáctico (Small Animal Stereotactic Frame; ASI Instruments, Warren, MI) con soportes para las orejas y se le realizó una incisión en la piel en la línea media para exponer el cráneo. Se realizó una perforación con un trépano en el cráneo en una posición 1 mm anterior al bregma y 2,6 mm lateral a la línea media usando un taladro dental pequeño. Se administró el vector al hemisferio izquierdo en una profundidad de 5 mm usando una bomba de infusión o bombas osmóticas subcutáneas.

Para estudios de dosificación, se dividieron los animales en 3 grupos de 6 animales por grupo. Se administró de manera continua AAV-tk a cada rata a una velocidad de 8 μ l/h durante 2,5 horas usando una bomba de infusión Harvard. La cámara de carga (tubuladura de Teflon 1/16" (2,54/40,64 cm) DE x 0,03" (0,0762 cm) DI) y la cámara de infusión adjunta (1/16" (2,54/40,64 cm) DE x 0,02" (0,0508 cm) DI) se cargaron con $2,5 \times 10^8$, $2,5 \times 10^9$ ó $2,5 \times 10^{10}$ partículas de AAV-tk en un volumen total de 20 μ l de LCR artificial (NaCl 148 mM, KCl 3 mM, $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ 1,4 mM, $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ 0-8 mM, $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ 1,3 mM, $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ 0,2 mM). La administración se realizó a través de una aguja de calibre 27 ajustada con sílice de fusión, que fue extraída gradualmente 15 minutos tras la infusión.

Alternativamente, se usaron bombas osmóticas subcutáneas para administrar el vector a un grupo de 6 animales. Se administró AAV-tk de manera continua a cada rata a una velocidad de 8 μ l/h durante 24 horas usando bombas osmóticas Alzet, modelo #2001D (ALZA Scientific Products, Palo Alto, CA). Se cargó el reservorio de la bomba y el catéter adjunto (tubuladura de polietileno 60) con $2,5 \times 10^{10}$ partículas de AAV-tk en un volumen total de 200 μ l de LCR artificial (Harvard Apparatus Inc., Holliston, Mass). La administración se realizó a través de una cánula de calibre 27 ajustada con sílice condensada. Luego de la ubicación estereotáctica, se aseguró la cánula al cráneo un tornillo pequeño de acero inoxidable y cemento dental y se implantó la bomba de manera subcutánea en el área media escapular del lomo. El campo quirúrgico se cerró en capas anatómicas con clips de sutura de 9 mm. Veinticuatro horas más tarde se retiraron las bombas ajustando y sellando los catéteres pero se dejaron las cánulas implantadas en el lugar. Las perforaciones craneanas se sellaron con cera ósea.

Todos los procedimientos quirúrgicos, cuidado y alojamiento de los animales y recolección de tejidos fueron llevados a cabo en las instalaciones Richmond del Berkeley Antibody Co. (Berkeley, CA).

Histología

Se sacrificó a los animales con sobredosis de pentobarbital (dosis) y se les infiltró a través de la aorta ascendente PBS enfriado con hielo y paraformaldehído tamponado neutro 4%. Se extrajeron los cerebros de los cráneos, se post-fijaron por inmersión en el mismo fijador durante 24 h, se equilibraron en sacarosa al 30% y se congelaron en isopentano a -70°C. Posteriormente se colocaron en un criostato y se recolectaron secciones en serie de 40 micrones de la corteza prefrontal a la mitad del cerebro. De cada cerebro se realizaron aproximadamente 150 secciones, que

ES 2 326 893 T3

abarcaron una longitud antero-posterior (AP) de 6-8 mm. Para el análisis histológico de rutina se realizó la tinción H & E a cada sección IP. Las secciones seleccionadas representando las diferentes secciones del cerebro se tiñeron con cristal violeta para determinar la densidad celular general. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

	Sangrado de Infiltr. Celular	Reciente	Hemosiderina	Marca de Necrosis	Aguja
Bomba de Infusión (2×10^8)	-	-	-	-	Líneas finas
Bomba de Infusión (2×10^9)	-	-	+	-	Líneas finas
Bomba de Infusión (2×10^{10})	-	++(1/6)	++(4/6)	-	Líneas finas
Bomba osmótica (2×10^{10})	+++ (5/6)	+++	++	+++	Agujeros

Análisis por PCR

Se trataron 2 grupos adicionales de ratas, con dos animales por grupo, con $2,5 \times 10^{10}$ partículas de AAV-tk con el propósito de determinar la distribución tisular del vector. Uno de los grupos recibió el vector por infusión y el otro por bomba osmótica, como se describió anteriormente. Los animales se sacrificaron 3 semanas después usando inhalación de CO_2 y se recolectaron muestras de 15 órganos y tejidos de cada rata incluyendo cerebro derecho, cerebro izquierdo, médula espinal, ojo derecho, ojo izquierdo, corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, ovario, timo, nódulo linfático, médula ósea y músculo de la pata. Se usaron técnicas estériles y los tejidos se recolectaron usando kits de extracción de suturas descartables que se cambiaron entre cada muestra. Los tejidos se congelaron inmediatamente en N_2 líquido y se conservaron a -70°C hasta el procesamiento para ADN genómico. La PCR se llevó a cabo usando Kit GeneAmp PCR Core de Perkin Elmer y dos oligonucleótidos de 30 bases de la secuencia de tk (5'-AAGTCATCGGCTCGGG TACGTAGACGATATC-3' (SEC ID N° 1) y 5'-ATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATCTGC-3' (SEC ID N° 2)). Las reacciones se llevaron a cabo en un ciclador térmico PTC-100 (MJ Research, Inc.) y dieron como resultado 158 pb por producto en muestras donde estaba presente el vector.

Inmunohistoquímica

Se usó inmunohistoquímica para detectar la expresión del transgén en cada sección siguiente a una teñida con H & E. Por ello, una de cada 12 secciones se lavó en PBS, se trató con H_2O_2 al 3% durante 30 min para bloquear la actividad peroxidasa endógena, se aclaró nuevamente en H_2O destilada y PBS y se incubó en solución bloqueante (suero de cabra al 10% + Triton-X100 al 0,01% en PBS) durante 30 min. Posteriormente, se incubaron las muestras en anticuerpo anti-tk policlonal (Yale) (1:1000) durante una hora, se lavaron tres veces en PBS, se incubaron en IgG anti conejo de cabra biotinilada (Vector) (1:300) durante una hora y se lavaron nuevamente. La unión de los anticuerpos se visualizó con Estreptavidina y peroxidasa del rábano picante (1:300) y cromógeno VIP (Vector).

Análisis cuantitativo

La expresión del transgén se cuantificó para cada cerebro usando un microproyector Ken-a-vision para proyectar las secciones inmunoteñidas-tk en una tabla gráfica ARTZII. Se usó el programa NIH image 1.6 para capturar y analizar imágenes. El número estimado total de células positivas para cada cerebro se determinó con un aumento de 100X usando la siguiente fórmula:

$$\text{Número total de células tk} = (n_1 + n_2 + n_3 \dots) \times 12 \times k$$

n = células positivas/sección

k = factor de corrección derivado de la ecuación de Ambergrombie (1946):

$k = T/(T+D)$ T = espesor de la sección (40 μ); D= diámetro celular (16 μ); k = 0,71

Los volúmenes de las regiones inmunorreactivas-tk se determinaron midiendo áreas de expresión de tk usando imágenes capturadas proyectadas con un aumento de 50X y calculándolos de la siguiente manera:

$$V = A_x \times L$$

$$A_x = \text{área promedio (mm}^2\text{)} = \frac{a_1 + a_2 + a_3 \dots}{n} \quad \frac{A_n}{n}$$

(en la que L = distancia AP (μ) de tinción = n x 12 x 40 μ y n = número de secciones teñidas).

Para determinar cuantos virus se necesitan para transducir eficazmente el tejido cerebral, se llevaron a cabo comparaciones de secciones inmunoteñidas entre ratas que recibieron $2,5 \times 10^8$, $2,5 \times 10^9$ ó $2,5 \times 10^{10}$ partículas de AAV-tk por medio de bomba de infusión Harvard.

Con todos los parámetros medidos, se observó una clara respuesta a la dosis. El tejido infundido de animales que recibieron los títulos más altos demostró una expresión del transgén en un promedio de 300 mm³ de tejido (o aproximadamente el 60% de un hemisferio cerebral de rata adulta (Leyden y col. (1998) Behav. Brain Res. 87: 59-67)) comparado con volúmenes de 10 mm³ del grupo que recibió una dosis media y < a 1 mm³ para el grupo que recibió dosis bajas (Fig. 1a). Los volúmenes se calcularon a partir de las áreas medias y las longitudes de tinción que mostraron diferencias significativas entre los grupos (Fig. 1b, c). La expresión dentro de un volumen de tejido transducido no fue uniforme, sin embargo exhibió un gradiente de tinción. Las áreas directamente alrededor de los sitios de inyección se marcaron fuertemente mientras que se detectaron menos células positivas a medida que aumentaba la distancia desde el tracto de la aguja (Fig. 2). Finalmente, la Fig. 1d ilustra que la totalidad de las células positivas para tk en la sección del grupo que recibió dosis alta, promediaron de forma estimada 169.000, lo que es aproximadamente 10 veces mayor que el del grupo que recibió dosis medias.

Administración con bomba de infusión versus bomba osmótica

Las comparaciones de las secciones de cerebro inmunoteñidas demostraron similitudes y diferencias en las capacidades de las dos bombas para administrar el vector. No se evidenció diferencias significativas en la expresión de tk entre los dos grupos según se midieron como volumen medio, área, distancia AP y número total estimado de células positivas (Fig. 3a, d). Debido a que se perdió algo de tejido alrededor de los tractos de la aguja de todas las muestras dentro del grupo en el que se usó bomba osmótica (datos no mostrados), el valor medio verdadero para el número de células positivas estimadas de ese grupo puede ser mayor. Además, aunque ambos procedimientos de administración dieron como resultado una expresión del transgén notable, hubo una diferencia en el tipo de células que resultaron marcadas. Los tejidos infundidos con el vector expresaron tk casi exclusivamente en las neuronas (Fig. 4a, b) y los tejidos que recibieron el vector por medio de la bomba osmótica exhibieron expresión en neuronas y en células gliales reactivas cercanas al sitio de inyección (Fig. 4c, d).

Distribución Tisular

Se llevó a cabo análisis PCR en 15 órganos y tejidos diferentes de cada una de tres ratas que recibieron una dosis alta del vector para determinar si el AAV recombinante podría detectarse en posiciones distantes del sitio de administración intracraneana. Independientemente del procedimiento de administración (bombas de infusión u osmóticas), se pudo detectar un producto de PCR de 458 pb del gen de tk en médula espinal, bazo y ambos hemisferios del cerebro usando análisis de bandas de Southern (Fig. 6). En una de las ratas, se detectaron los vectores en tejido del riñón.

Toxicidad

Para evaluar si la toxicidad estaba o no asociada con algunos de los procedimientos de administración, se realizaron estudios histopatológicos en secciones teñidas con H & E de cada grupo y los resultados se resumieron en la tabla 1. La morfología tisular general se conservó bien y no se presentaron artefactos por la congelación ni otros artefactos. En los grupos con administración por infusión, el daño tisular, si se presentó fue mínimo. No hubo infiltración celular, ni necrosis en el tracto de la aguja y hubo una mínima necrosis cortical en unos pocos de los animales. Se encontró

sangrado fresco en una de las ratas del grupo de dosis alta, y también se encontró hemosiderosis, en cuatro de los animales que recibieron dosis alta, indicando sangrado moderado en el pasado. Alternativamente, se observó daño serio en todos los animales del grupo con administración con bomba osmótica incluyendo áreas necróticas extensas alrededor del tracto de la aguja, infiltrados celulares, y hemosiderosis.

Por ello, es suficiente la infusión de $2,5 \times 10^{10}$ partículas de AAV-tk a $8 \mu\text{l/hora}$ durante 2,5 horas para distribuir parcialmente el vector AAV a un volumen de 300 mm^3 de tejido. Dentro de esta región, se observó un gradiente de expresión con tñido intenso directamente alrededor del sitio de la inyección y menos células positivas más lejos. La distribución parece estar en función de la dosis (número de partículas) y no en función del tiempo de administración o del volumen de muestra cuando se comparan dos sistemas de administración con bomba diferentes: la distribución de $2,5 \times 10^{10}$ partículas fue la misma ya sea con la administración por medio de bomba osmótica (volumen = $200 \mu\text{l}$, velocidad = $8 \mu\text{l/h}$, tiempo = 24 h) o bomba de infusión (volumen = $20 \mu\text{l}$, velocidad = $8 \mu\text{l/h}$, tiempo = 2,5 h). Además, se observaron niveles de expresión llamativamente diferentes entre los tres grupos de administración por infusión, donde el volumen de muestra, velocidad, y tiempo de administración se mantuvieron constantes y el número de partículas fue la única variable.

Estos resultados obtenidos con administración de AAV potenciada por convección son consistentes con aquellos obtenidos en estudios CED de macromoléculas grandes, tales como partículas supramagnéticas en cerebro de rata. (Kroll y col. (1996) *Neurosurg.* 38: 746-754, Patente de EE.UU. N° 5.720.720). Kroll y col. usaron imágenes obtenidas por resonancia magnética y tñido histoquímico y demostraron que la dosis fue la variable más importante para maximizar la distribución de partículas en el tejido. Kroll describe que independientemente de si el volumen de infusión era pequeño ($2 \mu\text{l}$) o moderado ($24 \mu\text{l}$) o si la velocidad de infusión era baja ($6 \mu\text{l/h}$) o alta ($72 \mu\text{l/h}$), incrementar las partículas de 5,3 a $26,5 \mu\text{g}$ dio como resultado un incremento de hasta 5 veces en el volumen de su distribución en el tejido.

Con respecto a la especificidad del tipo celular, se ha descrito previamente que AAV es capaz de transducir neuronas y el presente estudio confirma este hallazgo. El hecho de que la expresión fuera tan importante en neuronas sugiere que los vectores de terapia génica AAV que emplean el promotor de CMV resultan útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson y el Alzheimer. No se vio ninguna expresión en células gliales maduras, excepto en áreas pequeñas de tejido afectado donde se presentó gliosis activa. Sin embargo, los autores de la presente invención han demostrado previamente que el vector AAV-CMV-tk se expresa bien en células de glioma y, cuando se administra en conjunto con el profármaco ganciclovir, es eficaz en tratar gliomas experimentales en ratones desnudos. Dado que se cree que el gen "suicida" tk es tóxico para las células en división, sólo representaría un riesgo para las células tumorales marcadas y no para las neuronas circundantes. Finalmente, mientras que el promotor de CMV usado en este estudio permite una fuerte expresión del transgén en neuronas, la elección de promotores específicos de tipo celular permitirá dirigir AAV a otros componentes del SNC tales como oligodendrocitos y células gliales.

El presente estudio también mostró que el AAV administrado al cerebro está contenido en su mayor parte en el sistema nervioso central. Otros han demostrado transporte retrógrado de virus entre los dos hemisferios del cerebro y capacidad de los virus para alcanzar la médula espinal circulando por el líquido cefalorraquídeo. La aparición del vector en el bazo es curiosa y sugiere un par de mecanismos. Uno es que el virus penetra en el torrente sanguíneo durante el procedimiento de infusión y circula a través del bazo donde se "acepta". Si éste fuera el caso, sin embargo, sería de esperar que otros tejidos que han mostrado ser inducibles por AAV llevaran también el virus. Otro mecanismo posible podría ser uno exhibido por células dendríticas. Estas células encontradas principalmente en la piel, recogen material extraño, entran a la circulación y se concentran en el bazo donde el material extraño puede permanecer durante largo tiempo en espera de su procesamiento o destrucción. En cualquier caso, hemos visto que independientemente de la vía de administración, incluyendo la intramuscular, intravenosa y ahora intracerebral, el vector siempre se detecta en el bazo.

En resumen, la infusión lenta intracraneal de altas dosis de vector AAV ha mostrado transducir una porción significativa del cerebro en un modelo roedor. AAV se puede usar para dirigirse a una miríada de afecciones nerviosas centrales, incluyendo tumores, lesión resultante de apoplejía, y enfermedad neurodegenerativa.

Ejemplo 3

Terapia génica de la enfermedad de Parkinson

La administración potenciada por convección de vectores AAV con el transgén que codifica AADC se mostró para restaurar sistemas dopaminérgicos en monos con enfermedad de Parkinson inducida por MPTP como sigue.

Animales

Se eligieron monos Rhesus ($n = 4$, 3-5 kg) como candidatos para la implantación en base a la evolución de sus síntomas parkinsonianos. Los animales se lesionaron por medio de infusión con 2,5-3,5 mg de MPTP-HCL a través de la arteria carótida interna derecha (referida al lado ipsilateral) seguida de 4 dosis I.V. de 0,3 mg/kg de MPTP-HCL (referidas al lado contralateral) hasta que se alcanzó un síndrome hemiparkinsoniano estable, sobrelesionado (Eberling, (1998) *Brain Res.* 805: 259-262). El modelo MPTP en primate se considera el modelo por excelencia de evaluación

previo a ensayos en seres humanos. (Langston (1985) *Trends Pharmacol. Sci.* 6: 375-378). El MPTP se convierte en el SNC en MPP+ por la monoamino oxidasa B. MPP+ es una potente neurotoxina que causa degeneración en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y pérdida de la vía de la dopamina nigro-estriatal, como se puede ver en la enfermedad de Parkinson. Los animales lesionados con MPTP se evaluaron clínicamente una vez por semana usando una escala de valoración clínica y controlando la actividad durante 5 meses antes de la cirugía.

Tras la administración de MPTP, los animales desarrollaron signos clínicos de enfermedad de Parkinson manifestados por lentitud general, bradiquinesia, rigidez, trastornos de equilibrio y postura flexionada. Todos los monos usaron menos frecuentemente el brazo izquierdo que el derecho, y todos mostraron signos de temblor. Usando la escala de valoración clínica, todos los monos tuvieron valores parkinsonianos estables de moderados a severos ($23 \pm 1,7$; $23 \pm 1,2$; $24 \pm 1,7$; 19 ± 3) durante el periodo de 5 meses tras la administración de MPTP.

Producción de Vectores

1. pAAV-AADC:

Se clonó un ADNc de AADC humano de BamHI/PvuII de 1,5 kb (Fan y col. (1998) *Human Gene Therapy* 9: 2527-2535) en el módulo de expresión de AAV pV4.1c en los sitios de BamHI/HindII. El módulo de expresión contiene un promotor de CMV, un intrón químico compuesto por un donador de corte y empalme de CMV y un sitio aceptor de corte y empalme de β -globina humana, secuencia de poliadenilación de hormona de crecimiento humana y secuencias AAV ITRs (repeticiones terminales invertidas) flanqueantes (Herzog, R. W., y col. (1999) *Nature Medicine* 5: 56-63).

2. pAAV-LacZ:

El vector pAAV-LacZ se construyó como sigue. Se reemplazó la región codificadora de AAV de pSub201 (Samulski y col. (1987) *J. Virol.* 61: 3096-3101), entre los sitios de *XbaI*, con conectores de *EcoRI*, dando como resultado el plásmido pAS203. Se volvió de extremos romos el fragmento de *EcoRI* para *HindIII* de pCMVB (CLONOTECH) y se clonó en el sitio de *EcoRI* tratado con Klenow de pAS203 para proporcionar pAAV-LacZ.

3. pH19:

El plásmido H19 codifica un genoma de AAV-2 modificado diseñado para la producción del vector AAV potenciada mientras que suprime la generación del virus de replicación del tipo pseudo salvaje competente. El plásmido contiene un promotor P5 movido a una posición 3' del gen cap y el promotor se reemplaza por una región no traducida en 5' compuesta principalmente por una secuencia de reconocimiento de recombinasa FLP. El pH19 se construyó para eliminar cualesquiera regiones de homología entre los extremos 3' y 5' del genoma de AAV. Adicionalmente, la caja TATA de siete pares de bases del promotor pH19P5 se destruyó por mutación de esa secuencia a GGGGGG.

El pH19 se construyó en un procedimiento de varias etapas usando secuencias de AAV-2 derivadas del provirus de AAV-2, pSM620. Se digirió pSM620 con *SmaI* y *PvuII* y se clonaron los genes rep y cap de 4543 pb que codifican el fragmento *SmaI* en el sitio de *SmaI* de pUC119 para dar el plásmido de 7705 pb, pUCrepcap. Las secuencias ITR restantes que flanquean los genes rep y cap se eliminaron después por mutagénesis dirigida a oligonucleótidos usando los siguientes oligonucleótidos:

145A; 5'-GCT CGG TAC CCG GGC GGA GGG GTG GAG TCG-3' (SEC ID N°: 3)

145B; 5'-TAA TCA TTA ACT ACA GCC CGG GGA TCC TCT-3' (SEC ID N°: 4)

El plásmido resultante, pUCRepCapMutated (pUCRCM) (7559 pb) contiene el genoma entero de AAV-2 sin ninguna secuencia ITR (4389 pb). Los sitios de *SrfI*, en parte introducidos por los oligonucleótidos mutagénicos, flanquean los genes rep y cap en esta construcción. Las secuencias de AAV corresponden a posiciones de AAV-2 146-4,534.

Se introdujo un sitio de *Eco47III* en el extremo 3' del promotor P5 para facilitar la escisión de las secuencias del promotor P5. Para hacer esto, hubo que mutagenizar pUCRCM con cebador P547 (5'-GGT TTG AAC GAG CGC TCG CCA TGC-3') (SEC ID N°: 5). El plásmido resultante de 7559 pb se llamó pUCRCM47III.

El policonector pBSIIsk+ se cambió por escisión del original con *BSSHI* y se reemplazó con oligonucleótidos de extremos romos 1 y 2. El plásmido resultante, bluntscript, es de 2830 pb de longitud y el nuevo policonector codifica los sitios de restricción *EcoRV*, *HpaI*, *SrfI*, *PmeI* y *Eco47III*. Las secuencias 1 y 2 romas son las siguientes:

roma 1; 5'-CGC GCC GAT ATC GTT AAC GCC CGG GCG TTT AAA CAG CGC TGG-3' (SEC ID N°: 6)

roma 2; 5'-CGC GCC AGC GCT GTT TAA ACG CCC GGG CGT TAA CGA TAT CGG-3' (SEC ID N°: 7)

ES 2 326 893 T3

El pH1 se construyó uniendo los genes rep y cap, de 4398 pb que codifican el fragmento SmaI de pUCRCM dentro del sitio de SmaI de pBluntscript de manera que el sitio de HpaI estuviera cercano al gen rep. El pH1 tiene una longitud de 7228 pb.

5 El pH2 es idéntico a pH1 excepto en que el promotor P5 de pH1 está reemplazado por la región sin traducir 5' de pGN1909. Para hacer esto, se unió el fragmento AscI(romo)-SfiI de 329 pb que codifica la región sin traducir 5' de pW1909lacZ dentro del fragmento SmaI(parcial)-SfiI de 6831 pb de pH1 creando pH2. El pH2 tiene una longitud de 7156 pb.

10 Se agregó un promotor P5 al extremo 3' del pH2 por inserción del fragmento SmaI-Eco43III de 172 pb, que codifica el promotor P5 de pUCRCM47III dentro del sitio de Eco47III en pH2. Este fragmento se orientó de tal manera que la dirección de transcripción de los tres promotores de AAV es la misma. Esta construcción tiene una longitud de 7327 pb.

15 La caja TATA de 3'P5 (posiciones 255-261 de AAV-2, secuencia TATTTAA) se eliminó cambiando la secuencia por GGGGGGG usando el oligonucleótido mutagénico 5DIVE2 (5'-TGT GGT CAC GCT GGG GGG GGG GGC CCG AGT GAG CAC G-3') (SEC ID N°: 8). La construcción resultante, pH19, tiene una longitud de 7328 pb.

4. pladeno5:

20 El pladeno5 es un plásmido que provee una serie completa de funciones de ayuda al adenovirus para la producción del vector AAV cuando se transfecta en células 293. Esencialmente, está compuesto por las regiones de ARN E2A, E4 y VA del adenovirus-2 y un esqueleto de plásmido. El plásmido se construyó de la siguiente manera.

25 Se modificó pBSII_s/k+ para reemplazar la región de 637 pb que codifica el policonector y el módulo de complementación alfa con un sitio de EcoRV único usando mutagénesis dirigida de oligonucleótidos y el siguiente oligonucleótido: 5'-CCG CTA CAG GGC GCG ATA TCA GCT CAC TCA A-3' (SEC ID N°: 9). Posteriormente se clonó un policonector que codifica los sitios de restricción de BamHI, KpnI, SrfI, XbaI, ClaI, Bst1107I, SalI, PmeI y NdeI dentro del sitio de EcoRV (5'-GGA TCC GGT ACC GCC CGG GCT CTA GAA TCG ATG TAT ACG TCG ACG

30 TTT AAA CCA TAT G-3') (SEC ID N°: 10).

Se sometió el ADN de adenovirus-2 a digestión y se aislaron fragmentos de restricción que codifican la región E2A (un fragmento KpnI-SrfI de 5335 pb, correspondiente a las posiciones 22.233-27.568 del genoma del adenovirus-2) y el fragmento VA ARNs (un fragmento de EcoRV-SacII de 731 pb, correspondiente a las posiciones 10.426-11.157 del genoma del adenovirus-2). El fragmento E2A se instaló entre los sitios de SalI y KpnI del policonector. Se ensambló primeramente una región E4 en pBSII_s/k+ uniendo un fragmento BamHI-AvrII de 13.864 pb correspondiente a las

35 posiciones 21.606-35.470 del adenovirus-2 (que codifica el extremo 5' del gen) y un fragmento de PCR digerido, por AvrII y SrfI, de 462 pb correspondiente a las posiciones 35.371-35.833 del adenovirus-2 (que codifica el extremo 3' del gen) entre los sitios de BamHI y SmaI de pBSII_s/k+. Los oligonucleótidos usados para producir los fragmentos por PCR se diseñaron para introducir un sitio de SrfI en la unión donde se intersectan el promotor E4 y la repetición terminal del adenovirus y tiene las secuencias 5'-AGA GGC CCG GGC GTT TTA GGG CGG AGT AAC TTG C-3' (SEQ ID NO: 11) y 5'-ACA TAC CCG CAG GCG TAG AGA C-3' (SEC ID N°: 12). Se realizó la escisión del promotor E4 intacto por medio de clivaje con SrfI y SpeI y se clonó el fragmento de 3.189 pb correspondiente a las

40 posiciones 32.644-35.833 del adenovirus-2 en el intermediario E2A entre los sitios de SrfI y XbaI. Finalmente, se insertó el fragmento de ARN VA en el sitio de Bst1107 tras la modificación de extremo romo del sitio de SacII mediada por T4 polimerasa. Los genes en pladeno 5 están dispuestos de manera tal que los extremos 5' de los promotores E2A y E4 estén contiguos, provocando que las regiones se transcriban hacia fuera, en direcciones opuestas una respecto a la otra. Los genes VA ARN, que están ubicados en los tres extremos cebadores del gen E4, transcriben hacia el gen E4. El plásmido tiene una longitud de 11.619 pb.

50

Producción del vector AAV

Se cultivó la línea celular HEK293 (Graham, F. L., Smiley, J., Russel, W. C., y Naiva, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36: 59-72.) en DMEM completo

55 (BioWhittaker) conteniendo 4,5 g/l de glucosa, suero bovino de ternera fetal inactivado por calor al 10% (FCS) y glutamina 2 mM a 37°C en aire con CO₂ al 5%. Se sembraron cuarenta matraces T225 con 2,5×10⁶ células cada uno y se cultivaron durante tres días antes de la transfección hasta una confluencia del 70-80% (aproximadamente 1,5×10⁷ células por matraz).

60 Los procedimientos de transfección y purificación descritos por Matsushita y col. (Matsushita, T., Elliger, S., Elliger, C., Podsakoff, G., Villarreal, L., Kurtzman, G. J., Iwaki, Y., y Colosi, P. (1998) "Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without ayudante virus", *Gene Therapy* 5: 938-945) se emplearon para la producción del vector AAV con pequeñas modificaciones. El procedimiento de producción de vectores incluyó la cotransfección de células HEK 293 con 20 µg de cada uno de los siguientes tres plásmidos por matraz: el plásmido AAV-AADC, el

65 plásmido ayudante de AAV (pHLP19, conteniendo los genes rep y cap de AAV), y el plásmido ayudante de adenovirus (pladeno-5, anteriormente conocido como pVAE2AE4-2 (4) y compuesto de los genes E2A, E4, y VA ARN derivados de adenovirus-2 purificado), usando el procedimiento de fosfato de calcio (Wigler, M. y col. (1980) Transformation of mammalian cells with an amplifiable dominant-acting gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3567-3570) durante un

periodo de 6 horas. Tras la transfección, se reemplazaron los medios y se recolectaron las células 3 días después. Los sedimentos celulares fueron posteriormente sometidos a 3 ciclos de lisis por congelación-descongelación (alternando entre hielo de etanol seco y baños a 37°C agitando con vórtex intermitentemente). Se eliminaron los sedimentos celulares por centrifugación (10.000 g durante 15 minutos). Se centrifugó una segunda vez el sobrenadante para eliminar cualquier turbidez remanente y seguidamente se trató con Benzonase® (200 µ/ml) a 37°C durante 1 hora con el fin de reducir el DNA celular contaminante. Tras la incubación, se llevó el sobrenadante a 25 mM en CaCl₂ y se colocó en hielo durante una hora. Se retiró el precipitado resultante por centrifugación (10.000 g durante 15 minutos) y se desechó. El sobrenadante posteriormente se llevó al 10% en PEG(8000) y se colocó en hielo durante 3 horas. Se recolectó el precipitado por centrifugación (3.000 g durante 30 minutos) y se resuspendió en 4 ml de NaHEPES 50 mM, NaCl 0,15M, EDTA 25 mM (pH 8,0) por 20 matraces T225. Se agregó CsCl sólido para producir una densidad de 1,4 g/ml y se centrifugó la muestra a 150.000 g durante 24 h en un rotor Beckman TI70. Se combinaron las fracciones conteniendo AAV, se ajustaron a una densidad de CsCl a 1,4 g/ml y se centrifugaron a 350.000 g durante 16 h en un rotor Beckman NVT65. Las fracciones que contenían AAV después se concentraron y se sometieron a diafiltración contra tampón excipiente (sorbitol al 5% en PBS). Se determinó la valoración del vector AAV-AADC purificado usando análisis de transferencia puntual cuantitativo y se almacenaron patrones de vectores a -80°C.

Infusión Viral

Se creó un campo estéril en la sala de cirugía para preparar el sistema de infusión. Se purgaron con solución salina las cánulas de infusión para evaluar la integridad entre la aguja y la interfase de la tubuladura. Se conectaron las cánulas de infusión estériles y las líneas de carga usando los ajustes apropiados con extrema precaución tomado para evitar la incorporación de burbujas de aire en el sistema. Se prepararon las líneas de infusión de aceite no estériles como se describió previamente y se unieron jeringas Hamilton ajustadas para gas de 1 ml cargadas con aceite a una bomba de infusión Harvard. Se colocaron seis cánulas de infusión en los soportes de microdialisis (3 cánulas por soporte) y se montaron en una torre estereotáctica. Tras la unión de las líneas de carga y de aceite, se cebaron las cánulas de las agujas con AAV y se transfirió el sistema de infusión a la mesa de cirugía. Las velocidades de infusión iniciales se establecieron en 0,1 pl/min, se inspeccionaron visualmente las líneas para asegurar un flujo suave de fluido a través del sistema y se llevaron manualmente las cánulas al sitio blanco. Se llevó a cabo una inspección visual final para controlar la presencia de cualesquiera burbujas de aire en el sistema de infusión.

El sistema de cánula estaba constituido por tres componentes: (i) una cánula de infusión estéril; (ii) una línea de carga estéril que alberga AAV-AADC o AAV-LacZ (control); y (iii) una línea de infusión no estéril conteniendo aceite de oliva. La preparación de cada línea se describe aquí brevemente. La cánula de infusión estaba constituida por agujas 27 G (diámetro externo de 0,076 cm (0,03 pulgadas); diámetro interno de 0,152 cm (0,06 pulgadas); Terumo Corp. Elkton, MD) ajustadas con sílice condensada (diámetro externo de 0,041 cm (0,016 pulgadas); diámetro interno de 0,020 cm (0,008 pulgadas); Polymicro Technologies, Phoenix, AZ), y se colocaron en tubuladuras de Teflón (DI = 0,076 cm, Upchurch Scientific, Seattle, WA) de manera tal que la punta distal de silicona sobresaliera aproximadamente 15 mm por fuera de la tubuladura. Se aseguró la aguja dentro de la tubuladura usando superglue y se controló el sistema en busca de posibles fugas previamente a su utilización. En el extremo proximal de la tubuladura se unieron un conector Tefzel y una férula para conectar la línea de carga adyacente.

Las líneas de carga y de infusión estaban constituidas por secciones de tubuladura de Teflón de 50 cm (diámetro externo de 0,157 cm (0,062 pulgadas); diámetro interno de 0,076 cm (0,03 pulgadas)) unidas con férulas Tefzel 2,54/40,64 cm (1/16 pulgadas), uniones y adaptadores macho Luer-lock (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA) en los extremos distales. Las líneas de carga estériles se llevaron hasta un volumen de 1000 ml y se purgaron con solución salina antes de usarse.

Se sedaron inicialmente los animales con Ketamina (Ketaset; 10 mg/kg intramuscular), se intubaron y se prepararon para cirugía. Se estableció una vía venosa usando un catéter de calibre 22 ubicado en la vena cefálica o safena para administrar fluidos isotónicos a 5-10 ml/kg/h. Se administró Isoflurane (Aerrane, Omeda PPD Inc., Liberty, N.J.) al 1-3% hasta que el animal mantuvo un nivel estable de anestesia. Se colocó la cabeza en un marco estereotáctico compatible con MRI de acuerdo con los valores preestablecidos obtenidos durante una exploración de MRI de base. El animal se controló con instrumentos mediante electrodos para electrocardiograma subcutáneos, mediante una sonda rectal y se cubrió el cuerpo con sábanas con agua circulante para mantener una temperatura central de 36-38°C. Se controlaron el electrocardiograma y el ritmo cardíaco (usando Silogic ECG-60, Stewartstown, PA.) y la temperatura corporal durante el procedimiento. Se preparó la cabeza con Betadine y etanol al 70%, se creó un campo estéril y se realizó una incisión en la línea media a través de la piel, el músculo y la fascia usando electrocauterización (Surgistat Electrosurgery, Valleylab Inc., Boulder, CO).

La retracción suave de la fascia y del músculo permitió exposición del cráneo sobre los sitios de entrada corticales. Se llevó a cabo una craneotomía unilateral usando un torno dental Dremel para exponer un área de 3 cm x 2 cm de duramadre por encima de los sitios blanco. Se guiaron estereotácticamente múltiples cánulas de agujas unidas a un soporte hacia los sitios blanco estriales. Los parámetros quirúrgicos para infusión unilateral de AAV dentro del hemisferio ipsilateral para la infusión para ICA MPTP se resumen en la Tabla 2.

TABLA 2

Parámetros Quirúrgicos para Infusión de AAV

Sitios Blanco	Striatum (2 caudado, 4 putamen)
Hemisferio	Lado derecho (ipsilateral para infusión de ICA MPTP)
Volumen de Infusión	30 µl/sitio
Velocidad de Infusión	0,1 µl/min (60 min) 0,2 µl/min (60 min) 0,4 µl/min (30 min)
Virus	AAV-AADC; $2,1 \times 10^{12}$ partículas/ml; Lote N° 176,12; 200 µl/vial
Artículo Control	AAV-LacZ; $9,2 \times 10^{11}$ partículas/ml; Lote N° 176,126; 200 µl/vial

Aproximadamente quince minutos tras la infusión, se elevó el montaje de las cánulas a una velocidad de 1 mm/min, hasta que estuvieron fuera del córtex. Se enjuagó el córtex con solución salina, se recortaron los márgenes óseos con pinzas gubias y se cerró la herida en capas anatómicas. Se administraron analgésicos (Numorfan, 1 M) y antibióticos (Flocillin, 1 M) como parte del protocolo quirúrgico. Se controlaron los animales hasta recuperación total de la anestesia, se los colocó en sus jaulas y se observaron clínicamente (2/día) durante aproximadamente cinco días tras la cirugía. El tiempo total de la neurocirugía fue de 4,5 horas por animal.

Tras la administración intraestriatal de AAV, se evaluó a los animales controlando cualesquiera signos de comportamiento anormal. Los animales se observaron y puntuaron por los técnicos veterinarios dos veces al día usando formularios de observación clínica. Todos los monos se recuperaron de la cirugía dentro de 2 horas y fueron capaces de mantenerse e incluso alimentarse por sí mismos. No se observaron signos o efectos adversos durante las 8 semanas completas posteriores al periodo quirúrgico.

Generación de Imágenes con Resonancia Magnética

La visualización del sitio blanco es crucial para el posicionamiento preciso de células dentro del núcleo caudado o del putamen. Se usaron procedimientos estereotáticos combinados con MRI para ubicar la cánula con precisión dentro de las estructuras blanco deseadas. Se escanearon todos los animales antes de la cirugía para generar coordenadas estereotáticas precisas de los sitios de implante blanco para cada animal individual. Se colocaron los mismos marcadores fieles usados para el escaneo PET en el marco para registrar conjuntamente las imágenes de PET y de MRI. Brevemente, durante el procedimiento de escaneo, se sedaron los animales usando una mezcla de ketamina (Ketaset, 7 mg/kg, intramuscular) y xilacina (Rompun, 3 mg/kg, intramuscular). Se pusieron los animales en un marco estereotático compatible con MRI, se registraron las medidas de soportes de oreja y soportes de ojo y se estableció una línea IV. Se tomaron sesenta imágenes coronales (1 mm) y 15 imágenes sagitales (3 mm) usando una máquina GE Signa 1.5 Tesla. Las imágenes de resonancia magnética se ponderaron en T1 y se obtuvieron en tres planos usando una secuencia "spoiled grass" con un tiempo de repetición (TR) = 700 ms, un tiempo de eco (TE) = 20 ms y un ángulo de 30°. El campo de visión fue 15 cm, con una matriz 192 y NEX 2 (número de promedios por información de señal). El tiempo de escaneo basal fue de aproximadamente 20 minutos. Se determinó la distribución rostro-caudal y medio-lateral de una estructura blanco (por ej. el núcleo caudado) usando las imágenes coronales obtenidas por resonancia magnética. Las coordenadas quirúrgicas se determinaron a partir de las imágenes coronales ampliadas (1,5x) del núcleo caudado y del putamen.

Tomografía por Emisión de Positrones (PET)

Se realizaron 2 escaneos PET a todos los 4 animales, un escaneo basal tras el establecimiento de la lesión de MPTP y un segundo escaneo 7-8 semanas tras la infusión bien con AAV-AADC o bien con AAV-LacZ. Antes de PET, se obtuvieron imágenes de cada animal con resonancia magnética (RM) usando un imán 1,5 T y un marco estereotático que permitió el registro conjunto entre las series de datos de PET y RM a través de marcadores fieles externos. Los estudios PET se llevaron a cabo con un sistema PET-600, un tomógrafo de corte único con una resolución de 2,6 mm en plano y una resolución axial ajustable que se aumentó desde 6 mm hasta 3 mm para este estudio disminuyendo la abertura protectora. Las características de este tomógrafo se describieron anteriormente (Budinger y col. (1991) *Nucl. Med. Biol.* 23(6): 659-667; Valk, (1990) *Radiology* 176(3): 783-790). Se intubaron los monos y se anestesiaron

con isoflurano, se colocaron en el marco estereotáctico y se posicionaron en el escáner PET tal como para obtener una imagen de un corte del cerebro coronal pasando a través del striatum. Los monos se posicionaron de la misma manera para cada estudio usando las escalas anteroposteriores en el marco estereotáctico y una luz láser conectada al tomógrafo. Después de posicionarse en el escáner, se obtuvo una exploración de transmisión de 5 minutos para corregir la atenuación fotónica y para evaluar la posición del animal. Se inyectaron a los monos 10-15 mCi del marcador de AADC, 6-[¹⁸F]fluoro-L-m-tirosina (FMT) y se comenzó la generación de imágenes. La generación de imágenes continuó durante 60 minutos, tiempo al que se reposicionó el mono para obtener la imagen de un segundo corte 6 mm caudal con respecto al primero.

Las series de datos de PET y RM se registraron conjuntamente y se dibujaron las regiones de interés (ROs) para el striatum en el hemisferio contralateral (el lado opuesto a la infusión de ICA MPTP) en datos obtenidos por PET a 50 a 60 min (corte 1) y de 65 a 75 min (corte 2) con referencia a la RM. Se crearon imágenes especulares de las ROs en el hemisferio ipsilateral (lado de la infusión de MPTP) y se determinaron los conteos radiactivos (cm²/seg) para cada ROI. Se promediaron los conteos estriales para los dos cortes para cada estudio. Se calcularon las proporciones de asimetría por consumo de FMT para cada animal en cada tiempo restando los conteos para el striatum ipsilateral (lesionado) de los conteos para el striatum contralateral (no lesionado) y dividiendo por el promedio de conteos para los striata ipsilateral y contralateral. Con el fin de reducir la variación de la relación de asimetría entre animales, se calculó un valor de cambio restando la relación de asimetría del segundo estudio PET de la relación de asimetría del estudio de base para cada animal. Se usaron pruebas t para muestras no relacionadas para comparar el cambio en la relación de asimetría para los monos con AAV-AADC y AAV-LacZ.

Como se esperaba, todos los 4 monos mostraron mayor consumo de FMT en el striatum contralateral que en el ipsilateral en el estado basal, que mostró un consumo insignificante. Al tiempo del segundo estudio PET, los monos tratados con AAV-AADC mostraron consumo aumentado en el striatum ipsilateral, mientras que los tratados con AAV-LacZ no mostraron cambios con respecto al estado basal (Fig. 7). El cambio en la asimetría de consumo de FMT desde el estado basal hasta el segundo estudio PET fue significativamente mayor ($p < 0,01$) para los monos con AAV-AADC, que mostraron pequeña asimetría al tiempo del segundo estudio, que en los monos con AAV-LacZ, que mostraron un consumo de FMT contralateral mayor en ambos tiempos puntuales. (Fig. 8).

30 *Necropsia*

Se anestesió profundamente a los animales con pentobarbital sódico (25 mg/kg intravenosos) y se sacrificaron 8-9 semanas tras la administración de AAV y una semana tras las exploraciones PET post-quirúrgicas. En el día del sacrificio, se obtuvieron muestras de sangre y los animales se trataron con una preparación de L-dopa/carbidopa (Sinemet 250/25). Se recolectaron plasma y LCR cervical en el momento de la necropsia. Se extirparon los cerebros 30-45 minutos tras la administración de Sinemet, se colocaron en la matriz cerebral y se seccionaron de manera coronal en láminas de 3-6 mm. Se congeló una lámina del cerebro estriatal de 3 mm de espesor de cada mono inmediatamente en isopentano a -70°C y se almacenó congelada para análisis bioquímico. Las láminas restantes de 6 mm de espesor se fijaron en formalina durante 72 horas, se lavaron en PBS durante 12 horas y se ajustaron en gradiente de sacarosa ascendente (10-20-30%) y se congelaron.

Análisis Histológico

Las láminas de cerebro fijadas en formalina se cortaron en secciones coronales de 30 μ m de espesor en un crióstato. Se recogieron las secciones congeladas en series empezando a nivel del extremo rostral del núcleo caudado hasta el nivel de la sustancia nigra caudalmente. Se guardó cada sección y se mantuvo en solución anticongelante a 70°C. Las secciones en serie se tiñeron para observar inmunorreactividad de tirosina hidroxilasa (TH), dopa descarboxilasa (DDC) o B-galactosidasa (B-gal). Cada 12^a sección se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubó en H₂O₂ al 3% durante 20 minutos para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Tras lavar en PBS, se incubaron las secciones en solución bloqueante (suero normal de caballo al 10% para TH o suero normal de cabra al 10% para DDC y B-gal y Tritón-X 100 al 0,1% en PBS) durante 30 minutos, seguidos por incubación en solución de anticuerpo primario -TH (monoclonal de ratón, Chemicon, 1:1000), DDC (policlonal de conejo, Chemicon, 1:2000) o B-gal (policlonal de conejo, Cortex Blochem, 1:5000) durante 24 horas. Posteriormente se incubaron las secciones durante 1 hora en anticuerpo secundario IgG anti-ratón biotinilado para TH o en anticuerpo secundario IgG anti-conejo para DDC y B-gal (Vector Labs, 1:300). La unión a los anticuerpos se visualizó con peroxidasa del rábano picante estreptavidina (Vector Labs, 1:300) y cromógeno DAB con níquel (Vector Labs). Por último se colocaron cubreobjetos sobre las secciones y se examinaron con un microscopio óptico.

Tras obtener las muestras de tejido mediante punción se seccionaron los bloques congelados a 20 μ m. Se tiñeron las secciones con H&E y para DDC-IR.

Se determinaron los valores estimados cuantitativos para el número total de células infectadas con AAV dentro del núcleo caudado, el putamen y el globus pallidus usando un procedimiento disector óptico. El procedimiento disector óptico estaba constituido por un sistema de análisis de imágenes asistido por ordenador, incluyendo un microscopio Leitz Otholux 11 acoplado a una platina controlada por ordenador para x-y-z Prior H128, un sistema de cámara de vídeo de alta sensibilidad Sony 3CCD (Sony, Japón) y un ordenador Macintosh G-3. Todos los análisis se llevaron a cabo con un software NeuroZoom (La Jolla, CA). El instrumento se calibró previamente a cada serie de mediciones. Se marcó el contorno de la región de neuronas positivas en el caudado, el putamen y el globus pallidus a bajo aumento

(objetivo 2,5x). Debido a la presencia difusa de células infectadas con AAV dentro del striatum, se midió un 1% de la región contorneada con un diseño aleatorio sistemático de marcos de conteo de disector (1 505 11M2) usando un objetivo de inmersión 63x plan-neofluar con una apertura numérica 0,95. Tomando como base experimentos piloto se muestrearon al menos cuatro secciones separadas idénticamente. Usando el principio del disector, se muestrearon hasta 200 neuronas positivas para AADC por barrido óptico usando procedimientos de diseño uniformes, sistemáticos y aleatorios para todas las mediciones. Se midió el espesor promedio de las secciones a 23 micrómetros. Una vez estuvo enfocada la parte superior de la sección, se bajó el plano z a 1-2 gm. Se realizaron recuentos mientras que se enfocaba hacia abajo a través de tres disectores de 5 micrómetros de espesor. Se prestó atención para asegurar que el plano inferior prohibido nunca se incluyera en el análisis. Se calcularon los volúmenes de las estructuras de acuerdo con procedimientos estándar. Se calculó el número total de células positivas en las estructuras examinadas usando la fórmula $N = N_v \times V_s$, donde N_v es la densidad numérica y V_s es el volumen de la estructura.

La tinción TH-IR reveló fuerte reducción de las fibras nigroestriatales y cuerpos celulares en la sustancia nigra en el lado ipsilateral en todos los monos. El lado contralateral mostró reducciones variables de TH y AADC-IR en el striatum y la sustancia nigra.

Solo en los monos tratados con AAV-LacZ DDC-IR y TH-IR fueron análogas. Los monos tratados con AAV-AADC mostraron tinte intenso AADC en el lado ipsilateral que excedió el tinte visto en el lado contralateral. Se vio una alta densidad de células AADC-IR en el 80% del striatum y en el 100% del globus pallidus en uno de los animales tratados con AAV-AADC. El análisis estereológico reveló 18.384 células por mm^3 en el putamen, 15.126 células por mm^3 en el caudado y 9.511 células por mm^3 en el globus pallidus. El número total de células infectadas con AAV se estimó que era al menos 16×10^6 células. En el otro mono tratado con AAV-AADC, las células AADC-IR se encontraron en más del 60% del striatum ipsilateral, con 7.515 células por mm^3 en el caudado, 15.352 células por mm^3 en el putamen y 3.850 células por mm^3 en el globus pallidus. No se encontraron células AADC en el striatum contralateral. Los monos tratados con AAV/LacZ no mostraron AADC-IR en el striatum ipsilateral ni en el contralateral.

Las células infectadas con AAV parecían mostrar morfología neuronal. El diámetro promedio de las células infectadas fue de $9 \pm 2,3 \mu\text{m}$ en el putamen y $14,6 \pm 9 \mu\text{m}$. Muchas células LacZ y AADC mostraron típica morfología neuronal espinosa media. Las células infectadas con AAV fueron positivas para el marcador neuronal, Neu-N. En los monos tratados con AAV-AADC, una de 4-6 células positivas para Neu-N fue positiva para AADC en el caudado y putamen, y una de 3-4 células positivas para Neu-N fue positiva para AADC en el globus pallidus. Ninguna de las células infectadas con AAV en los monos tratados con LacZ o AADC fue positiva para GFAP.

Las áreas adyacentes al conducto de la cánula se tiñeron con Nissl y H&E. No se observaron signos de citotoxicidad. No se observaron manguitos perivasculares, independientemente de la distancia desde la cánula. No hubo signos de reducción de células neuronales cerca del sitio de infusión comparado con el lado contralateral usando inmunotinción Neu-N. La inmunotinción GFAP no detectó reacción glial anormal dentro del striatum tratado con AAV.

Análisis Bioquímico

Se extrajeron regiones del cerebro de los bloques frescos congelados usando una microperforadora para evaluar los niveles tisulares de L-dopa y los metabolitos de dopamina, la actividad de AADC y la presencia de vector AAV. Las regiones del cerebro incluyeron striatum y córtex.

Se recogieron las muestras congeladas obtenidas con la microperforadora y se homogeneizaron por ultrasonido en 300 μl de ácido perclórico 0,1 M (Fisher Scientific) conteniendo etanol al 1% y EDTA al 0,02% (Fisher Scientific). Se extrajeron cincuenta μl del homogenado para análisis de proteínas (Kit de Ensayo de Proteínas de BCA de Pierce n° 23225), y se centrifugó el resto en una microcentrífuga durante 1,5 min. a velocidad máxima. Se usaron de 30 a 50 μl del homogenado para análisis de catecolaminas por HPLC usando una columna de par iónico Ultrasphere C-18, 5 μm , 4,6 x 250 mm (Beckman 235329); un procesador automático de muestras Waters 717plus a 4°C, bomba Waters 510 a 0,9 ml/min y un detector electroquímico amperométrico (Decade) a Eox. 0,82 V. La columna y la célula detectora se pusieron a 31°C. La fase móvil contenía 2 l de agua de grado HPLC, 2,2 g de ácido 1-heptanosulfónico, sal de sodio (Fisher Scientific), 0,17 g EDTA, 12 ml de trietilamina (Fisher Scientific), se ajustó el pH hasta 2,5 con = 8 ml de ácido fosfórico al 85% (Fisher Scientific) y 60 ml de acetonitrilo (J. T. Baker). Se registró la salida del detector y se analizó con el Waters Millennium 32 Chromatography Manager.

Análisis de AADC

Se determinó la actividad de AADC con una adaptación del procedimiento de Nagatsu y col. (1979) *Anal. Biochem.* 100: 160-165. Brevemente, se homogeneizó tejido (10 mg/ml) en tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) conteniendo fosfato de piraxilo 0.04 mM (un cofactor de AADC) y pargilina 0.2 mM. Las muestras se incubaron previamente a 37° C durante 5 minutos y se inició la reacción agregando L-dopa (concentración final: 100 μM). Las incubaciones se llevaron a cabo durante 20 minutos y se detuvo la reacción agregando 0,02 ml de ácido perclórico concentrado. Después de la centrifugación, se determinó la concentración de dopamina del sobrenadante usando HPLC con detección electroquímica. (ver, por ej., Boomsa y col. (1988) *Clin. Chem. Acta* 178-59-69). Se determinó la concentración de proteínas en el sedimento tisular usando Kit de Ensayo de Proteínas BCA (Pierce n° 23225). Los resultados se ex-

presan en nM/h/mg de proteína. Las punciones tisulares congeladas fueron procesadas de acuerdo con los protocolos estándar.

Las regiones corticales de todos los monos mostraron niveles variables de L-dopa, sin embargo, fueron consistentes dentro de cada mono. Como se esperaba, no hubo decarboxilación de L-dopa a dopamina dentro del córtex, sin embargo, en el striatum, en el lado contralateral a la administración de MPTP, L-dopa se convirtió a dopamina y se metabolizó adicionalmente a HVA. En el striatum tratado con MPTP de los monos tratados con AAV-Lac-Z, L-dopa no se convirtió a dopamina, ni se metabolizó a HVA. Los niveles tisulares de L-dopa también se mantuvieron en los mismos niveles que en el córtex en los monos tratados con AAV-Lac-Z. En el striatum tratado con MPTP de los monos tratados con AAV-AADC, L-dopa se convirtió en dopamina y HVA y los niveles tisulares de L-dopa en esta región disminuyeron.

La actividad de AADC fue muy baja en las regiones corticales y en el striatum tratado con MPTP de monos tratados con AAV-LacZ. L-dopa se convirtió en dopamina en el striatum contralateral, sugiriendo niveles altos de actividad de AADC. Las muestras tisulares de striatum tratado con MPTP de monos infectados con AAV-AADC tuvieron niveles extremadamente altos de dopamina con trazas de L-dopa restante.

Estos resultados demuestran que la combinación de vector AAV-AADC infundido y L-dopa sistémica es una terapia promisorio para el tratamiento de PD.

Por ello, la invención provee un medio para el tratamiento nuevo y eficaz de afecciones del SNC, tales como la Enfermedad de Parkinson.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende viriones de virus adenoasociados recombinantes, dichos viriones de virus adenoasociados recombinantes codifican un polipéptido terapéutico, en la fabricación de un medicamento,

para tratar una enfermedad del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto que sufre de un trastorno del SNC,

en el que dichos viriones de virus adenoasociados recombinantes se administran mediante administración potenciada por convección dentro del SNC usando una bomba de infusión o una bomba osmótica,

y en el que dicha composición se administra al cerebro del sujeto, de forma que se logra la distribución de dichos viriones de virus adenoasociados recombinantes sobre un área grande.

2. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha administración potenciada por convección se realiza usando una bomba de infusión.

3. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha administración potenciada por convección se realiza usando una bomba osmótica.

4. El uso de la reivindicación 1, en el que dichos viriones de virus adenoasociados recombinantes se administran al striatum.

5. El uso de la reivindicación 1, en el que la secuencia de ácido nucleico codifica aminoácido-aromático decarboxilasa (AADC).

6. El uso de la reivindicación 1 en el que el sujeto es un ser humano.

7. El uso de la reivindicación 1 en el que los viriones rAAV se administran en el striatum y en el que la secuencia de ácido nucleico codifica AADC.

8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende además administrar al sujeto al menos un compuesto terapéutico adicional.

9. El uso de la reivindicación 8 en el que al menos un compuesto terapéutico adicional es L-dopa.

10. El uso de la reivindicación 9, que comprende además administrar L-dopa y, opcionalmente, carbidopa al sujeto.

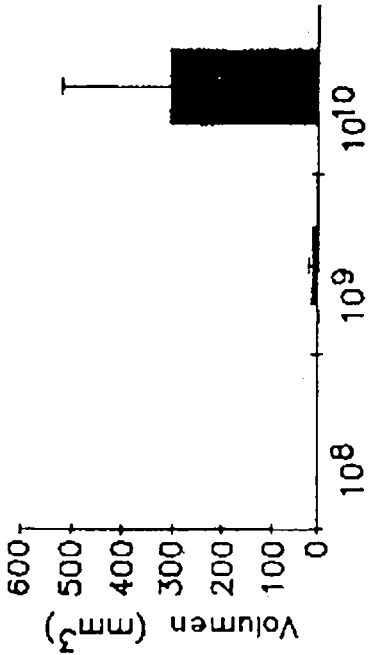


FIG. 1A

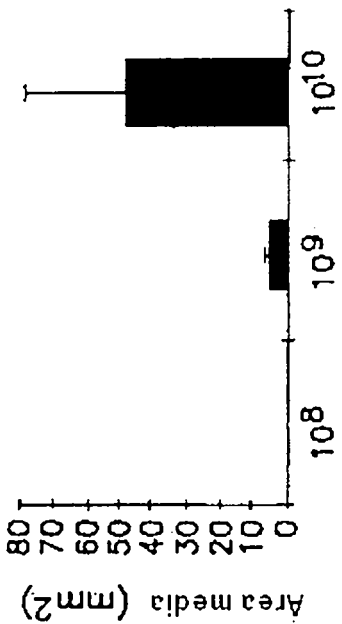


FIG. 1B



FIG. 1C

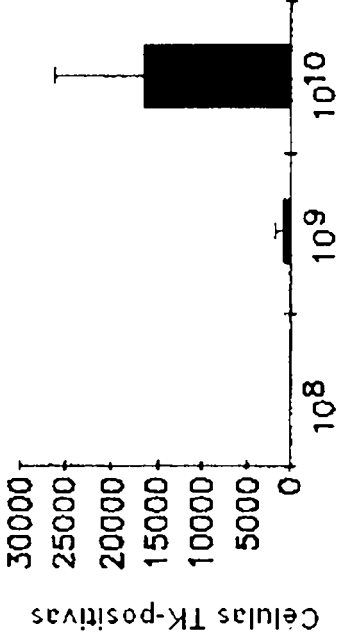


FIG. 1D

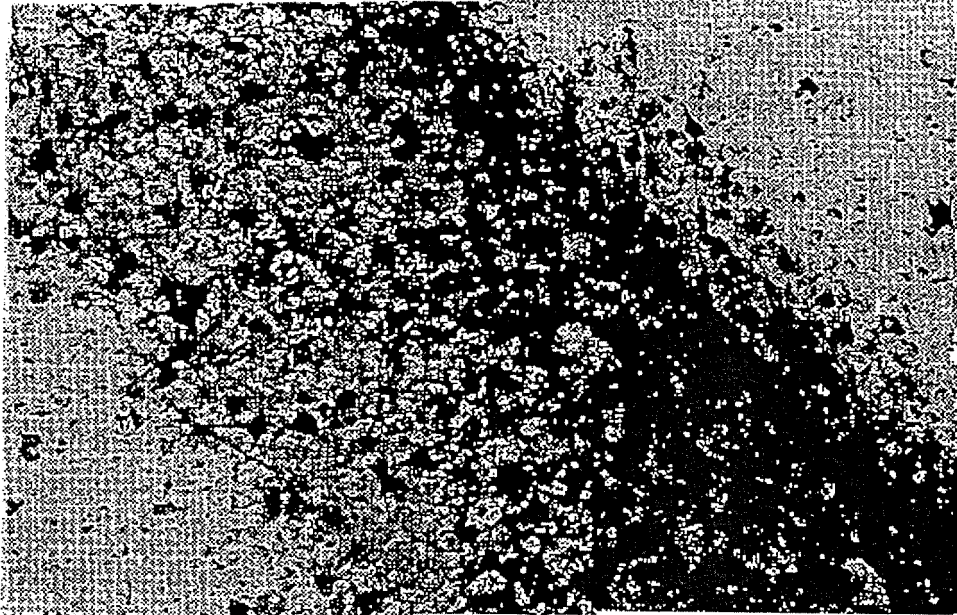


FIG. 2



FIG. 3B

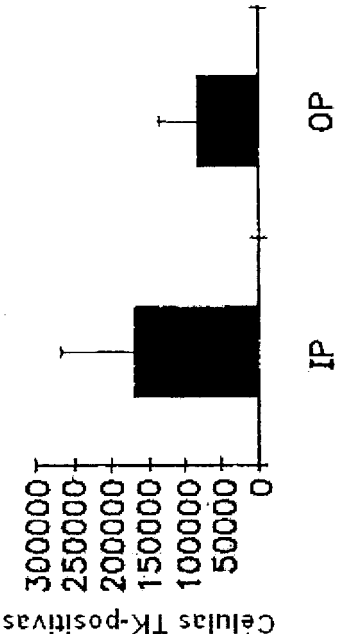


FIG. 3D

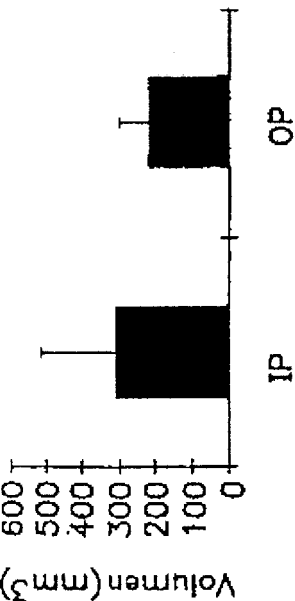


FIG. 3A

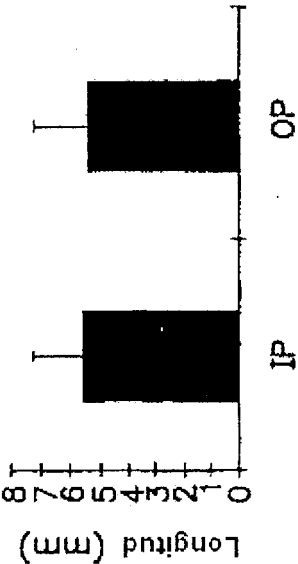


FIG. 3C

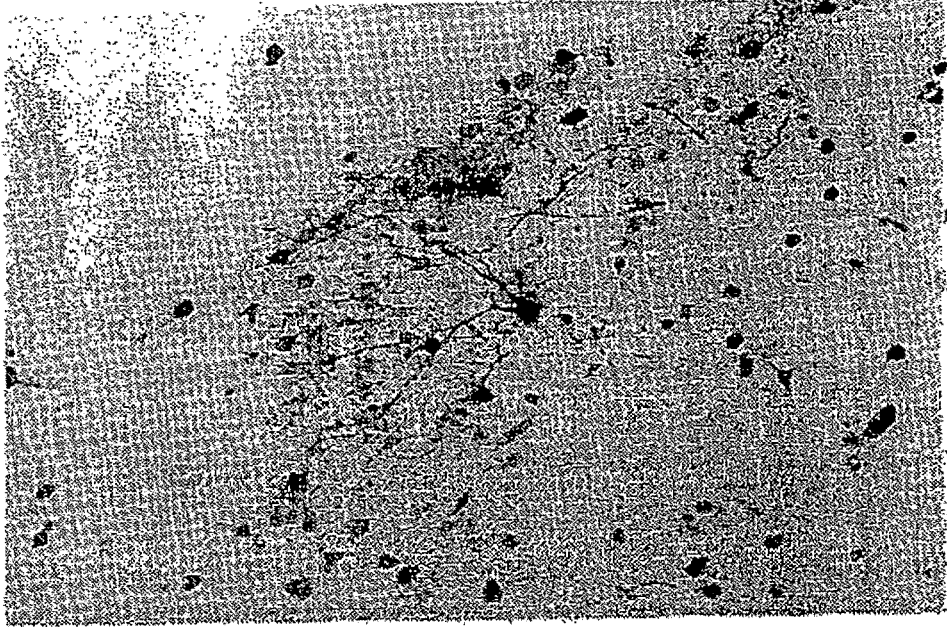


FIG. 4A

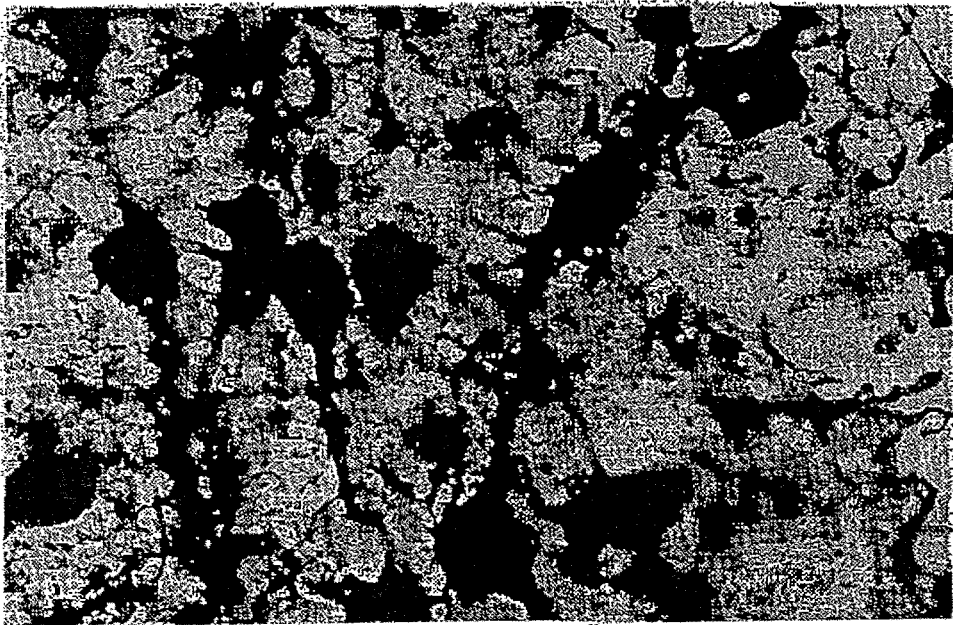


FIG. 4B

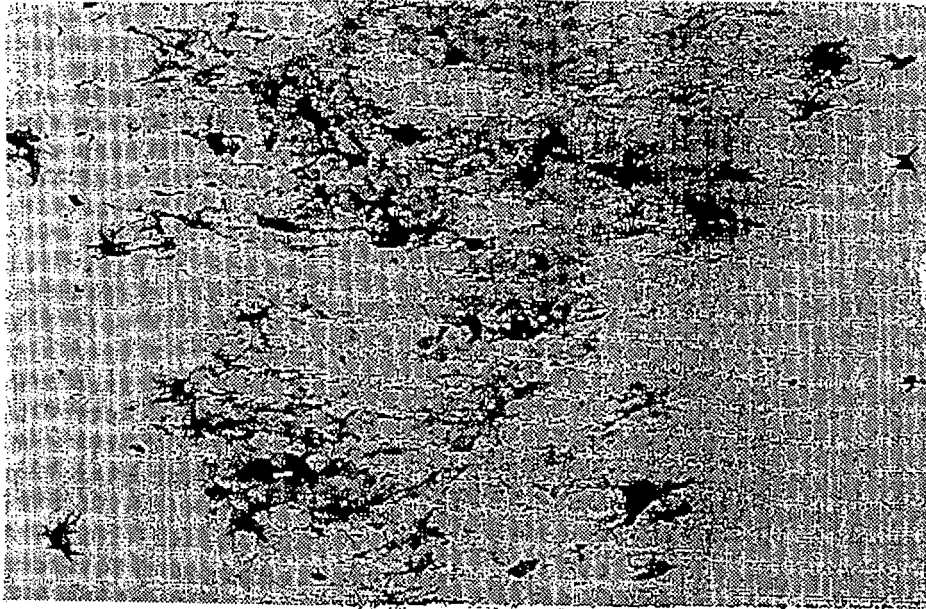


FIG. 4C

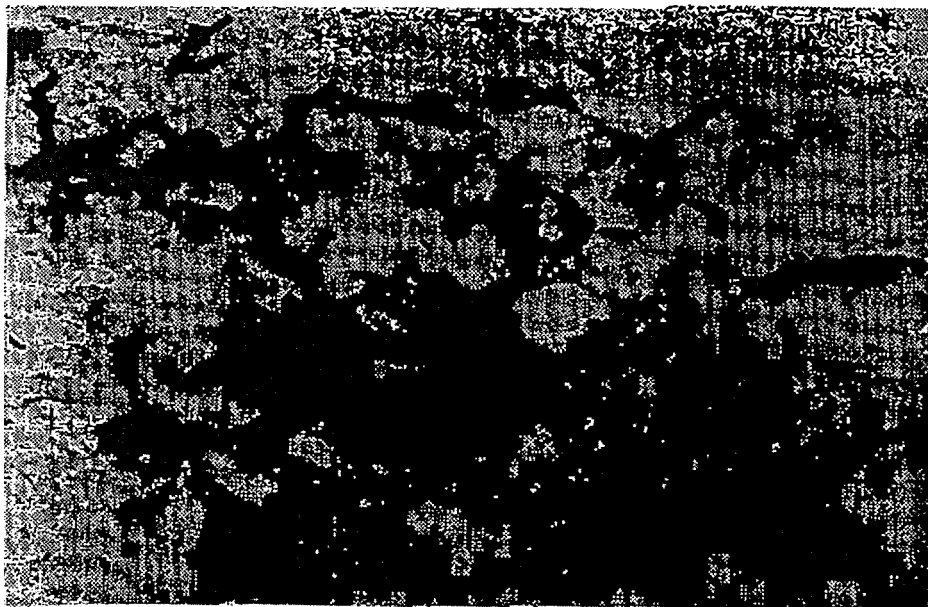


FIG. 4D

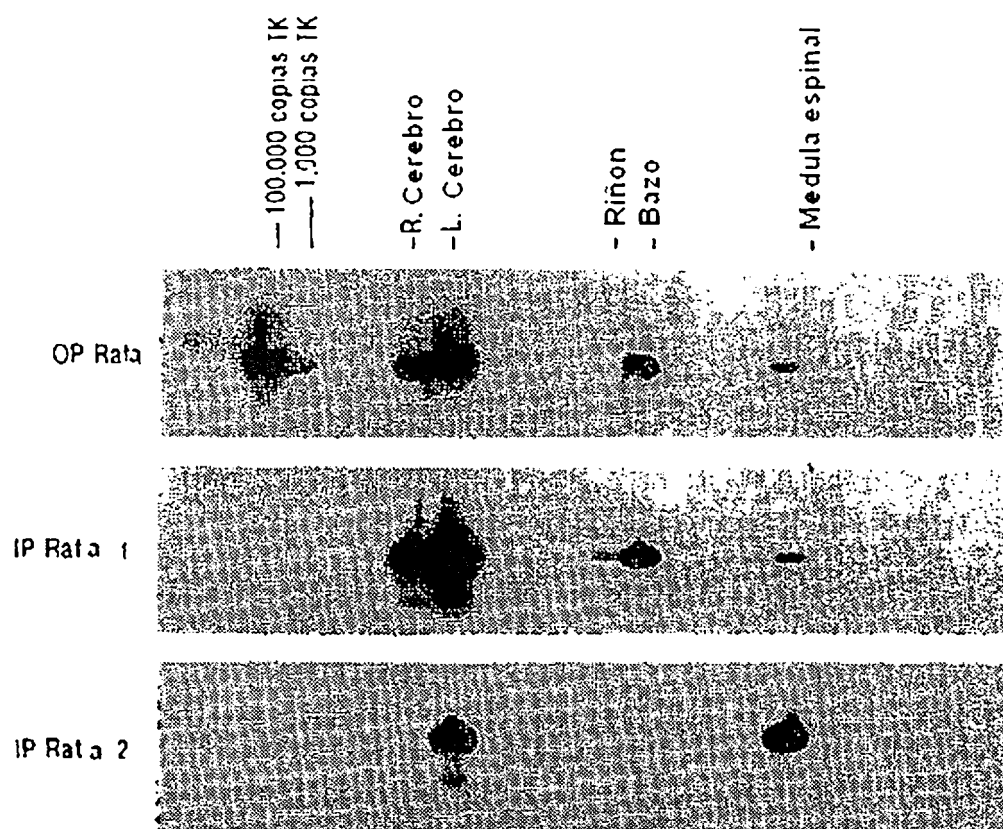


FIG. 5

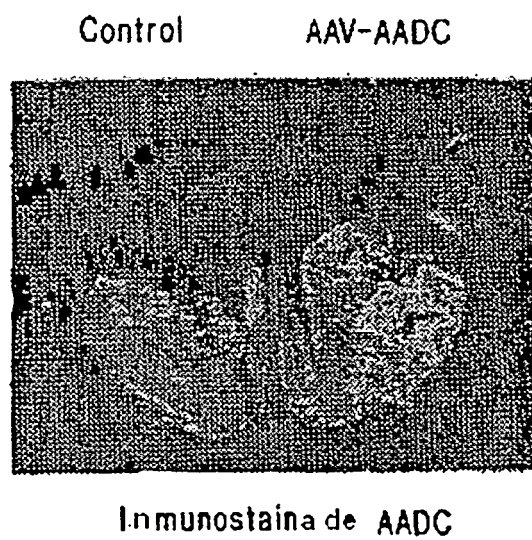


FIG. 6

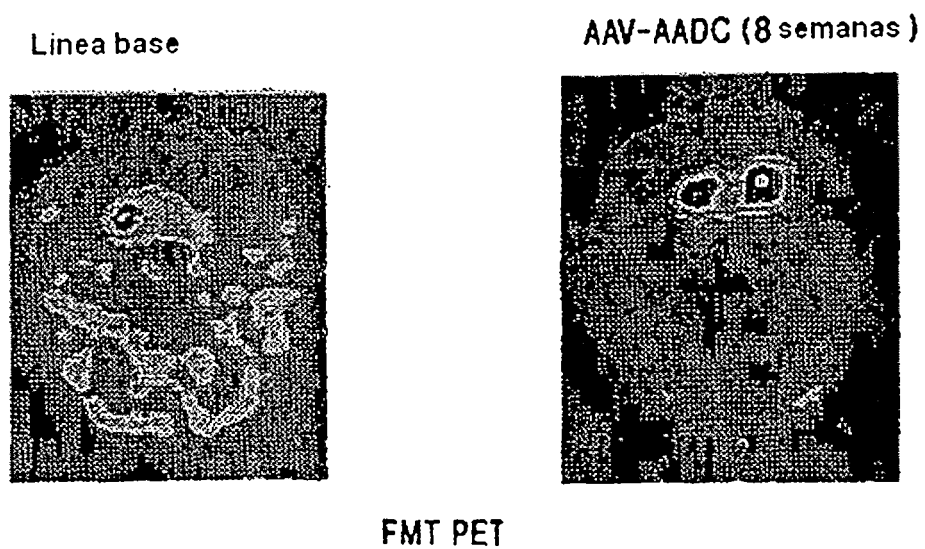


FIG. 7

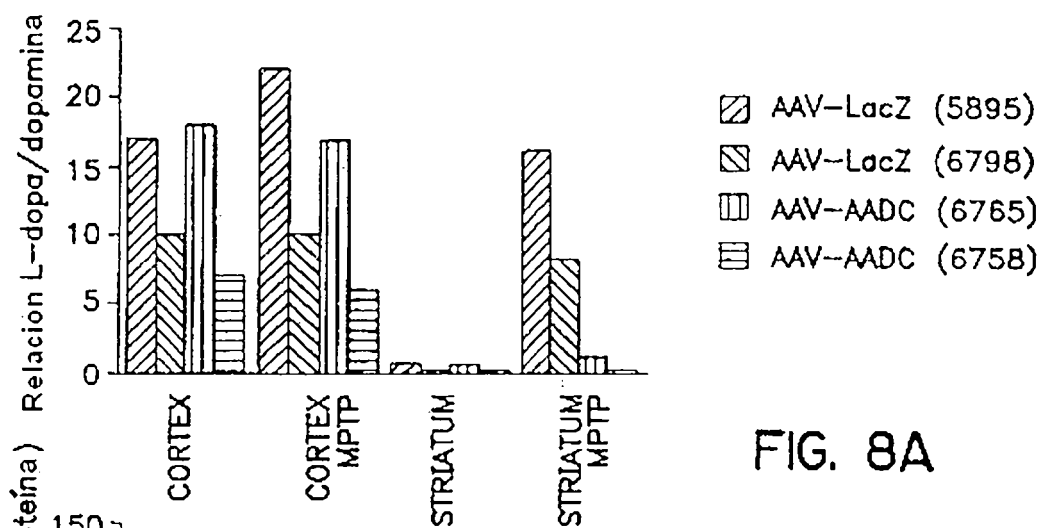


FIG. 8A

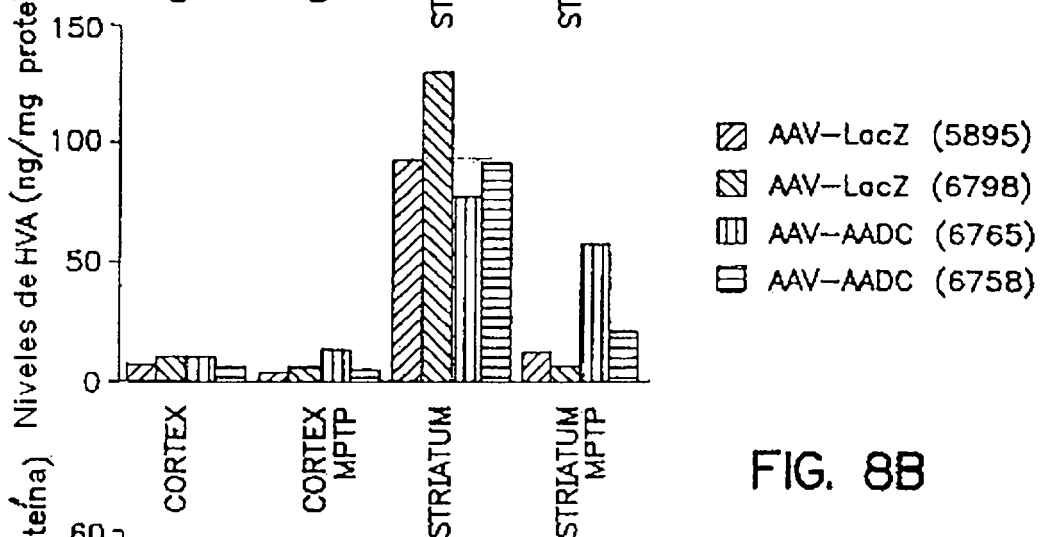


FIG. 8B

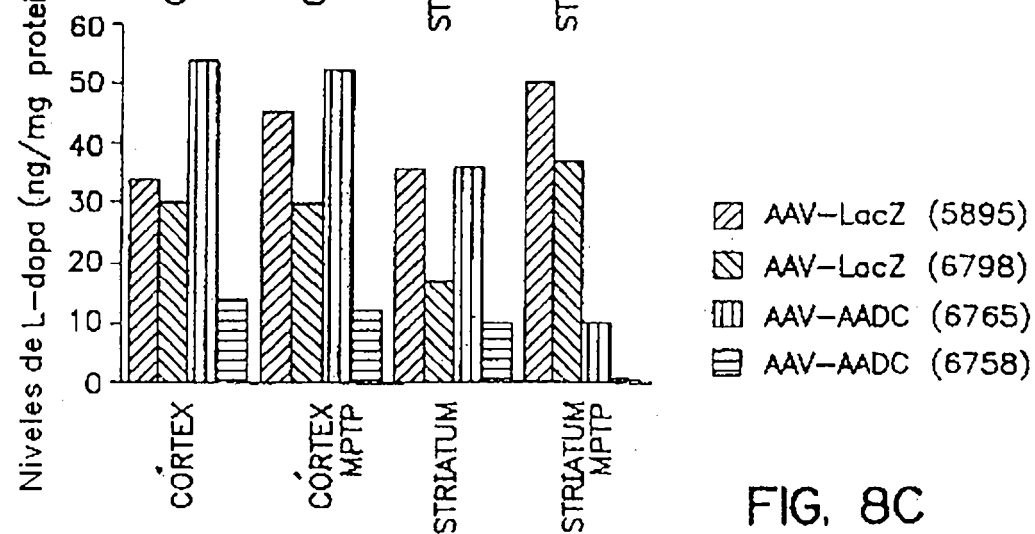


FIG. 8C

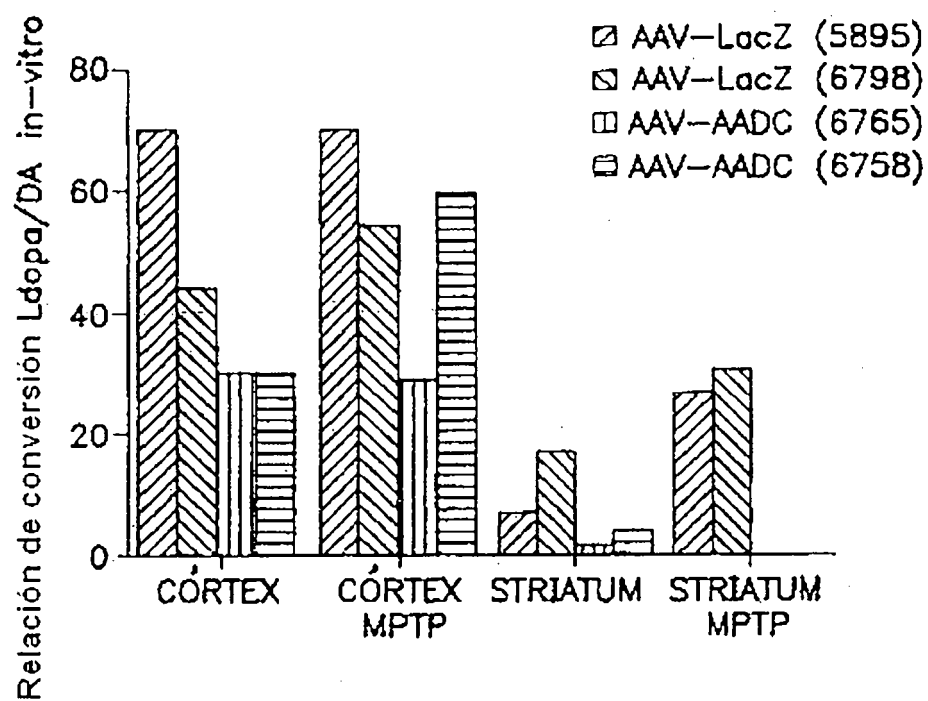


FIG. 9

ES 2 326 893 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Avigen, Inc.

5 <120> ADMINISTRACIÓN POTENCIADA POR CONVECCIÓN DE VECTORES AAV

<130> 0800-0014.40

10 <140> PCT/US99/11687

<141> 26-05-1999

15 <150> US 60/134.748

<151> 18-05-1999

<150> US 60/086.949

20 <151> 27-05-1998

<160> 12

25 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 31

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador AAV-tk

<400> 1

aagtcacgcg ctcgggtacg tagacgatat c 31

40 <210> 2

<211> 30

<212> ADN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador AAV-tk

50 <400> 2

atagcagcta caatccagct accattctgc 30

55 <210> 3

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: 145A

65 <400> 3

gctcgggtacc cgggaggagg ggtggagtcg 30

ES 2 326 893 T3

<210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: 145B
 10
 <400> 4
 taatcattaa ctacagcccg gggatcctct 30

 15 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: P547

 25 <400> 5
 ggtttgaacg agcgctcgcc atgc 24

 30 <210> 6
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: blunt1

 40 <400> 6
 cggcgccgata tcgttaacgc ccgggcggtt aaacagcgct gg 42

 <210> 7
 45 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: blunt2

 <400> 7
 55 <400> 7
 cgcgccagcg ctgtttaaac gcccgggcgt taacgatatc gg 42

 <210> 8
 60 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: 5DIVE2

ES 2 326 893 T3

	<400> 8	
	tggtggtcacg ctggggggggg gggcccgagt gagcacg	37
5	<210> 9	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sitio de EcoRV	
15	<400> 9	
	ccgctacagg gcgcgatatc agctcactca a	31
	<210> 10	
20	<211> 57	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: policonector	
	<400> 10	
30	ggatccggta ccgcccgggc tctagaatcg atgtatacgt cgacgtttaa accatat	57
	<210> 11	
35	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: E4(1)	
	<400> 11	
45	agaggcccgg gcgttttagg gcggagtaac ttgc	34
	<210> 12	
	<211> 22	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: E4(2)	
	<400> 12	
60	acatacccgc aggcgtagag ac	22
65		