



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0711965-8 A2**



* B R P I O 7 1 1 9 6 5 A 2 *

(22) Data de Depósito: 07/06/2007
(43) Data da Publicação: 24/01/2012
(RPI 2142)

(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/00
A01K 67/027

(54) Título: TERAPIA DE GENE PARA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA E OUTRAS ENFERMIDADES DA MEDULA ESPINAL

(30) Prioridade Unionista: 07/06/2006 US 60/811,419

(73) Titular(es): Genzyme Corporation

(72) Inventor(es): Catherine R. O'Riordan, James Dodge, Lamy Shihabuddin

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007013391 de 07/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/146046 de 21/12/2007

(57) Resumo: TERAPIA DE GENE PARA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA E OUTRAS ENFERMIDADES DA MEDULA ESPINAL. A presente invenção refere-se à descrição que proporciona métodos e composições para tratamento de enfermidades ou danos que afetam a função e controle motor em um indivíduo. Em um aspecto, a invenção se refere a um produto transgene que é distribuído a uma medula espinal do indivíduo por administração de um vetor viral neurotrófico recombinante contendo o transgene ao cérebro. O vetor viral distribui o transgene para uma região do cérebro que é susceptível a infecção pelo vírus, e que expressa o produto de gene viral recombinante codificado. Também providos são composições para distribuição de um produto de transgene a uma medula espinal do indivíduo pela administração de um vetor viral neurotrófico recombinante contendo o transgene ao cérebro do indivíduo.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "TERAPIA DE GENE PARA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA E OUTRAS ENFERMIDADES DA MEDULA ESPINHAL".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção se refere a composições e métodos para tratamento de enfermidades que afetam a função motora do indivíduo, e, em particular, a função motora afetada por doença ou dano ao cérebro e/ou medula espinhal.

10 A terapia de gene é uma modalidade de tratamento emergente para enfermidades que afetam o sistema nervoso central (SNC). A terapia de gene do SNC tem sido facilitada pelo desenvolvimento de vetores virais capazes de infectar efetivamente neurônios pós-mitóticos. O sistema nervoso central é composto da medula espinhal e cérebro. A medula espinhal conduz informação sensorial a partir do sistema nervoso periférico para o
15 cérebro, e conduz informação motora a partir do cérebro a vários executores. Para uma revisão de vetores virais para distribuição de gene para o sistema nervoso central, ver Davidson et al. (2003) Nature Rev. 4:353-364.

Vetores de vírus adeno-associados (AAV) são considerados úteis para terapia de gene do SNC porque eles têm uma toxicidade favorável
20 e perfil de imunogenicidade, são capazes de transduzirem células neuronais, e são capazes de mediar expressão de longo prazo no SNC. (Kaplitt et al. (1994) Nat. Genet. 8:148-154; Bartlett et al. (1998) Hum. Gene Ther. 9:1181-1186, e Passini et al. (2002) J. Neurosci. 22:6437-6446).

Uma propriedade útil de vetores AAV está na capacidade de alguns
25 vetores AAV suportarem transporte retrógrado e/ou de grau anterior em células neuronais. Os neurônios em uma região cerebral estão interligados por axônios às regiões de cérebro distais proporcionando, desse modo, um sistema de transporte para distribuição de vetor. Por exemplo, um vetor AAV pode ser administrado em ou perto dos terminais de axônio de neurônios. Os
30 neurônios internalizam o vetor AAV e o transporta em uma maneira retrógrada ao longo do axônio para o corpo de célula. Propriedades similares de adenovírus, HSV, e vírus pseudo-rabies, foram mostradas para distribuir ge-

nes para estruturas distais dentro do cérebro (Soudas et al. (2001) *FASEB J.* **15**:2283-2285; Breakfield et al. (1991) *New Biol.* **3**:203-218; e de Falco et al. (2001) *Science*, **291**:2608-2613).

Vários grupos têm reportado que a transdução do cérebro por sorotipo 2 de AAV (AAV2) é limitada ao local de injeção intracranial (Kaplitt et al. (1994) *Nat. Genet.* **8**:148-154; Passini et al. (2002) *J. Neurosci.* **22**:6347-6446; e Chamberlin et al. (1998) *Brain Res.* **793**:169-175). Relatórios recentes sugerem que transporte axonal retrógrado de vetores virais neurotróficos pode também ocorrer em circuitos selecionados do relatório de cérebro de rato normal (Kaspar et al. (2002) *Mol. Ther.* **5**:50-56 (vetor AAV); Kasper et al. (2003) *Science* **301**:839-842 (vetor lentiviral) *Nat. Med.* **11(4)**:423-428 e Ralph et al. (2005) *Nat. Med.* **11(4)**:429-433 que injeção intramuscular de lentivírus expressando silenciar supróxido dismutase Cu/Zn humana (SOD1) interferindo no começo de doença retardada de RNA de esclerose lateral amiotrófica (ALS) em um modelo de roedor terapeuticamente relevante de ALS.

Células transduzidas por vetores AAV podem expressar um produto transgene terapêutico, tal como uma enzima ou um fator neurotrófico, para mediar efeitos intracelularmente benéficos. Estas células podem também secretar o produto transgene terapêutico, que pode ser subsequentemente retirado pelas células distais onde podem mediar seus efeitos benéficos. Este processo tem sido descrito como correção cruzada (Neufeld et al. (1970) *Science* **169**:141-146).

Contudo, existe uma necessidade de composições e métodos para tratar disfunção da medula espinhal que resulta em perda de função motora em pacientes humanos. Esta invenção satisfaz esta necessidade e proporciona vantagem relacionada também.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção proporciona métodos e composições para distribuir um transgene à medula espinhal e/ou a haste do cérebro de um indivíduo por administração intraventricular de um vetor viral neurotrófico recombinante contendo um transgene IGF-1. A distribuição viral pode ser sob con-

dições que favorecem expressão do transgene em células ependimais.

Esta invenção proporciona métodos e composições para distribuir um transgene à medula espinhal e/ou a haste do cérebro de um indivíduo por administração intraventricular de um vetor viral neurotrófico recombinante compreendendo um transgene selecionado a partir do grupo consistindo em fator-1 de crescimento de insulina (IGF-1), calbindin D28K, parvalbumin, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2, CNTF (Fator neurotrófico ciliar), ouriço sônico (shh), eritropoietin (EPO), lisil oxidase (LOX), progranulin, prolactin, ghrelin, neuroserpin, angiogenin, e placenta lactogen. A distribuição viral pode ser sob condições que favorecem expressão do transgene em células ependimais.

Esta invenção proporciona métodos e composições para distribuir um transgene à medula espinhal e/ou a haste do cérebro de um indivíduo por administração intraventricular (conhecida também como intracerebroventricular ou ICV) de um vetor viral neurotrófico recombinante compreendendo pelo menos dois transgenes selecionados a partir do grupo consistindo em fator-1 de crescimento de insulina (IGF-1), calbindin D28K, parvalbumin, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2, CNTF (Fator neurotrófico ciliar), ouriço sônico (shh), eritropoietin (EPO), lisil oxidase (LOX), progranulin, prolactin, ghrelin, neuroserpin, angiogenin, e placenta lactogen. Em uma concretização, um vetor viral adeno-associado recombinante compreende IGF-1 e VEGF. A distribuição viral pode ser sob condições que favorecem expressão do transgene em células ependimais. As Tabelas 1-3 proporcionam combinações potenciais de pares de transgenes úteis na presente invenção.

Em um aspecto adicional, a invenção proporciona composições e métodos para melhorar os sintomas de uma enfermidade de neurônio motor em um indivíduo pela administração de um vetor viral neurotrófico recombinante contendo o transgene terapêutico ao cérebro do indivíduo, e sob condições que favorecem expressão do transgene em uma quantidade terapêuticamente efetiva.

É para ser compreendido que ambas a descrição geral prece-

dente e a descrição detalhada seguinte são exemplares e explanatórias somente, e não são restritivas da invenção conforme reivindicada.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

5 A **Figura 1** mostra curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier comparando administração intraventricular de beta-galactosidase que codifica AAV4 a IGF1 que codifica AAV4. Uma diferença significativa na sobrevivência foi observada. Os recipientes eram camundongos SOD.

10 A **Figura 2** mostra uma comparação de resistência de membro anterior entre camundongos SOD que receberam administração intraventricular de beta-galactosidase (Lac Z) que codifica AAV4 versus IGF1 que codifica AAV4. Os recipientes de IGF1 perdem resistência mais gradualmente e mais vagarosamente.

15 A **Figura 3** mostra uma comparação de resistência de membro posterior entre camundongos SOD que receberam administração intraventricular de beta-galactosidase (Lac Z) que codifica AAV4 versus IGF1 que codifica AAV4. Os recipientes de IGF1 perdem resistência mais gradualmente e mais tarde.

20 A **Figura 4** mostra uma comparação de rotarod (latência em queda) entre camundongos SOD que receberam administração intraventricular de beta-galactosidase (Lac Z) que codifica AAV4 versus IGF1 que codifica AAV4. Os recipientes de IGF1 declinam mais gradualmente e mais tarde.

25 A **Figura 5** mostra uma comparação de perda de massa corpórea entre camundongos SOD que receberam administração intraventricular de beta-galactosidase (Lac Z) que codifica AAV4 versus IGF1 que codifica AAV4. Os recipientes de IGF1 perdem massa corpórea mais gradualmente e mais tarde.

30 A **Figura 6** mostra uma comparação de manchamento de GFAP na haste do cérebro de camundongos SOD que receberam administração intraventricular de beta-galactosidase (Bgal) que codifica AAV4 versus IGF1 que codifica AAV4. Conforme evidenciado pelo manchamento de GFAP reduzido nos camundongos tratados com AAV4-IGF1, distribuição intraventricular de AAV4-IGF-1 conduz a uma redução na astrogliose dentro da haste

do cérebro.

A **Figura 7** mostra uma comparação de manchamento de GFAP na medula espinhal ventral de camundongos SOD que receberam administração intraventricular de beta-galactosidase (Bgal) que codifica AAV4 versus IGF1 que codifica AAV4. Conforme evidenciado pelo manchamento de GFAP reduzido nos camundongos tratados com AAV4-IGF1, distribuição intraventricular de AAV4-IGF-1 conduz a uma redução na astrogliose na medula espinhal ventral.

A **Figura 8** mostra uma comparação de níveis de nitrotirosina em camundongos SOD que receberam administração intraventricular de beta-galactosidase (Bgal) que codifica AAV4 versus IGF1 que codifica AAV4. Conforme evidenciado pelo manchamento reduzido nos camundongos tratados com AAV4-IGF1, distribuição intraventricular de AAV4-IGF-1 conduz a uma redução nos níveis de nitrotirosina através de toda medula espinhal, por exemplo, regiões cervical, torácica, lombar e sacral.

A **Figura 9** mostra expressão de proteína fluorescente verde (GFP) em camundongos tratados com AAV4-GFP. GFP é distribuído na camada celular endotelial do sistema ventricular em seguida a distribuição intraventricular de AAV4-GFP.

A **Figura 10** mostra expressão de proteína fluorescente verde (GFP) em camundongos tratados com AAV4-GFP. GFP é distribuído na camada celular endotelial do canal central da medula espinhal em seguida a distribuição intraventricular de AAV4-GFP.

A **Figura 11A** mostra os resultados de RT-PCR realizado em tecidos de camundongos SOD que foram tratados por injeção intraventricular de AAV4-IGF-1. B-Actin foi medida como um controle interno. O vetor foi detectado através de todo córtex, haste do cérebro e medula espinhal seguindo a distribuição intraventricular. A **Figura 11B** mostra os resultados de RT-PCR realizado em tecidos de camundongos SOD que foram tratados por injeção intraventricular de AAV4-VEGF. B-Actin foi medida como um controle interno. O vetor foi detectado através de todo córtex, haste do cérebro e medula espinhal seguindo a distribuição intraventricular de AAV4-VEGF.

A **Figura 12** mostra curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier de camundongos SOD1 que receberam administração intraventricular de proteína fluorescente verde (GFP) que codifica AAV4, ou VEGF165 que codifica AAV4. Um aumento significativo na sobrevivência média foi observado nos camundongos que receberam AAV4-VEGF.

A **Figura 13** mostra uma comparação de rotarod (latência em queda) entre camundongos SOD que receberam administração intraventricular de GFP que codifica AAV4 versus VEGF165 que codifica AAV4. Os recipientes de VEGF165 declinam mais gradualmente e mais tarde. A **Figura 13** também mostra uma resistência do membro posterior entre camundongos SOD que receberam administração intraventricular de GFP que codifica AAV4 versus VEGF165 que codifica AAV4. Os recipientes de VEGF165 perdem resistência mais gradualmente e mais tarde.

As Tabelas 1-3 proporcionam um número de pares de gene potenciais para uso na presente invenção onde a concretização utiliza mais do que um gene.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

De modo que a presente invenção possa ser mais rapidamente compreendida, certos termos são primeiro definidos. Definições adicionais são colocadas através de toda descrição detalhada.

A prática da presente invenção empregará, a menos que de outro modo indicado, técnicas convencionais de imunologia, biologia molecular, microbiologia, biologia celular e DNA recombinante, que estão dentro do técnico no assunto, Ver, por exemplo, Sambrook, Fritsch and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2nd edition (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al., (1987)); a série METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1989) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Frehney, ed. (1987)).

Conforme usado no relatório descritivo e reivindicações, a forma singular "um", "uma" e "o" incluem referências plurais a menos que o contex-

to indique claramente de outro modo. Por exemplo, o termo "uma célula" inclui uma pluralidade de células, incluindo misturas destas.

Conforme aqui usado, o termo "compreendendo" é pretendido para significar que as composições e métodos incluem os elementos indicados, mas não excluindo outros. "Consistindo essencialmente em" quando usado para definir composições e métodos, deve significar excluindo outros elementos de qualquer significância essencial à combinação. Desse modo, uma composição consistindo essencialmente nos elementos conforme aqui definidos não excluiria contaminantes de traço a partir de método de isolamento e purificação, e veículos farmacologicamente aceitáveis, tais como, salina tamponada de fosfato, conservantes, e similares. "Consistindo em" deve significar excluindo mais do que elementos de traço de outros ingredientes e etapas de método essenciais para administração da composição desta invenção. As concretizações definidas por cada um destes termos de transição estão dentro do escopo desta invenção.

Todas as designações numéricas, por exemplo, pH, temperatura, tempo, concentração, e peso molecular, incluindo faixas, são aproximações que são variadas (+) ou (-) por incrementos de 0,1. É para ser compreendido, embora nem sempre explicitamente citado, que todas as designações numéricas são precedidas pelo termo "cerca de". É para ser compreendido, embora nem sempre explicitamente citado, que os reagentes aqui descritos são meramente exemplares, e que equivalentes de tais são conhecidos na técnica.

O termo "transgene" se refere a um polinucleotídeo que é introduzido em uma célula de e é capaz de ser transcrito em RNA e opcionalmente, traduzido e/ou expresso sob condições apropriadas. Em um aspecto, ele confere uma propriedade desejada a uma célula em que ele foi introduzido, ou, de outro modo, conduz a um efeito terapêutico ou diagnóstico desejado.

Os termos "partículas de genoma (gp)" ou "equivalentes de genoma", ou "cópias de genoma (gc)", conforme aqui usados em referência à titulação viral, se referem ao número de virions contendo o genoma AAV

DNA recombinante, indiferente de infectividade ou funcionalidade. O número de partículas de genoma em uma preparação de vetor particular pode ser medido por procedimentos, tais como descritos nos Exemplos aqui, ou, por exemplo, em Clark et al. (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278.

Os termos "unidade de infecção (iu)", ou "unidade de replicação", conforme aqui usados em referência à titulação viral, se referem ao número de partículas de vetor AAV recombinante competente de replicação conforme medido pelo ensaio de centro infeccioso, também conhecido como ensaio de centro de replicação, conforme descrito, por exemplo, em McLaughlin et al. (1998) *J. Virol.* 62: 1963-1973.

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

Os termos "terapêutico", "quantidade terapeuticamente efetiva", e seus cognatos, se referem àquela quantidade de um RNA, DNA ou produto de expressão de DNA, e/ou RNA que resulta na prevenção ou retardo de começo ou melhora de sintomas em um indivíduo, ou uma obtenção de um efeito biológico desejado, tal como correção de neuropatologia, por exemplo, patologia celular associada com uma doença neuronal motora, tal como ALS. O termo "correção terapêutica" se refere àquele grau de correção que resulta na prevenção ou retardo de começo ou melhora de sintomas em um indivíduo. A quantidade efetiva pode ser determinada por métodos empíricos conhecidos.

Uma "composição" é também pretendida para envolver uma combinação de agente ativo e outro veículo, por exemplo, composto ou composição, inerte (por exemplo, um agente detectável ou etiqueta) ou ativo, tal como um adjuvante, diluente, aglutinante, estabilizador, tampões, sais, solventes lipofílicos, conservantes, adjuvante, ou similar. Veículos também

incluem excipientes farmacêuticos e proteínas aditivas, peptídeos, aminoácidos, lipídeos, e carboidratos (por exemplo, açúcares, incluindo monossacarídeos, di-, tri-, -tetra-, e oligossacarídeos; açúcares derivatizados, tais como alditóis, ácidos aldônicos, açúcares esterificados e similares; e polissacarídeos ou polímeros de açúcar), que podem estar presentes simplesmente, ou em combinação, compreendendo sozinho, ou em combinação, 1-99,99% em peso ou volume. Excipientes de proteína adequados incluem albumina de soro, tais como albumina de soro humana (HSA), albumina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína, e similares. Aminoácido/componentes de anticorpo representativos, que podem também funcionar na capacidade de tamponamento, incluem alanina, glicina, arginina, betaina, histidina, ácido glutâmico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartame, e similares. Excipientes de carboidrato são também pretendidos dentro do escopo desta invenção, exemplos dos quais incluem, mas não estão limitados a, monossacarídeos, tais como frutose, maltose, glicose, D-manose, sorbose, e similares; dissacarídeos, tais como lactose, sucrose, trehalose, celobiose, e similares; polissacarídeos, tais como rafinose, melezitose, maltodextrins, dextrans, amidos, e similares; e alditóis, tais como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) e mioinositol.

O termo veículo inclui adicionalmente um tampão ou um agente de ajuste de pH; tipicamente, o tampão é um sal preparado de um ácido ou base orgânica. Tampões representativos incluem sais de ácido orgânico, tais como sais de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucônico, ácido carbônico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético, ou ácido ftálico; tampões Tris, trometamina cloridrato, ou fosfatos. Veículos adicionais incluem excipientes/aditivos poliméricos, tais como polivinilpirrolidonas, ficolls (um açúcar polimérico), dextratos (por exemplo, ciclodextrins, tais como 2-hidroxiopropil-quadratura-ciclodextrin), polietileno glicóis, agentes aromatizantes, agentes antimicrobiais, adoçantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tenso-ativos (por exemplo, polissorbatos tais como "TWEEN 20" e "TWEEN 80"), lipídeos (por exemplo, fosfolipídeos, ácidos graxos), esteróides (por exemplo, colesterol), e agentes quelantes (por exemplo, EDTA).

Conforme aqui usado, o termo "veículo farmacologicamente aceitável" envolve qualquer dos veículos farmacêuticos padrões, tais como uma solução de salina tamponada com fosfato, água, e emulsões, tais como uma emulsão de óleo/água ou água/óleo, e vários tipos de agentes de umedecimento. As composições também podem incluir estabilizadores e conservantes, e qualquer dos veículos acima notados com a provisão adicional que eles sejam aceitáveis para uso in vivo. Para exemplo de veículos, estabilizadores e adjuvantes, ver Martin REMINGTON'S PHARM. SCI., 15th Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) e Williams & Williams, (1995), e em "PHYSICIAN'S DESK REFERENCE", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, N. J. (1998). Os veículos podem também compreender fluido cerebrospinal artificial (aCSF).

Um "indivíduo", "individual" ou "paciente" é usado intervariavelmente aqui, que se referem a um vertebrado, preferivelmente um mamífero, mais preferivelmente um ser humano. Mamíferos incluem, mas não estão limitados a, murina, ratos, símios, seres humanos, animais de fazenda, animais de esporte, e animais domésticos.

Um "controle" é um indivíduo alternativo ou amostra usada em um experimento para proposta de comparação. Um controle pode ser "positivo" ou "negativo". Por exemplo, onde a proposta do experimento é determinar uma correlação de um nível de expressão alterado de um gene com um tipo particular de patologia (ver, ALS, por exemplo, infra), é geralmente preferível usar um controle positivo (um indivíduo ou uma amostra de um indivíduo, conduzindo tal alteração e exibindo sintomas característicos daquela doença), e um controle negativo (um indivíduo ou uma amostra de um indivíduo carecendo da expressão alterada e sintoma clínico daquela doença).

"Diferencialmente expresso", conforme aplicado a um gene, se refere à produção diferencial do mRNA transcrito a partir do gene, ou do produto de proteína codificado pelo gene. Um gene diferencialmente expresso pode ser sobre-expresso ou sub-expresso, conforme comparado ao nível de expressão de uma célula normal ou de controle. Em um aspecto, ele se refere a um diferencial que é pelo menos 1,5 vezes, ou pelo menos 2 vezes, ou, alternativamente, pelo menos 5 vezes, ou, alternativamente, pelo menos

10 vezes mais alto ou mais baixo do que o nível de expressão detectado em uma amostra de controle. O termo "diferencialmente expresso" também se refere a sequências de nucleotídeo em uma célula ou tecido que são expressas onde inativas em uma célula de controle, ou não expressas onde expressas em uma célula de controle.

Conforme aqui usado, o termo "modular" significa variar a quantidade ou intensidade de um efeito ou consequência, por exemplo, para aumentar, diminuir ou reduzir.

Conforme aqui usado, o termo "melhorar" é um sinônimo de "aliviar", e significa reduzir ou diminuir. Por exemplo, pode-se melhorar os sintomas de uma doença ou enfermidade tornando-a mais suportável.

Para identificação de estruturas no cérebro humano, ver, por exemplo, *The Human Brain: Surface, Three-Dimensional Sectional Anatomy With MRI, and Blood Supply*, 2nd ed., eds. Deuteron et al., Springer Vela, 1999; *Atlas of the Brain*, eds. Mai et al., Academic Press; 1997; and *Coplanar Stereotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging*, eds. Tamarack et al., Thyme Medical Pub., 1988. Para identificação de estruturas no cérebro de camundongo, ver, por exemplo, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed., Academic Press, 2000.

A distribuição intracerebroventricular ou intraventricular de um vetor viral recombinante pode ser realizada em qualquer um ou mais dos ventrículos do cérebro, que são preenchidos com fluido cerebroespinal (CSF). CSF é um fluido claro que enche os ventrículos, está presente no espaço subaracnóide, e circunda o cérebro e medula espinhal. O CSF é produzido pelo plexo de coróide, e via a exsudação ou transmissão de fluido de tecido pelo cérebro nos ventrículos. O plexo de coróide é uma estrutura que reveste a parte inferior do ventrículo lateral e a parte superior dos terceiro e quarto ventrículos. Certos estudos têm indicado que estas estruturas são capazes de produzirem 400-600 ccs de fluido por dia consistente com uma quantidade para encher os espaços do sistema nervoso central quatro vezes em um dia. Em adultos, o volume deste fluido tem sido calculado para

ser de 125 a 150 ml (4-5 oz). O CSF está em formação, circulação e absorção contínuas. Certos estudos têm indicado que aproximadamente 430 a 450 ml (quase dois copos) de CFS pode ser produzido todo dia. Certos cálculos estimam que a produção se iguala a aproximadamente 0,35 ml por minuto em adultos, e 0,15 ml por minuto em crianças. O plexo de coróide dos ventrículos laterais produz a maioria de CSF. Ele escoia através da foramina de Monro no terceiro ventrículo onde ele é adicionado pela produção a partir do terceiro ventrículo e continua para baixo através do aquaduto de Sylvius para o quarto ventrículo. O quarto ventrículo adiciona mais CSF; o fluido em seguida se desloca no espaço subaracnóide através da foramina de Legendie e Luschka. Ele então circula através de toda a base do cérebro, para baixo ao redor da medula espinhal e para cima sobre os hemisférios cerebrais. O CSF é descarregado no sangue via a vilosidades aracnóides e cavidades ocas vasculares intracraniais.

Em aspectos onde a transferência de gene é mediada por um vetor viral de DNA, tal como um adenovírus (Ad) ou vírus adeno-associado (AAV), um constructo de vetor se refere ao polinucleotídeo compreendendo o genoma viral ou parte deste, e um transgene. Adenovírus (Ads) são um grupo homogêneo bem caracterizado de vírus, incluindo mais de 50 sorotipos. Ver, por exemplo, Pedido PCT Internacional N° WO 95/27071. Ads são fáceis de se desenvolverem e não requerem integração no genoma da célula hospedeira. Vetores derivados de Ad recombinante, particularmente aqueles que reduzem o potencial para recombinação e geração de vírus tipo selvagem, têm também sido construídos. Ver, Pedidos PCTs Internacionais N° WO 95/00655 e WO 95/11984. AAV tipo selvagem tem alta infectividade e especificidade integrando no genoma da célula hospedeira. Ver, Hermonat and Muzyezka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**:6466-6470 e Lebkowski, et al., (1988) Mol. Cell. Biol. **8**:3988-3996.

Em um aspecto, a invenção proporciona método para distribuir um transgene ao cérebro de um indivíduo por administração intraventricular de um vetor viral neurotrófico recombinante contendo o transgene IGF-1. A distribuição é sob condições que favorecem expressão do transgene em cé-

lulas endimais.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um método para distribuir um produto transgene terapêutico a uma célula-alvo do SNC, que é um neurônio ou uma célula glial, em um mamífero afligido com a enfermidade neuronal motora, por exemplo, ALS ou dano traumático da medula espinal, onde o transgene pode ser IGF-1. O transgene pode ser administrado, via um vírus neurotrófico. O vírus pode ser administrado via os ventrículos. Células endimais podem ser transduzidas para expressarem o transgene e secretarem o produto de proteína codificado.

Em uma concretização alternada, a invenção é um método para tratar uma enfermidade de neurônio motor em um indivíduo por administração intraventricular de um vetor viral neurotrófico recombinante contendo um transgene terapêutico ao cérebro do indivíduo, em que o transgene é expresso em uma quantidade terapêuticamente efetiva no indivíduo.

Esta invenção também é um método para melhorar os sintomas de uma enfermidade de neurônio motor em um indivíduo por administração intraventricular de um vetor viral neurotrófico recombinante contendo um transgene terapêutico ao cérebro do indivíduo, em que referido transgene é expresso em uma quantidade terapêuticamente efetiva no indivíduo.

Vetores virais neurotróficos adequados para a prática desta invenção incluem, mas não estão limitados a, vetores virais adeno-associados (AAV), vetores virais de herpes simplex (Patente dos Estados Unidos N° 5.672.344), e vetores lentivirais.

Nos métodos da invenção, AAV de qualquer sorotipo pode ser usado. O sorotipo do vetor viral usado em certas concretizações da invenção é selecionado a partir do grupo consistindo em AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 e AAV8 (ver, por exemplo, Gao et al. (2002) PNAS, 99:11854-11859; e *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Humana Press, 2003). Outros sorotipos além daqueles aqui listados podem ser usados. Além disso, vetores AAV pseudotipados podem ser utilizados nos métodos aqui descritos. Vetores AAV pseudotipados são aqueles que contêm o genoma de um sorotipo de AAV no capsid de um se-

gundo sorotipo de AAV; por exemplo, um vetor AAV que contém o capsid AAV2 e o genoma AAV1, ou um vetor AAV que contém o capsid AAV5 e o genoma AAV2 (Auricchio et al., (2001) Hum. Mol. Genet., 10(26):3075-81).

Vetores AAV são derivados de parvovírus de DNA de trançado simples (ss) que são não-patogênicos para mamíferos (revisto em Muzyscka (1992) Curr. Top. Microb. Immunol., 158-97-129). Brevemente, vetores baseados em AAV recombinantes têm os genes virais *rep* e *cap* que montam em 96% do genoma viral removido, deixando as duas repetições terminais invertidas de 145 pares bases (bp) de flanqueamento (ITRs), que são usadas para iniciar replicação, acondicionamento e integração de DNA viral. Na ausência de vírus auxiliador, AAV tipo selvagem se integra no genoma de célula hospedeira humana com especificidade de local preferencial no cromossomo 19q 13.3, ou pode ser mantido episossomalmente. Uma partícula de AAV simples pode acomodar até 5 kb de ssDNA, portanto, deixando cerca de 4,5 kb para um transgene e elementos regulatórios, que é tipicamente suficiente. Contudo, sistemas de trans-entrançamento conforme descritos, por exemplo, na Patente dos Estados Unidos N° 6.544.785, podem quase dobrar este limite.

Em uma concretização ilustrativa, AAV é AAV4. Vírus adeno-associados de muitos sorotipos, especialmente AAV2, foram exclusivamente estudados e caracterizados como vetores de terapia de gene. Aqueles técnicos na técnica estarão familiares com a preparação de vetores de terapia de gene baseada em AAV funcional. Numerosas referências a vários métodos de produção, purificação e preparação de AAV para administração a indivíduos humanos podem ser encontradas no corpo extensivo de literatura publicada (ver, por exemplo, *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Humana Press, 2003). Adicionalmente, terapia de gene baseada em AAV objetivada para células do SNC foi descrita nas Patentes dos Estados Unidos N°s 6.180.613 e 6.503.888. Vetores AAV exemplares adicionais são vetores de sorotipo AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 e AAV2/8 recombinantes que codificam proteína humana.

Em certos métodos da invenção, o vetor compreende um trans-

gene operavelmente ligado a um promotor. O transgene codifica uma molécula biologicamente ativa, expressão da qual no SNC resulta em pelo menos correção parcial de neuropatologia e/ou estabilização de progressão de doença. O transgene pode ser fator-1 de crescimento de insulina (IGF-1), calbindin D28, parvalbumin, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2, CNTF (Fator neurotrófico ciliar), ouriço sônico (shh), eritropoietin (EPO), lisil oxidase (LOX), progranulin, prolactin, ghrelin, neuroserpin, angiogenin, e placenta lactogen.

Em certos métodos da invenção, o vetor compreende mais do que um transgene, em que cada transgene é operavelmente ligado a um promotor para capacitar a expressão de mais do que um transgene de um vetor AAV simples. Em métodos adicionais, os transgenes podem ser operavelmente ligados ao mesmo promotor. Cada transgene codifica uma molécula biologicamente ativa, expressão da qual no SNC resulta em pelo menos correção parcial de neuropatologia. Além disso, em casos onde mais do que um transgene é distribuído, os transgenes podem ser distribuídos via mais do que um vetor AAV, em que cada vetor AAV compreende um transgene operavelmente ligado a um promotor. Os transgenes podem ser selecionados a partir do grupo consistindo em: fator-1 de crescimento de insulina (IGF-1), calbindin D28, parvalbumin, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2, CNTF (Fator neurotrófico ciliar), ouriço sônico (shh), eritropoietin (EPO), lisil oxidase (LOX), progranulin, prolactin, ghrelin, neuroserpin, angiogenin, e placenta lactogen. Por exemplo, os transgenes podem compreender VEGF, tais como VEGF165 e IGF-1.

O gene de fator de crescimento similar à insulina (IGF-1) tem uma estrutura complexa, que é bem-conhecida na técnica. Ele tem pelo menos dois produtos de mRNA alternativamente divididos decorrentes da transcrição de gene. Existe um peptídeo de 153 aminoácidos, conhecidos por vários nomes incluindo IGF-1A ou IGF-Ea, e um peptídeo de 195 aminoácidos, conhecido por vários nomes, incluindo IGF-1B ou IGF-1Eb. A forma Eb pode também ser conhecida como Ec em seres humanos. A forma madura de IGF-1 é um polipeptídeo de 70 aminoácidos. Ambos IGF-Ea e IGF-1Eb

contêm o peptídeo maduro de 70 aminoácidos, mas diferem na sequência e comprimento de suas extensões carboxil-terminais. As sequências de peptídeo de IGF-1Ea e IGF-1Eb são representadas por SEQ ID NOS 1 e 2, respectivamente. Os cDNAs genômicos e funcionais de IGF-1 humano, bem como informação adicional com relação ao gene IGF-1 e seus produtos, são disponíveis em Unigere Accession N° NM_00618. A proteína IGF-1 pode ter as sequências mostradas em SEQ ID NO:3, ou variantes alélicas destas. Variantes alélicas podem diferir por um número simples ou pequeno de resíduos de aminoácido, tipicamente menos do que 5, menos do que 4, menos do que 3 resíduos. A sequência de proteína IGF-1 pode ser modificada para conter o domínio de transdução de TAT (YGRKKRRQRRR), conforme mostrado em SEQ ID NO: 4.

Embora suas funções não sejam totalmente conhecidas, calbindin D28K (também referida como calbindin D28) e parvalbumin são proteínas de ligação de cálcio teorizadas para serem envolvidas em tamponamento de cálcio. Sem estar limitado a teoria, existe evidência de sugerir que homeostase de cálcio é alterada em indivíduos com ALS. Existe evidência de sugerir que baixos níveis de calbindin-D28K e/ou parvalbumin podem aumentar a vulnerabilidade de neurônios motores em ALS pela redução de sua capacidade de manusear carga de cálcio aumentada. Esta redução pode conduzir a dano celular e eventual morte do neurônio motor. Outra evidência sugere que neurônios ricos em proteínas de ligação de cálcio, tais como calbindin D28K e parvalbumin, são resistentes à degradação.

HIF-1 é uma proteína heterodimérica composta de duas subunidades: (i) uma beta (β) subunidade constitutivamente expressa também conhecida como translocadora nuclear de aril hidrocarboneto (ARNT) (que é repartida por outros fatores de transcrição relacionados (por exemplo, o receptor dioxil/aril hidrocarboneto (DR/AhR)); e (ii) uma alfa (α) subunidade (ver, por exemplo, Pedido Internacional N° PCT/US96/10251 que descreve a purificação de afinidade recente e clonagem molecular de HIF-1 α), cujo acúmulo é regulado por um mecanismo pós-translacional tal que níveis altos da alfa subunidade pode somente ser detectada durante condições hipóxi-

cas. Ambas subunidades são membros da família (bHLH)-PAS de espiral-
laço-espiral básica de fatores de transcrição. Estes domínios regulam liga-
ção de DNA e dimerização. O domínio de transativação reside no terminal C
da proteína. A região básica consiste em aproximadamente 15 aminoácidos
5 predominantemente básicos responsáveis pela ligação de DNA direta. Esta
região é adjacente a duas espirais α anfipáticas, separadas por um laço de
comprimento variável, que forma a interface de dimerização primária entre
membros de família (Moore, A. W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA
97:10436-41 (2000)). O domínio PAS, que é denominado após as primeiras
10 três proteínas em que ele foi identificado (Per, ARNT e Sim), envolve 200-
300 aminoácidos contendo duas regiões livremente conservadas, grande-
mente hidrofóbicas de aproximadamente 50 aminoácidos, designadas PAS e
PAS B. A HIF-1 α subunidade é instável durante condições normóxicas, a
sobre-expressão desta subunidade em células cultivadas sobre níveis de
15 oxigênio normais sendo capaz de induzir expressão de genes normalmente
induzidos por hipoxia. Uma estratégia alternativa seria modificar a HIF-1 α
subunidade que não é mais estabilizada por condições normóxicas e, portan-
to, seria mais potente sob uma faixa de condições de oxigênio. A substitui-
ção da região de terminal C (ou transativação) da proteína de fator induzível
20 por hipoxia com um domínio de transativação forte de uma proteína ativado-
ra transcricional tal como, por exemplo, Vírus Herpes Simplex (HSV) VP16,
NF κ B ou fator de transcrição de levedura GAL4 e GCN4, é designada para
estabilizar a proteína sob condições normóxicas, e proporciona ativação
transcricional constitutiva forte. Para estabilizar a proteína de fator induzível
25 por hipoxia sob condições normóxicas, e proporcionar ativação transcricional
constitutiva forte, uma proteína de fusão híbrida/quimérica consistindo dos
domínios de ligação de DNA e dimerização de HIF-1 α e o domínio de prote-
ína de transativação de Herpes Simplex (HSV) VP16 foi construída. A admi-
nistração deste híbrido/quimérico às células de um indivíduo, via terapia de
30 gene, induz a expressão de genes normalmente regulados em resposta a
hipoxia (isto é, VEGF e similares). Um híbrido HIF-1 α constitutivamente es-
tável foi mostrado ser efetivo para tratamento de pacientes isquêmicos (Pa-

tentes dos Estados Unidos N°s 6.432.927 e 7.053.062, ambas das quais sendo incorporadas aqui por referência em sua totalidade).

Membros da família de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) estão entre os moduladores mais poderosos de biologia vascular. Eles regulam vasculogênese, angiogênese, e manutenção vascular. VEGF165 é um tal membro da família de VEGF que pode ser usado na presente invenção.

A base molecular de atrofia muscular espinhal (SMA), uma enfermidade neuromuscular recessiva autossomal, é a perda homozigótica do gene 1 de neurônio motor de sobrevivência (SMN1). Uma cópia quase idêntica do gene SNN1, denominada SMN2, modula a severidade da doença. A diferença funcional entre ambos os genes é uma mutação translacionalmente inativa que, contudo, rompe um intensificador de repartição exônica fazendo com que exon 7 salte em muitas transcrições de SMN2. Somente 10% de transcrições de SMN2 codificam proteína de comprimento total funcional idêntica a SMN1. A proteína de SMN desempenha um papel bem estabelecido na montagem do "spliceosome", e pode também mediar mRNA que trafega no axônio e término do nervo de neurônios.

CNTF (Fator neurotrófico ciliar) é uma neurocitoquina expressa por células gliais em nervos periféricos e o sistema nervoso central. CNTF é geralmente reconhecido por sua função no suporte e sobrevivência de tipos de célula não-neuronal e neuronal. Ver, por exemplo, Vergara, C e Ramirez, B; Brain Res, Brain Res. Rev. 2004; 47: 161-73.

O ouriço sônico (Shh) controla processos de desenvolvimentos importantes, incluindo sobrevivência de célula neuronal e glial.

A Eritropoietin (EPO) é um regulador importante de células progenitoras eritróides. Contudo, é funcionalmente expresso no sistema nervoso, e foi reportada para ter efeitos neuroprotetores. Ver, por exemplo, Bartesaghi, S., 2005. Neurotoxicology, 26:923-8.

Lisil oxidase (LOX) oxida a cadeia lateral de peptidil lisina, convertendo, desse modo, resíduos de lisina em alfa-aminoadípico-delta-semialdeído. Esta é uma mudança pós-translacional que, por exemplo, ca-

pacita a reticulação covalente das cadeias de componente de colágeno e elastina. Ela estabiliza os depósitos fibrosos destas proteínas na matriz extracelular. LOX pode também oxidar lisina dentro de uma variedade de proteínas catiônicas, que sugerem que sua função seja mais ampla do que estabilização ou a matriz extracelular. LOX é sintetizada como uma pré-proteína; ela emerge da célula como pró-LOX, e é processada proteoliticamente à enzima ativa. Ver, por exemplo, Lucero, HA e Kagan, HM, *Cell Mol. Life Sci.* 2006; 63(19-20):2304-16.

Progranulin (PGRN) é uma proteína pleiotrópica que tem ganhado a atenção da comunidade de neurociência com as descobertas recentes de mutações no gene que causa degeneração lobar fronto-temporal. PGRN no sistema nervoso central é expressa por microglia e neurônios, e desempenha um papel no desenvolvimento do cérebro. PGRN é também envolvida em processos múltiplos de "modelagem de tecido, incluindo desenvolvimento, reparo de ferimento e tumorigênese. PGRN é convertida em Granulin (GRN) por enzimas elastase. Enquanto progranulin tem propriedades tróficas, GRNs são mais semelhantes a mediadores inflamatórios. Estudos de expressão de gene de modelos de animal de doença de SNC mostram um aumento diferencial na PGRN combinada com ativação microglial e inflamação. A sugestão que o aumento na expressão de PGRN está proximalmente relacionada à ativação microglial e neuro-inflamação. Além disso, a expressão de PGRN é aumentada na microglia aumentada em muitas doenças neuro-degenerativas, incluindo doença de neurônio motor e doença de Alzheimer. Estudos têm identificado mutações na PGRN como uma causa de doença neuro-degenerativa, e indicam a importância de função de PGRN para sobrevivência neuronal.

Prolactin e placenta lactogen: Oligodendrócitos, as células de mielinação do SNC, continuam a serem geradas por células precursoras de oligodendrócito (OPCs) através de toda idade adulta (Gensert and Goldman, 1997; Levison et al., 2006; Peters and Sethares, 2004), e são requeridas para o reparo intrínseco de dano de mielina no SNC do adulto (Polito and Reynolds, 2005). Os eventos fisiológicos que modulam proliferação de OPC

e a regeneração de novos oligodendrócitos de mielinização no SNC do adulto são grandemente conhecidos.

Recentemente tem sido reportado que pacientes com Esclerose Múltipla, uma doença de demielinação, têm uma taxa de recidiva reduzida durante o terceiro trimestre de gravidez sugerindo que os hormônios influenciam a geração de oligodendrócito (Confavreaux et al., 1998; Voskuhl, 2003). A remissão em pacientes MS está correlacionada com uma diminuição no número e tamanho de lesões de matéria branca ativa (van Walderveen et al., 1994). Interessantemente, a gravidez em camundongos resulta em um aumento na geração de novos oligodendrócitos e no número de axônios mielinados dentro do SNC maternal (Gregg et al., 2007). Prolactin, um hormônio que serve de suporte durante o estágio final de gravidez, tem sido mostrado como regular proliferação de OPC durante gravidez, e promove reparo de matéria branca em camundongos fêmeas virgens (Gregg et al, 2007).

Existe uma razão para se acreditar que lactogem de placenta humana (hPL), um hormônio que também chega ao ponto máximo durante o terceiro trimestre de gravidez (Selenkow et al., 1969), pode ter uma influência similar na geração de oligodendrócito. hPL tem um número de atividades biológicas que são quantitativamente similares ao hormônio de crescimento humano (hGH) e prolactin (Lesniak et al., 1977), e parece ser um regulador maior de produção de IGF-1 (Handwerger et al., 1992; Zimkeller, 2000; Handwerger et al., 2000). Ambos hGH e IGF-1 foram mostrados serem estimuladores de mielinização no SNC do adulto (Carson et al., 1993; Peltwon et al., 1977). Portanto, o tratamento de doenças do SNC envolvendo demielinação, tais como MS, ALS, derrame cerebral e dano da medula espinhal, pode se beneficiar de injeção intraventricular de terapias baseadas em PRL ou hPL de um rhPRL ou hPL que expressam vetor viral.

Ghrelin é um hormônio gástrico que foi reconhecido em 1999 como um mediador de liberação de hormônio de crescimento. Ver, por exemplo, Wu, JT et al., 2004. *Ann. Surg.* 239-464.

Neuroserpin é um membro da família de inibidor de protease serpin. Em certas condições do sistema nervoso central, neuroserpin pode

desempenhar um papel potencialmente neuroprotetor através do bloqueio dos efeitos de tPA. Ver, por exemplo, Galliciotti, G e Sonderegger, P, 2006, *Front Biosci* 11:33; Simonin, Y et al., 2006, *J Neurosci*; 26:10614; Miranda, E and Lomas, DA, 2006, *Cell Mol Life Sci* 63:709.

5 Angiogenin é um membro da superfamília de RNase. Ela é um constituinte normal de circulação, mas tem sido também implicado como um fator de risco em enfermidades de neurônio motor.

Sem estar limitado a teoria, IGF-1 é uma proteína terapêutica para o tratamento de ALS devido a suas muitas ações em níveis diferentes de neuraxis (ver Dore et al., *Trends Neurosci*, 1997, 20:326-331). No cérebro: É considerado reduzir ambas apoptose neuronal e glial, proteger neurônios contra toxicidade induzida por ferro, colchicina, desestabilizadores de cálcio, peróxidos, e cotoquinas. É também considerado modular a liberação de neurotransmissores acetilcolina e glutamato. É também considerado induzir a expressão de neurofilamento, tublin e proteína básica mielin. Na medula espinhal: IGF-1 é considerada modular atividade de ChAT e atenuar perda de fenótipo colinérgico, aumentar o crescimento de neurônio motor, aumentar mielinização, inibir demielinação, estimular proliferação de neurônio motor e diferenciação de células precursoras, e promover divisão de célula de Schwann, maturação e crescimento no músculo: IGF-1 é considerado induzir formação de grupo de receptor acetilcolina na junção neuromuscular, e aumentar função neuromuscular e resistência de músculo.

10
15
20

O nível de expressão de transgene em células eucarióticas é grandemente determinado pelo promotor transcricional dentro do cassete de expressão transgene. Os promotores que mostram atividade de longo prazo e são específicos de tecido e mesmo específicos de célula são usados em algumas concretizações. Exemplos não-limitativos de promotores incluem, mas não estão limitados a, o promotor de citomegalovírus (CMV) (Kaplitt et al., (1994) *Nat. Genet.* 8:148-154), promotor β -3 globin CMV/humano (mandel et al. (1998) *J. Neurosci.* 18:4271-4284), promotor de GFAP (Xu et al. (2001) *Gene Ther.* 8:1323-1332), o promotor 1.8 kb de enolase específica de neurônio (NSE) (Klein et al. (1998) *Exp. Neurol.* 150:183-194), promotor beta

25
30

actin de galinha (CBA) (Miyazaki (1989) *Gene* **79**:269-277), o promotor β -glucuronidase (GUSB) (Shipley et al. (1991) *Genetics* **10**:1009-1018), e promotores de ubiquitin, tais como aqueles isolados de ubiquitin A humano, ubiquitin B humano, e ubiquitin C humano, conforme descrito na Patente dos Estados Unidos N° 6.667.174. Para prolongar expressão, outros elementos regulatórios podem adicionalmente serem operavelmente ligados ao transgene, tais como, por exemplo, o Elemento Pós-Regulatório De vírus de Hepatite de Woodchuck (WPRE) (Donello et al. (1998) *J. Virol.* **72**:5085-5092), ou o local de polialdenilação de hormônio de crescimento bovino (BGH).

10 Para algumas aplicações de terapia de gene do SNC, pode ser necessário controlar a atividade transcricional. Para esta finalidade, a regulação farmacológica de expressão de gene com vetores virais pode ser obtida pela inclusão de vários elementos regulatórios e promotores responsivos ao fármaco, conforme descrito, por exemplo, em Haberman et al. (1998) *Gene Ther.* **5**:1604-16011; e Ye et al. (1995) *Science* **283**:88-91.

Em certas concretizações, a concentração ou titulação do vetor na composição é pelo menos: (a) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou 50 ($\times 10^{12}$ gl/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou 50 ($\times 10^9$ tu/ml); ou (c) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou 50 ($\times 10^{10}$ iu/ml).

20 Em um aspecto, o transgene codifica uma molécula biologicamente ativa, expressão da qual no SNC resulta em pelo menos correção parcial de neuropatologia e/ou estabilização de progressão de doença. Em algumas concretizações, o produto de transgene terapêutico é uma proteína IGF-1 que alivia e/ou previne os sintomas de ALS. Ver Roaul et al. (2005) *Nat. Med.* **11**(4):423-428 e Ralph et al. (2005) *Nat. Med.* **11**(4):429-433. Em outros aspectos, dois transgenes são codificados, por exemplo, IGF-1 e VEGF, expressão do qual no SNC resulta em pelo menos correção parcial de neuropatologia, tal como alívio e/ou preservação e/ou estabilização e/ou redução da progressão dos sintomas de ALS.

30 Em um aspecto, quando se realiza estes métodos, o transgene expressa uma quantidade terapêutica de fator-1 de crescimento de insulina (IGF-1), calbindin D28, parvalbumin, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-1,

SMN-2, CNTF (Fator neurotrófico ciliar), ouriço sônico (shh), eritropoietin (EPO), lisil oxidase (LOX), progranulin, prolactin, ghrelin, neuroserpin, angiogenin, e placenta lactogen.

Para identificação de estruturas no cérebro humano, ver, por exemplo, The Human Brain: Surface, Three-Dimensional Sectional Anatomy With MRI, and Blood Supply, 2nd ed., eds. Deuteron et al., Springer Vela, 1999; Atlas of the Human Brain, eds. Mai et al., Academic Press; 1997; e Co-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging, eds. Tamarack et al., Thyme Medical Pub., 1088. Para identificação de estruturas no cérebro de camundongo, ver, por exemplo, The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd ed., Academic Press, 2000.

Para distribuir a solução ou outra composição contendo o vetor viral especificamente a uma região particular do sistema nervoso central, tal como a um ventrículo particular, por exemplo, aos ventrículos laterais, ou ao quarto ventrículo do cérebro, ela pode ser administrada por microinjeção estereotáxica. Por exemplo, no dia da cirurgia, os pacientes terão a base de estrutura estereotáxica fixada no lugar (aparafusada na cabeça). O cérebro com base de estrutura estereotáxica (MRI-compatível com marcações fiduciárias) será fotografado usando-se MRI de alta resolução. As imagens de MRI serão, em seguida, transferidas para um computador que funciona com software estereotáxico. Uma série de imagens coronais, sagitais e axiais será usada para determinar o local alvo de injeção de vetor, e trajetória. O software translada diretamente a trajetória nas coordenadas tridimensionais apropriadas para a estrutura estereotáxica. Furos de broca são perfurados acima do local de entrada, e o aparelho estereotáxico localizado com a agulha implantada na dada profundidade. A solução de vetor em um veículo farmacologicamente aceitável será então injetada. Rotas adicionais de administração podem ser usadas, por exemplo, aplicação cortical superficial sob visualização direta, ou outra aplicação não-estereotáxica.

Um modo de distribuir o vetor viral é usar uma bomba. Tais bombas são comercialmente disponíveis, por exemplo, de Alzet (Cupertino,

CA) ou Medtronic (Minneapolis, MN). A bomba pode ser implantável. Outro modo conveniente de administrar o vetor é usar uma cânula ou cateter.

A invenção objeto proporciona métodos para modular, corrigir ou aumentar a função motora em um indivíduo afligido com dano neuronal motor. Para a proposta de ilustração somente, o indivíduo pode sofrer de uma
5 ou mais de esclerose lateral amitrófica (ALS), atrofia muscular bulbar espinhal, atrofia muscular espinhal, ataxia cerebelar espinhal, esclerose lateral primária (PLS), ou dano traumático da medula espinhal.

Sem estar limitado a teoria, a patologia associada com dano de
10 neurônio motor pode incluir degeneração de neurônio motor, gliose, anormalidades de neurofilamento, perda de fibras mielinadas em tratos corticoespinhal e raízes ventrais. Dois tipos de ataque são reconhecidos: ataque bulbar, que afeta os neurônios motores da haste do cérebro, (afeta os músculos faciais, fala e engolimento); e ataque de membro, que afeta os neurônios mo-
15 tores da medula espinhal, é refletido por espasmodicidade, fraqueza generalizada, atrofia muscular, paralisia, e falha respiratória. Em ALS, os indivíduos têm ambos ataque bulbar e de membro. Em PLS, os indivíduos têm ataque bulbar.

A capacidade de organizar e executar atos motores complexos
20 depende dos sinais a partir das áreas motoras no córtex motor. Os comandos motores corticais descendem em dois traços. As fibras corticobulbares controlam o núcleo motor na base do cérebro que move os músculos faciais, e as fibras corticoespinhais controlam os neurônios motores espinais que enervam os músculos do tronco e membro. O córtex cerebral também influ-
25 encia indiretamente a atividade motora espinhal pela ação nas trajetórias de base do cérebro descendentes.

O córtex motor primário assenta no giro pré-central na área de Broadmann (4). Os axônios dos neurônios corticais que se projetam para a medula espinhal funcionam juntos no trato corticoespinhal, um feixe massivo
30 de fibras contendo cerca de 1 milhão de axônios. Cerca de um terço destes se originam do giro pré-central do lóbulo frontal. Outro terço se origina da área 6. O restante se origina nas áreas 3, 2 e 1 no córtex sensorial somático

e regula transmissão de entrada aferente através do tentáculo dorsal.

As fibras corticoespinhais funcionam juntas com fibras cortico-bulbares através do membro posterior da cápsula interna para alcançar a porção ventral do cérebro médio. Elas se separam nas pontes em pequenos
5 feixes de fibras que percorrem entre o núcleo de pontino. Elas se reagrupam na medula para formar a pirâmide medular. Cerca de três quartos das fibras corticoespinhais cruzam a linha média na interceptação piramidal na junção da coluna medular e espinhal. As fibras cruzadas descendem na parte dorsal das colunas laterais (coluna dorsolateral) da coluna espinhal, formando o
10 trato corticoespinhal lateral. As fibras não-cruzadas descendem nas colunas ventrais como o trato corticoespinhal ventral.

As divisões lateral e ventral do trato corticoespinhal terminam em cerca de as mesmas regiões de matéria cinza espinhal e sistemas medianos da haste do cérebro. O trato corticoespinhal lateral se projeta principalmente
15 para o núcleo motor na parte lateral do tentáculo ventral e para interneurônios na zona intermediária. O trato corticoespinhal ventral se projeta bilateralmente para a coluna de célula ventromedial e para as porções de união das zonas intermediárias que contêm neurônios motores que inervam os músculos axiais.

Se desejado, a estrutura de cérebro humano pode estar correlacionada a estruturas similares no cérebro de outro mamífero. Por exemplo, muitos mamíferos, incluindo seres humanos e roedores, mostram uma organização topográfica similar das projeções entorinal-hipocampo, com neurônios na parte lateral de ambos córtex lateral e medial entorinal que se proje-
20 tam para a parte dorsal ou pólo septal do hipocampo, pelo que a projeção ao hipocampo ventral se origina principalmente a partir dos neurônios nas partes medianas do córtex entorinal (Principles of Neural Science, 4th ed., eds. Kandel et al., McGraw-Hill, 1991; The Rat Nervous System, 2nd ed., ed. Paxinos, Academic Press, 1995). Além disso, células de camada II do córtex
25 entorinal se projetam para o giro dentado, e elas terminam nos dois terços externos da camada molecular do giro dentado. Os axônios das células de camada II se projetam bilateralmente para as áreas cornu ammonis CA1 e
30

CA3 do hipocampo, terminando na camada molecular *stratum lacunose*.

Em um aspecto, os métodos descritos incluem administrar ao SNC de um indivíduo afligido um vetor viral neurotrófico transportando um transgene que codifica um produto terapêutico, e permitindo que o transgene
5 seja expresso dentro do SNC perto do local de administração a um nível suficiente para exercer um efeito terapêutico conforme a proteína expressa é transportada via o SSF através de todo SNC. Em adição, o vetor pode compreender um polinucleotídeo que codifica uma molécula biologicamente ativa efetiva para tratar a enfermidade do SNC. Tais moléculas biologicamente
10 ativas podem compreender peptídeos incluindo, mas não limitados a, versões nativas ou mudadas de proteínas de comprimento total, versões nativas ou mudadas de fragmentos de proteína, polipeptídeos sintéticos.

Em uma concretização ilustrativa, a administração é efetuada por injeção direta de uma solução de vetor de alta titulação em um ou mais
15 dos espaços ventriculares do cérebro, tais como o ventrículo lateral de um indivíduo ou paciente. Por exemplo, a administração é por injeção de massa direta em um ou mais ventrículos do cérebro, tais como os ventrículos laterais e quarto ventrículos.

Em algumas concretizações, os métodos compreendem administração de um vetor neurotrófico de alta titulação transportando um transgene terapêutico de modo que o produto transgene é expresso em um nível terapêutico em um primeiro local dentro do SNC distal ao último local de ação do produto expresso. Em algumas concretizações, a titulação viral da composição é pelo menos: (a) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou 50 ($\times 10^{12}$
20 gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou 50 ($\times 10^9$ tu/ml); ou (c) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou 50 ($\times 10^{10}$ iu/ml).

Em camundongos experimentais, o volume total de solução de AAV injetada está, por exemplo, entre 1 a 20 μ l. Para outros mamíferos, incluindo o cérebro humano, volumes e taxas de distribuição estão apropriadamente em escala. Por exemplo, tem sido demonstrado que volumes de
30 150 μ l podem ser seguramente injetados no cérebro de primata (Janson et al. (2002) Hum. Gene Ther. 13:1391-1412). O tratamento pode consistir em

uma injeção simples por local alvo, ou pode ser repetido em um ou mais ventrículos. Ventrículos adequados incluem os ventrículos laterais, terceiro ventrículo, e quarto ventrículo. Locais de injeção múltiplos podem ser usados. Por exemplo, em algumas concretizações, em adição ao primeiro local de administração, uma composição contendo um vetor viral transportando um transgene é administrada a outro local que pode ser contralateral ou ipsilateral ao primeiro local de administração. Injeções podem ser simples ou múltiplas, unilaterais ou bilaterais.

Preparações de AAV de alta titulação podem ser produzidas usando-se técnicas conhecidas na técnica, por exemplo, conforme descrito na Patente dos Estados Unidos N° 5.658.776 e *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Humana Press, 2003.

Os exemplos seguintes proporcionam concretizações ilustrativas da invenção. Um técnico versado na técnica reconhecerá as numerosas modificações e variações que podem ser realizadas sem alterar o espírito ou escopo da presente invenção. Tais modificações e variações estão envolvidas dentro do escopo da invenção. Os exemplos, de qualquer modo, não limitam a invenção.

EXEMPLOS

20 Titulação de Vetores Recombinantes

Titulações de vetor AAV são medidas de acordo com o número de cópia de genoma (partículas de genoma por mililitro). As concentrações de partícula de genoma são baseadas no Taqman® PCR do DNA do vetor conforme anteriormente reportado (Clark et al. (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278).

Os vetores conduzindo um gene marcador ensaiável como a β -galactosidase (Lac Z), ou gene de proteína fluorescente verde (GFP), podem ser titulados usando-se um ensaio de infectividade. Células susceptíveis (por exemplo, células HeLa ou COS) são transduzidas com o AAV, e um ensaio é realizado para determinar expressão de gene tal como manchamento de células transduzidas por vetor de β -galactosidase com X-gal (5-bromo-4cloro-3-indolil- β -galactosidase), ou microscopia de fluorescência para célu-

las transduzidas por GFP. Por exemplo, o ensaio é realizado conforme segue: 4×10^4 células HeLa são colocadas em cada uma de uma placa de cultura de 24 cavidades usando-se meio de crescimento normal. Após fixação, isto é, cerca de 24 horas mais tarde, as células são infectadas com Ad tipo 5 em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10, e transduzidas com diluições em série do vetor acondicionado, e incubadas a 37°C . Um a três dias mais tarde, antes dos efeitos citopáticos extensivos serem observados, o ensaio apropriado é realizado nas células (por exemplo, manchamento com X-gal, ou microscopia de fluorescência). Se um gene informante, tal como β -galactosidase é usado, as células são fixadas em 2% de paraformaldeído, 0,5% de glutaraldeído, e manchadas para atividade de β -galactosidase usando-se X-gal. As diluições do vetor que são células bem separadas são contadas. Cada célula positiva representa 1 unidade de transdução (tu) de vetor.

Modelo Terapeuticamente Relevante de Esclerose Lateral Amiotrófica

15 A esclerose lateral amiotrófica (ALS) é uma doença neurodegenerativa fatal que é caracterizada por uma perda seletiva de neurônios motores no córtex, haste do cérebro e medula espinhal. A progressão da doença pode conduzir a atrofia de membro, músculos axiais e respiratórios. A morte da célula de neurônio motor é acompanhada por gliose reativa, anormalidades de neurofilamento, e uma perda significativa de fibras mielinadas grandes nos 20 tratos corticoespinhais e raízes ventrais¹⁻⁶. Embora a etiologia de ALS seja pobremente compreendida, o acúmulo de evidência indica que ALS esporádica (SALS) e familiar (FALS) compartilham muitas características patológicas similares, proporcionando, desse modo, uma esperança que o estudo de qualquer forma conduzirá a um tratamento comum⁷. FALS monta em aproximadamente 10% dos casos diagnosticados, dos quais 20% estão associados com mutações predominantemente inerentes em Cu/Zn superóxido dismutase (SOD1)⁸. Os camundongos transgênicos que expressam a proteína SOD1 humana mutante (por exemplo, camundongos SOD1^{G93A}) recapitulam muitas 25 características patológicas de ALS, e são um modelo de animal disponível para estudar ALS⁹. Para SALS, uma miríade de mecanismos patológicos implica como a causa essencial, incluindo citotoxicidade induzida por glutamato,

exposição à toxina, disfunção de proteasome, dano mitocondrial, desorganização de neurofilamento, e perda de suporte neurotrófico^{10,11}.

Até aqui não existe terapia efetiva para o tratamento de ALS. Fatores neurotróficos, tais como fator 1 de crescimento de insulina (IGF-1), foram investigados extensivamente por sua utilidade no tratamento de ALS. Distribuição intracranial de vetores virais às regiões do SNC que estão interligadas com haste do cérebro e neurônios motores espinhais, via o SNC, proporciona um meio de administrar terapêuticos potenciais, tais como IGF-1, às áreas que, de outro modo, seriam difíceis de alvejar através dos meios da técnica anterior.

Sem estar limitado pela teoria, IGF-1 é uma proteína terapêutica para o tratamento de ALS devido as suas muitas ações em níveis diferentes de neuraxis (ver, Dore et al., Trends Neurosci, 1997, 20:326-331). No cérebro: É considerado reduzir ambas apoptose neuronal e glial, proteger neurônios contra toxicidade induzida por ferro, colchicina, desestabilizadores de cálcio, peróxidos, e citocinas. É também considerado modular a liberação de neurotransmissores acetilcolina e glutamato. É também considerado induzir a expressão de neurofilamento, tublin e proteína básica mielin. Na medula espinhal: IGF-1 é considerada modular atividade de ChAT e atenuar perda de fenótipo colinérgico, aumentar o crescimento de neurônio motor, aumentar mielinização, inibir demielinação, estimular proliferação de neurônio motor e diferenciação de células precursoras, e promover divisão de célula de Schwann, maturação e crescimento no músculo: IGF-1 é considerado induzir formação de grupo de receptor acetilcolina na junção neuromuscular, e aumentar função neuromuscular e resistência de músculo. Nos seguintes experimentos, a forma de IGF-1Ea da proteína foi utilizada.

Exemplo 1: Distribuição intracerebroventricular de AAV4-IGF-1

Foram conduzidos experimentos para determinar se distribuição intraventricular de AAV4-IGF-1 conduz a (1) extensão significativa de vida breve; (2) desempenho aperfeiçoado nas tarefas de resistência de **rotarod** e agarre; e (3) neuropatologia reduzida (isto é, alívio na gliose e sobrevivência de neurônio motor aperfeiçoada) na haste do cérebro e medula espinhal.

Camundongos SOD1 sintomáticos (isto é, 90 dias de idade) foram tratados ou com vetor de controle AAV4-IGF-1 ou AAV4-Bgal (Bgal é também referido como Lac Z). Para cada camundongo, vetores foram injetados em ambos o ventrículo lateral (A-P: -.3 de bregma, M-L-1.0 de bregma, D-V:-2.0 de dura, barra incisora:0.0) e o 4° ventrículo (A-P: -5.90 de bregma, M-L:0.0 de bregma, D-V:-2.9 de dura, barra incisora:0.0) usando-se uma estrutura estereotáxica. Os vetores foram distribuídos com uma seringa Hamilton de 10 µl a uma taxa de 0,5 µl/minuto por um total de $1,80 \times 10^{10}$ cópias de genoma por ventrículo. O volume de injeção final foi 10 µl/ventrículo. Na idade de 110 dias ou no estágio final, 4 camundongos de cada grupo de tratamento foram sacrificados para manchamento de análise histológica (isto é, GFAP (proteína fibrilarmente acídica glial) e contagens de MN na haste do cérebro e medula espinhal). Os pontos finais que foram avaliados incluem análise de sobrevivência, rotarod, e testes de resistência de agarre de membro posterior de membro anterior, e massa corpórea.

Teste de função motora usando um dispositivo de rotarod e Medidor de Resistência de Agarre (Columbus Instruments, Columbus, OH) pode começar em 70 dias de idade. Cada seção semanal pode consistir em três ensaios no começo de rotarod de aceleração elevada a 5 rpm/min. O tempo que cada camundongo permanece na haste pode ser registrado automaticamente. O teste de medição de resistência de agarre pode ser realizado permitindo-se que os animais se agarrem a uma plataforma, seguido pelo puxamento do animal até que ele se libere da plataforma: a medição da força é registrada em quatro ensaios separados. O começo de fraqueza relacionada à doença é definido quando um membro posterior revela fraqueza muscular e arraste do membro no rotarod, conforme avaliado por dois observadores independentes. Para determinar a mortalidade em um modo seguro e humano, foi usado um ponto final artificial definido pela incapacidade de camundongos corrigi-lo 30 segundos após serem colocados em suas laterais.

A distribuição intracerebroventricular de AAV4-IGF-1 resultou em uma extensão significativa de vida breve em camundongos SOD1 conforme comparado a camundongos que receberam AAV4-Bgal como um vetor de

controle. Os camundongos que recebem AAV4-IGF-1 tinham um tempo de sobrevivência médio de 141,5 dias conforme comparados a um tempo de sobrevivência médio de 121 dias em camundongos tratados com AAV4-Bgal (Figura 1). Camundongos SOD1 tratados com AAV4-IGF-1 tinham efeitos funcionais aperfeiçoados conforme medidos por teste de Rotarod, resistência de agarre de membro anterior, e resistência de agarre de membro posterior, conforme comparados a camundongos tratados de controle. Os resultados são mostrados nas Figuras 1-5.

5 A avaliação histológica de GFAP, que é um marcador de gliose e uma marca patológica de ALS, demonstra que astrogliose foi significante-
10 mente reduzida em camundongos tratados com AAV4-IGF1 conforme com-
parados a camundongos de controle tratados com AAV4-Bgal. Esta redução
foi observada em ambas a região de haste do cérebro do SNC (por exemplo,
núcleo trigeminal, núcleo facial, núcleo hipoglossal; Figura 6), e a medula
15 espinhal ventral (por exemplo, cervical, torácica, lombar, sacral; Figura 7).

A avaliação histológica de níveis de nitrotirosina, que é um mar-
cador de peroxinitrito e um marcador patológico associado com ALS, de-
monstrou que níveis de nitrotirosina foram significante-
mente reduzidos em camundongos tratados com AAV4-IGF1 conforme comparados a camun-
20 dongos de controle com AAV4-Bgal. Esta redução nos níveis de nitrotirosina
foi observada através de toda medula espinhal, por exemplo, regiões cervi-
cal, torácica, lombar e sacral (Figura 8).

Exemplo 2: Distribuição intracerebroventricular de AAV4-IGF-1 e AAV4-GFP

Camundongos SOD1 sintomáticos (isto é, 88-90 dias de idade)
25 foram tratados, ou com vetor AAV4-IGF-1, ou AAV4-GFP, via injeção intra-
cerebroventricular do vetor em ambos o ventrículo lateral e o 4° ventrículo.
Os camundongos receberam uma dose de 2 e 10 gc/ventrículo. Proteína
fluorescente verde foi utilizada como uma proteína de controle, que capaci-
tou a visualização de expressão mediada pela injeção dos vetores AAV.

30 Os pontos finais avaliados incluíram sobrevivência, teste de rota-
rod, resistência de agarre (membro posterior e membro anterior), contagens
de célula de neurônio motor, distribuição de proteína GFP, níveis de proteína

fibrilarmente acídica glial (GFAP), níveis de nitrotirosina, e RT-PCR para medir distribuição viral dentro do SNC. Em uma idade de 110 dias ou no estágio final, camundongos de cada grupo de tratamento foram sacrificados para análise adicional. Os níveis de proteína fibrilarmente acídica glial (GFAP) foram avaliados histologicamente. GFAP é um marcador de gliose, que é uma marca patológica de ALS. Os níveis de nitrotirosina foram avaliados histologicamente; nitrotirosina é um marcador de peroxinitrila.

A distribuição intracerebroventricular de AAV4-IGF-1 resultou em uma extensão significativa de vida breve em camundongos SOD1 conforme comparado a camundongos que receberam AAV4-GFP como um vetor de controle. Os camundongos SOD1 tratados com AAV4-IGF-1 tinham efeitos funcionais aperfeiçoados conforme medidos por teste de Rotarod, resistência de agarre de membro anterior, e resistência de agarre de membro posterior, conforme comparados a camundongos tratados de controle.

A visualização de expressão de proteína fluorescente verde (GFP) em camundongos que tinham sido tratados com AAV4-GFP indicou que GFP foi distribuído através de toda camada de célula endotelial do sistema ventricular. Por exemplo, GFP foi visualizado nos ventrículos laterais anteriores, nos ventrículos laterais, e no quarto ventrículo (Figura 9). GFP foi também visualizado no plexo coróide do sistema ventricular e na camada de célula endotelial do canal central da medula espinhal (incluindo as regiões cervicais, torácicas e lombares) (Figura 10).

RT-PCR para o vetor AAV4-IGF-1 demonstrou que o vetor estava presente no córtex, haste do cérebro, e medula espinhal, seguindo distribuição intraventricular (Figura 11A).

Exemplo 3: Distribuição intracerebroventricular de AAV4-VEGF e AAV4-GFP

Camundongos SOD1 sintomáticos (isto é, 88-90 dias de idade) foram tratados, ou com vetor AAV4-VEGF-165, ou AAV4-GFP, via injeção intracerebroventricular do vetor em ambos o ventrículo lateral e o 4° ventrículo. Os camundongos receberam uma dose de 2 e 10 gc/ventrículo. Proteína fluorescente verde foi utilizada como uma proteína de controle, que capacitou a visualização de expressão mediada pela injeção dos vetores AAV.

Os pontos finais avaliados incluíram sobrevivência, teste de **rotarod**, resistência de agarre (**membro posterior** e membro anterior), e RT-PCR, para medir distribuição viral dentro do SNC.

5 A distribuição intracerebroventricular de AAV4-VEGF resultou em uma extensão significativa de vida breve em camundongos SOD1 conforme comparado a camundongos que receberam AAV4-GFP como um vetor de controle. Os tempos de sobrevivência médios para camundongos que receberam AAV4-VEGF foi 140 dias, pelo que os tempos de sobrevivência médios para camundongos que receberam AAV4-GFP foi 120 dias (Figura
10 12).

Os camundongos SOD1 tratados com AAV4-VEGF tinham efeitos funcionais aperfeiçoados conforme medidos por teste de **Rotarod**, resistência de agarre de membro anterior, e resistência de agarre de **membro posterior**, conforme comparados a camundongos tratados de controle.

15 A distribuição intraventricular de AAV4-VEGF não influenciou a massa corpórea nos camundongos SOD1.

RT-PCR para o vetor AAV4-IGF-1 demonstrou que o vetor estava presente no córtex, haste do cérebro, e medula espinhal, seguindo distribuição intraventricular (Figura 11B).

20 O relatório descritivo é mais totalmente compreendido à luz dos ensinamentos das referências citadas dentro do relatório descritivo. As concretizações dentro do relatório descritivo proporcionam uma ilustração de concretizações da invenção, e não devem ser construídas para limitar o escopo da invenção. O técnico no assunto reconhecerá prontamente que muitas outras concretizações estão envolvidas pela invenção. Todas as publica-
25 ções, patentes e sequências biológicas citadas nesta descrição são incorporadas por referência em sua totalidade. Para a extensão que o material incorporado por referência contradiz ou é consistente com o presente relatório descritivo, o presente relatório descritivo concederá qualquer tal material. A
30 citação de quaisquer referências aqui não é uma admissão que tais referências são técnica anterior a presente invenção.

A menos que de outro modo indicado, todos os números que

expressam quantidades de ingredientes, cultura de célula, condições de tratamento, e assim por diante no relatório descritivo, incluindo reivindicações, são para serem compreendidos como sendo modificados em todos os exemplos pelo termo "cerca de". Conseqüentemente, a menos que de outro modo indicado ao contrário, os parâmetros numéricos são aproximações, e podem depender muito das propriedades desejadas imaginadas para serem obtidas pela presente invenção. A menos que de outro modo indicado, o termo "pelo menos" que precede uma série de elementos é para ser compreendido para se referir a todo elemento na série. Aqueles técnicos no assunto reconhecerão, ou serão capazes de determinar usando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes às concretizações específicas da invenção aqui descrita. Tais equivalentes são pretendidos para serem envolvidos pelas reivindicações que se seguem.

15 Tabela 1: Pares de gene potenciais para uso em um vetor viral recombinante

Gene	IGF-1	calbindin D28	Parvalbumin	HIFI-alfa	SIRT-2	CNTF
IGF-1		X	X	X	X	X
calbindin D28	X		X	X	X	X
parvalbumin	X	X		X	X	X
HIFI-alfa	X	X	X		X	X
SIRT-2	X	X	X	X		X
VEGF	X	X	X	X	X	X
SMN-1	X	X	X	X	X	X
SMN-2	X	X	X	X	X	X
CNTF	X	X	X	X	X	
shh	X	X	X	X	X	X
EPO	X	X	X	X	X	X
LOX	X	X	X	X	X	X
progranulin	X	X	X	X	X	X
prolactin	X	X	X	X	X	X
placenta lactogen	X	X	X	X	X	X
ghrelin	X	X	X	X	X	X
angiogenin	X	X	X	X	X	X
neuroserpin	X	X	X	X	X	X

Tabela 2: Pares de gene potenciais para uso em um vetor viral recombinante

Gene	progranulin	prolactin	placenta lactogen	ghrelin	Angiogenin
IGF-1	X	X	X	X	X
calbindinin D28	X	X	X	X	X
parvalbumin	X	X	X	X	X
HIFI-alfa	X	X	X	X	X
SIRT-2	X	X	X	X	X
VEGF	X	X	X	X	X
SMN-1	X	X	X	X	X
SMN-2	X	X	X	X	X
CNTF	X	X	X	X	X
Shh	X	X	X	X	X
EPO	X	X	X	X	X
LOX	X	X	X	X	X
progranulin		X	X	X	X
prolactin	X		X	X	X
placenta lactogen	X	X		X	X
ghrelin	X	X	X		X
angiogenin	X	X	X	X	
neuroserpin	X	X	X	X	X

Tabela 3: Pares de gene potenciais para uso em um vetor viral recombinante

Gene	shh	EPO	LOX	VEGF	SMN1	SMN-2	Neuroserpin
IGF-1		X	X	X	X	X	X
calbindinin D28	X		X	X	X	X	X
parvalbumin	X	X		X	X	X	X
HIFI-alfa	X	X	X		X	X	X
SIRT-2	X	X	X	X		X	X
VEGF	X	X	X		X	X	X
SMN-1	X	X	X	X		X	X
SMN-2	X	X	X	X	X		X
CNTF	X	X	X	X	X		X
shh		X	X	X	X	X	X
EPO	X		X	X	X	X	X
LOX	X	X		X	X	X	X
progranulin	X	X	X	X	X	X	X
prolactin	X	X	X	X	X	X	X
placenta lactogen	X	X	X	X	X	X	X
ghrelin	X	X	X	X	X	X	X
angiogenin	X	X	X	X	X	X	X
neuroserpin	X	X	X	X	X	X	

Listagem de Referências

1. Leigh, P.N. & Swash, M. Cytoskeletal pathology in motor neuron diseases. *Adv Neurol* 56, 115-24 (1991).
2. Carpenter, S. Proximal axonal enlargement in motor neuron disease *Neurology* 18 841-51 (1968).
3. Gonatas, N.K. et al. Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 140, 731-7 (1992).
4. Hirano, A. et al. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 43, 471-80 (1984).
5. Leigh, P.N. et al. Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity. *Brain* 114 (Pt 2), 775-88 (1991).
6. Delisle, M.B. & Carpenter, S. Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 63, 241-50 (1984).
7. Hirano, A. Neuropathology of ALS: an overview. *Neurology* 47, S63-6 (1996).
8. Rosen, D.R. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59-62 (1993).
9. Gurney, M.E. et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772-5 (1994).
10. Rowland, L.P. & Shneider, N.A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344, 1688-700 (2001).
11. Bruijn, L.I., Miller, T.M. & Cleveland, D.W. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27, 723-49 (2004).
12. Cleveland, D.W. & Rothstein, J.D. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2, 806-19 (2001).
13. Lindsay, R.M. Neurotrophic growth factors and neurodegenerative diseases: therapeutic potential of the neurotrophins and ciliary neurotrophic factor. *Neurobiol Aging* 15, 249-51 (1994).
14. Kaspar, B.K., Llado, J., Sherkat, N., Rothstein, J.D. & Gage, F.H. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 301, 839-42 (2003).
15. Clement, A.M. et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302, 113-7 (2003).
16. Matsushita, M. Projections from the lowest lumbar and sacral-caudal segments to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* 404, 21-32 (1999).
17. Matsushita, M. & Gao, X. Projections from the thoracic cord to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* 386, 409-21 (1997).
18. Matsushita, M. & Xiong, G. Projections from the cervical enlargement to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* 377, 251-61 (1997).
19. Matsushita, M. & Yaginuma, H. Afferents to the cerebellar nuclei from the cervical enlargement in the rat, as demonstrated with the Phaseolus vulgaris leucoagglutinin method. *Neurosci Lett* 113, 253-9 (1990).
20. Matsushita, M. & Yaginuma, H. Projections from the central cervical nucleus to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* 353, 234-46 (1995).

21. Voogd, J. The cerebellar nuclei and their efferent pathways. in *The rat nervous system* (ed. Paxinos, G.) 208-215 (Elsevier Academic Press, San Diego, 2004).
22. Dodge, J.C. et al. Gene transfer of human acid sphingomyelinase corrects neuropathology and motor deficits in a mouse model of Niemann-Pick type A disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 17822-7 (2005).
23. Corse, A.M. et al. Preclinical testing of neuroprotective neurotrophic factors in a model of chronic motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis* **6**, 335-46 (1999).
24. Seeburger, J.L. & Springer, J.E. Experimental rationale for the therapeutic use of neurotrophins in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* **124**, 64-72 (1993).
25. Kasarskis, E.J. et al. A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). *Neurology* **52**, 1427-33 (1999).
26. Miller, R.G. et al. A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann Neurol* **39**, 256-60 (1996).
27. Borasio, G.D. et al. A placebo-controlled trial of insulin-like growth factor-I in amyotrophic lateral sclerosis. European ALS/IGF-I Study Group. *Neurology* **51**, 583-6 (1998).
28. Lai, E.C. et al. Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on progression of ALS. A placebo-controlled study. The North America ALS/IGF-I Study Group. *Neurology* **49**, 1621-30 (1997).
29. Gorio, A., Lesma, E., Madaschi, L. & Di Giulio, A.M. Co-administration of IGF-I and glycosaminoglycans greatly delays motor neurone disease and affects IGF-I expression in the wobbler mouse: a long-term study. *J Neurochem* **81**, 194-202 (2002).
30. Hantai, D. et al. Beneficial effects of insulin-like growth factor-I on wobbler mouse motoneuron disease. *J Neurol Sci* **129 Suppl**, 122-6 (1995).
31. Zheng, C., Nennesmo, I., Fadeel, B. & Hentzer, J.I. Vascular endothelial growth factor prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol* **56**, 564-7 (2004).
32. Nagano, I. et al. Therapeutic benefit of intrathecal injection of insulin-like growth factor-I in a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci* **235**, 61-8 (2005).
33. Azzouz, M. et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* **429**, 413-7 (2004).
34. Federici, T. & Boulis, N.M. Gene-based treatment of motor neuron diseases. *Muscle Nerve* **33**, 302-23 (2006).
35. Boillee, S. & Cleveland, D.W. Gene therapy for ALS delivers. *Trends Neurosci* **27**, 235-8 (2004).
36. Chirmule, N. et al. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* **6**, 1574-83 (1999).
37. High, K.A. Clinical gene transfer studies for hemophilia B. *Semin Thromb Hemost* **30**, 257-67 (2004).
38. Maheshri, N., Koerber, J.T., Kaspar, B.K. & Schaffer, D.V. Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors. *Nat Biotechnol* **24**, 198-204 (2006).
39. Braunstein GD, Razor JL, Engvall E, Wade ME. Interrelationships of human chorionic gonadotropin, human placental lactogen, and pregnancy-specific beta 1-glycoprotein throughout normal human gestation. *Am J Obstet Gynecol*. 1980 Dec 15;138(8):1205-13.

40. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P, Moreau T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. N Engl J Med.* 1998 Jul 30;339(5):285-91.
41. Carson M. J., Behringer R. R., Brinster R. L. and McMorris F. A. (1993) Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron* 10, 729–740.
42. Gensert JM, Goldman JE (1997) Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS. *Neuron* 19:197–203.
43. Gregg C, Shikar V, Larsen P, Mak G, Chojnacki A, Yong VW, Weiss S. White matter plasticity and enhanced remyelination in the maternal CNS. *J Neurosci.* 2007 Feb 21;27(8):1812-23.
44. Handwerker S, Freemark M. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000 Apr;13(4):343-56.
45. Lesniak MA, Gorden P, Roth J. Reactivity of non-primate growth hormones and prolactins with human growth hormone receptors on cultured human lymphocytes. *Clin Endocrinol Metab.* 1977 May;44(5):838-49.
46. Levison SW, Young GM, Goldman JE (1999) Cycling cells in the adult rat neocortex preferentially generate oligodendroglia. *J Neurosci Res* 57:435– 446.
47. Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A (2006) Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26:7907–7918.
48. Pelton EW, Grindeland RE, Young E, Bass NH. Effects of immunologically induced growth hormone deficiency on myelinogenesis in developing rat cerebrum. *Neurology.* 1977 Mar;27(3):282-8.
49. Peters A, Sethares C (2004) Oligodendrocytes, their progenitors and other neuroglial cells in the aging primate cerebral cortex. *Cereb Cortex* 14:995–1007.
50. Polito A, Reynolds R (2005) NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat* 207:707–716.
51. Selenkow HA, Saxena BN, Dana CL. Measurement and pathophysiologic significance of human placental lactogen. In Pecile A, Finzi C (eds). *The Feto-Placental Unit.* Amsterdam, Excerpta Medica, 1969, p340.
52. van Walderveen MA, Tas MW, Barkhof F, Polman CH, Frequin ST, Hommes OR, Valk J (1994) Magnetic resonance evaluation of disease activity during pregnancy in multiple sclerosis. *Neurology* 44:327–329.
53. Voskuhl RR (2003) Hormone-based therapies in MS. *Int MS J* 10:60–66.
54. Zumkeller W. Current topic: the role of growth hormone and insulin-like growth factors for placental growth and development. *Placenta.* 2000 Jul-Aug;21(5-6):451-67.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para distribuir um produto transgene à medula espinal em um indivíduo, compreendendo:

5 administrar um vetor viral neurotrófico recombinante compreendendo referido transgene a pelo menos um ventrículo do cérebro, pelo que referido transgene é expresso, e o produto de proteína expresso é distribuído à medula espinal.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, no qual o vetor viral é um vetor AAV.

10 3. Método, de acordo com a reivindicação 1, no qual o vetor viral é um vetor AAV4.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, no qual o transgene é IGF-1.

15 5. Método, de acordo com a reivindicação 1, no qual o vetor viral é administrado por injeção direta em um ventrículo do cérebro.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, no qual o vetor viral é administrado por injeção direta em um ventrículo lateral do cérebro.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, no qual o vetor viral é administrado por injeção direta no quarto ventrículo do cérebro.

20 8. Método, de acordo com a reivindicação 1, no qual o indivíduo tem esclerose lateral amiotrófica.

9. Método para distribuir IGF-1 à medula espinal em um indivíduo tendo esclerose lateral amiotrófica, compreendendo:

25 administrar um vetor viral AAV4 recombinante compreendendo um transgene que codifica IGF-1 a pelo menos um ventrículo do cérebro selecionado a partir do grupo consistindo em um ventrículo lateral e o quarto ventrículo, pelo que referido transgene é expresso, e IGF-1 é distribuído à medula espinal.

30 10. Método para tratar um enfermidade neuro motora em um indivíduo, compreendendo:

administrar um vetor viral neurotrófico recombinante compreendendo um transgene terapêutico a pelo menos um ventrículo do cérebro,

pelo que referido transgene em uma quantidade terapeuticamente efetiva.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, no qual o vetor viral é um vetor AAV.

5 12. Método, de acordo com a reivindicação 10, no qual o vetor viral é um vetor AAV4.

13. Método, de acordo com a reivindicação 10, no qual o transgene é IGF-1.

14. Método, de acordo com a reivindicação 10, no qual o vetor viral é administrado por injeção direta em um ventrículo do cérebro.

10 15. Método, de acordo com a reivindicação 10, no qual o vetor viral é administrado por injeção direta em um ventrículo lateral do cérebro.

16. Método, de acordo com a reivindicação 10, no qual o vetor viral é administrado por injeção direta no quarto ventrículo do cérebro.

15 17. Método, de acordo com a reivindicação 10, no qual o indivíduo tem esclerose lateral amiotrófica.

18. Método para tratar esclerose lateral amiotrófica em um indivíduo, compreendendo administrar um vetor viral AAV4 recombinante compreendendo um transgene IGF-1 a pelo menos um ventrículo do cérebro selecionado a partir do grupo consistindo em um ventrículo lateral e o quarto ventrículo, pelo que referido transgene é expresso em uma quantidade terapeuticamente efetiva.

20 19. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 10, no qual referido transgene é selecionado a partir do grupo consistindo em fator-1 de crescimento de insulina (IGF-1), calbindin D28, parvalbumin, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2, CNTF (Fator neurotrófico ciliar), ouriço sônico (shh), eritropoietin (EPO), lisil oxidase (LOX), progranulin, prolactin, ghrelin, neuroserpin, angiogenin, e placenta lactogen.

30 20. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 10, no qual o indivíduo tem uma condição selecionada a partir do grupo consistindo em esclerose lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular bulbar espinhal, ataxia cerebelar espinhal, atrofia muscular espinhal, e dano traumático da medula espinhal.

21. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 10, no qual referido indivíduo é um mamífero.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, no qual referido mamífero é selecionado a partir do grupo consistindo em roedor, uma murina, um símio, e um ser humano.

23. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 10, no qual referido indivíduo é um paciente humano.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, no qual referido paciente humano subexpressa uma quantidade efetiva de uma proteína selecionada a partir do grupo consistindo em fator-1 de crescimento de insulina (IGF-1), calbindin D28, parvalbumin, HIF1-alfa, ouriço sônico (shh), eritropoietin (EPO), SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2 e CNTF (Fator neurotrófico ciliar).

25.

26. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 10, no qual o referido transgene expressa uma quantidade terapêutica de uma proteína selecionada a partir do grupo consistindo em fator-1 de crescimento de insulina (IGF-1), calbindin D28, parvalbumin, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2, CNTF (Fator neurotrófico ciliar), ouriço sônico (shh), eritropoietin (EPO), lisil oxidase (LOX), progranulin, prolactin, ghrelin, neuroserpin, angiogenin, e placenta lactogen.

27. Ensaio para detectar perda de função do SNC em um indivíduo compreendendo:

administrar a um ventrículo do cérebro do indivíduo uma quantidade diagnosticamente efetiva de um vetor viral neurotrófico contendo um transgene que codifica um marcador; e
triagem da presença de referido marcador no SNC de referido indivíduo.

28. Ensaio, de acordo com a reivindicação 26, no qual referido transgene de marcador é proteína fluorescente verde.

29. Método, de acordo com a reivindicação 1, 9, 10 ou 18, no qual o produto de proteína de transgene é TAT-modificado.

30. Método, de acordo com a reivindicação 28, no qual o produto de proteína de transgene compreende um motivo de 11 amino ácidos a partir

do domínio de transdução de proteína de proteína HIV TAT.

31. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 10, no qual referido transgene expressa uma quantidade terapêutica de pelo menos duas proteínas selecionadas a partir do grupo consistindo em fator-1 de crescimento de insulina (IGF-1), calbindin D28, parvalbumin, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2, CNTF (Fator neurotrófico ciliar), ouriço sônico (shh), eritropoietin (EPO), lisil oxidase (LOX), progranulin, prolactin, ghrelin, neuroserpin, angiogenin, e placenta lactogen.

FIG. 1

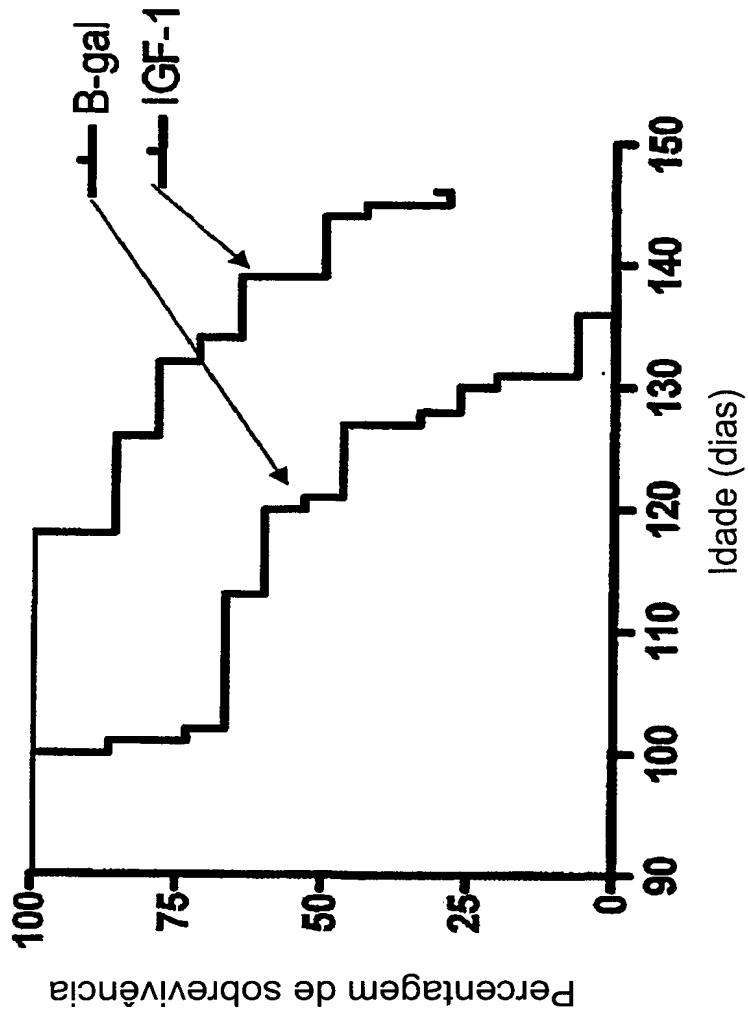


FIG. 2

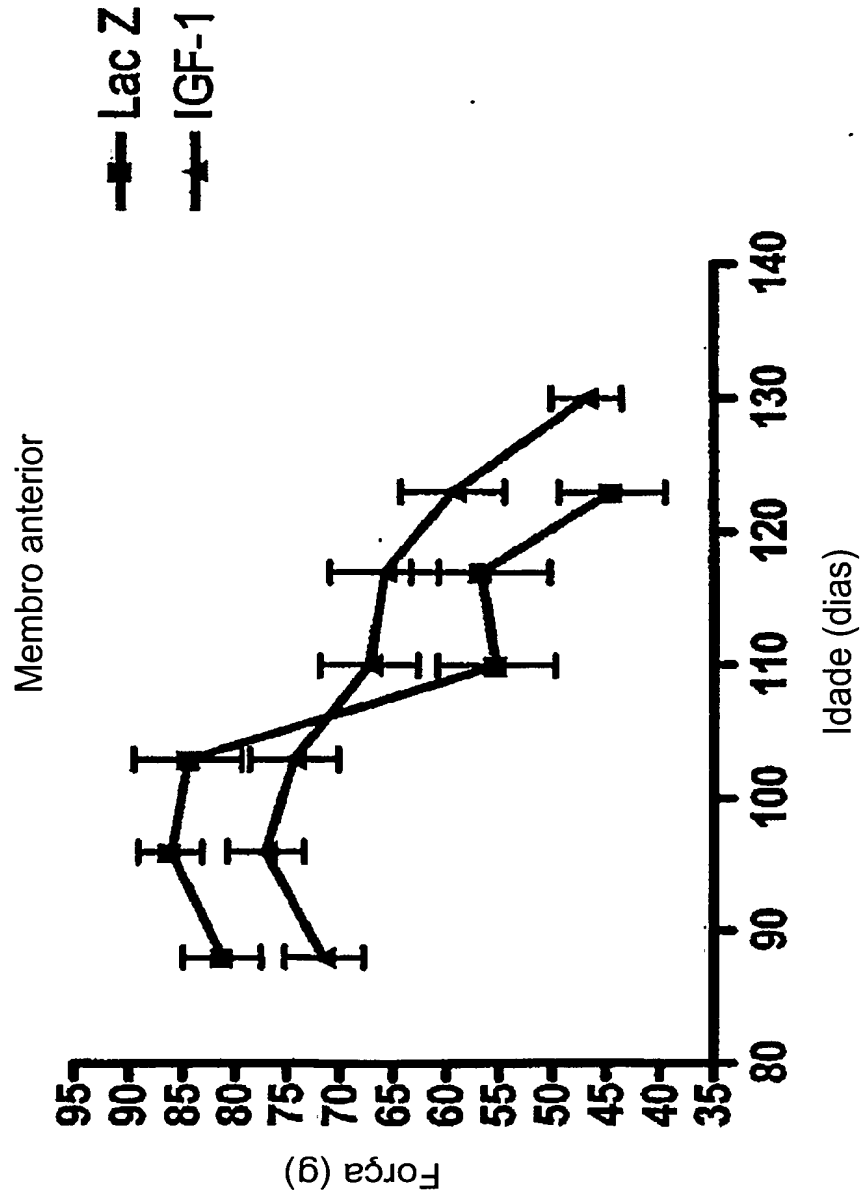


FIG. 3

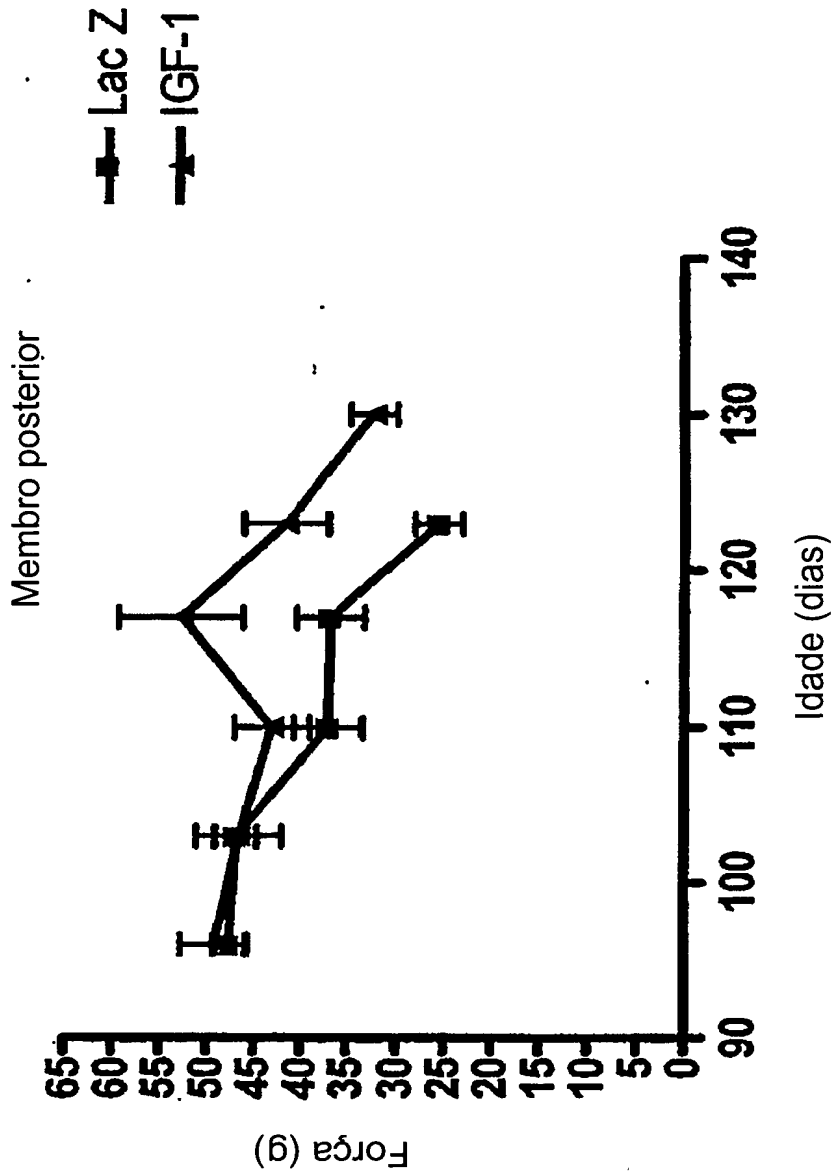


FIG. 4

Rotarod

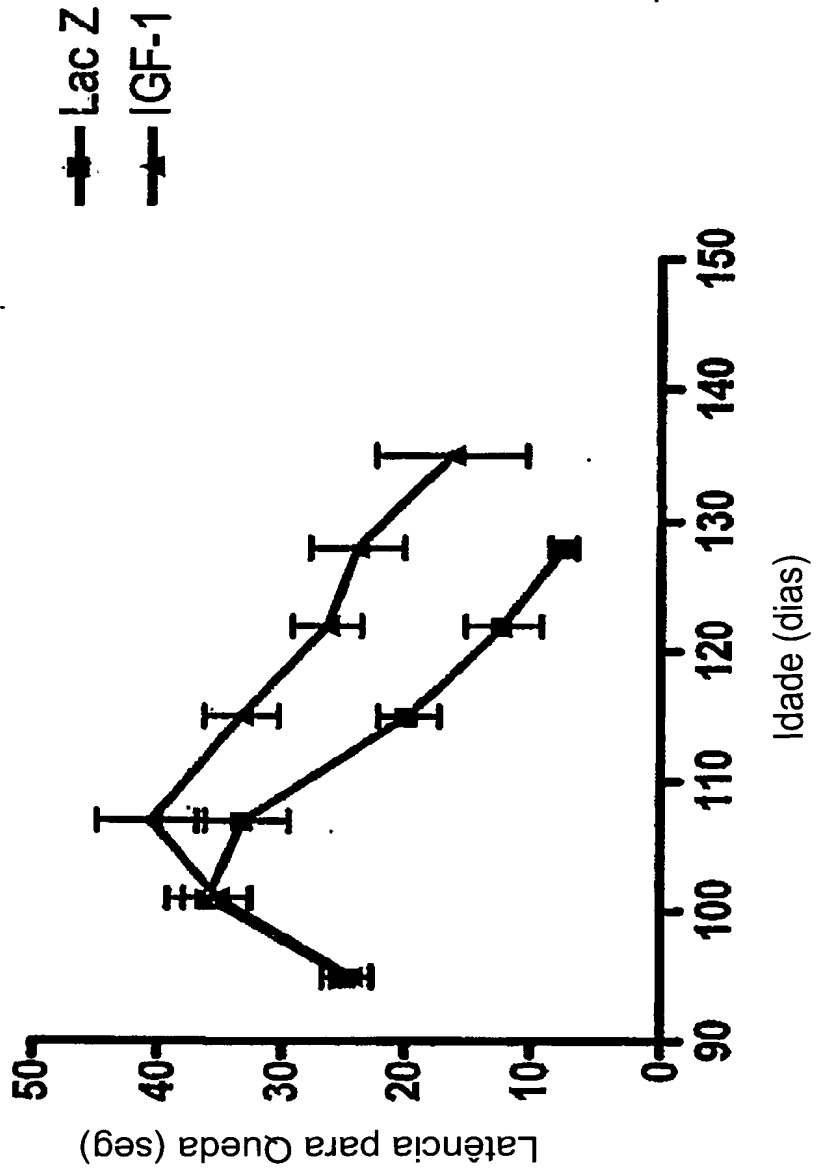


FIG. 5

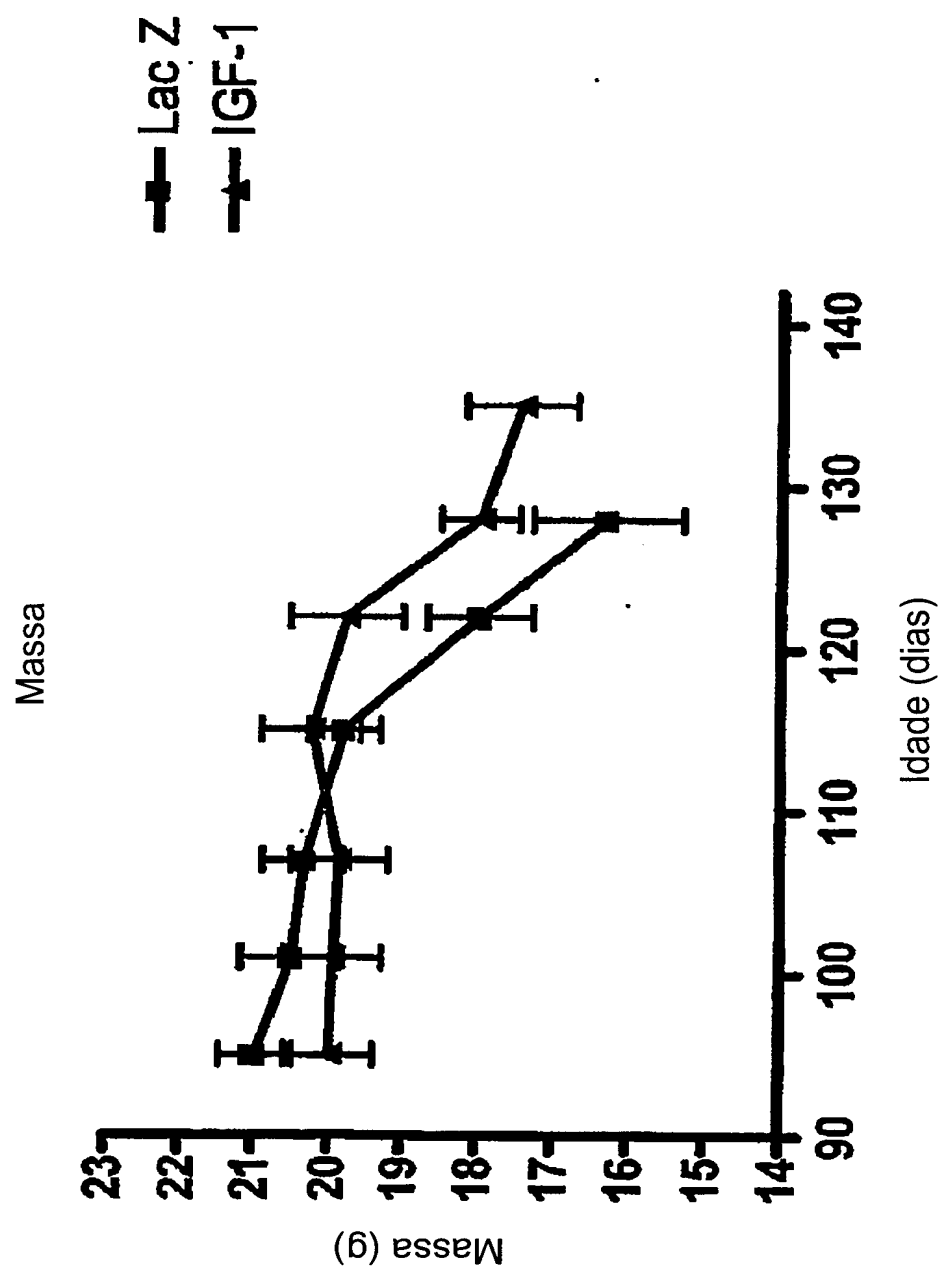


FIG. 6

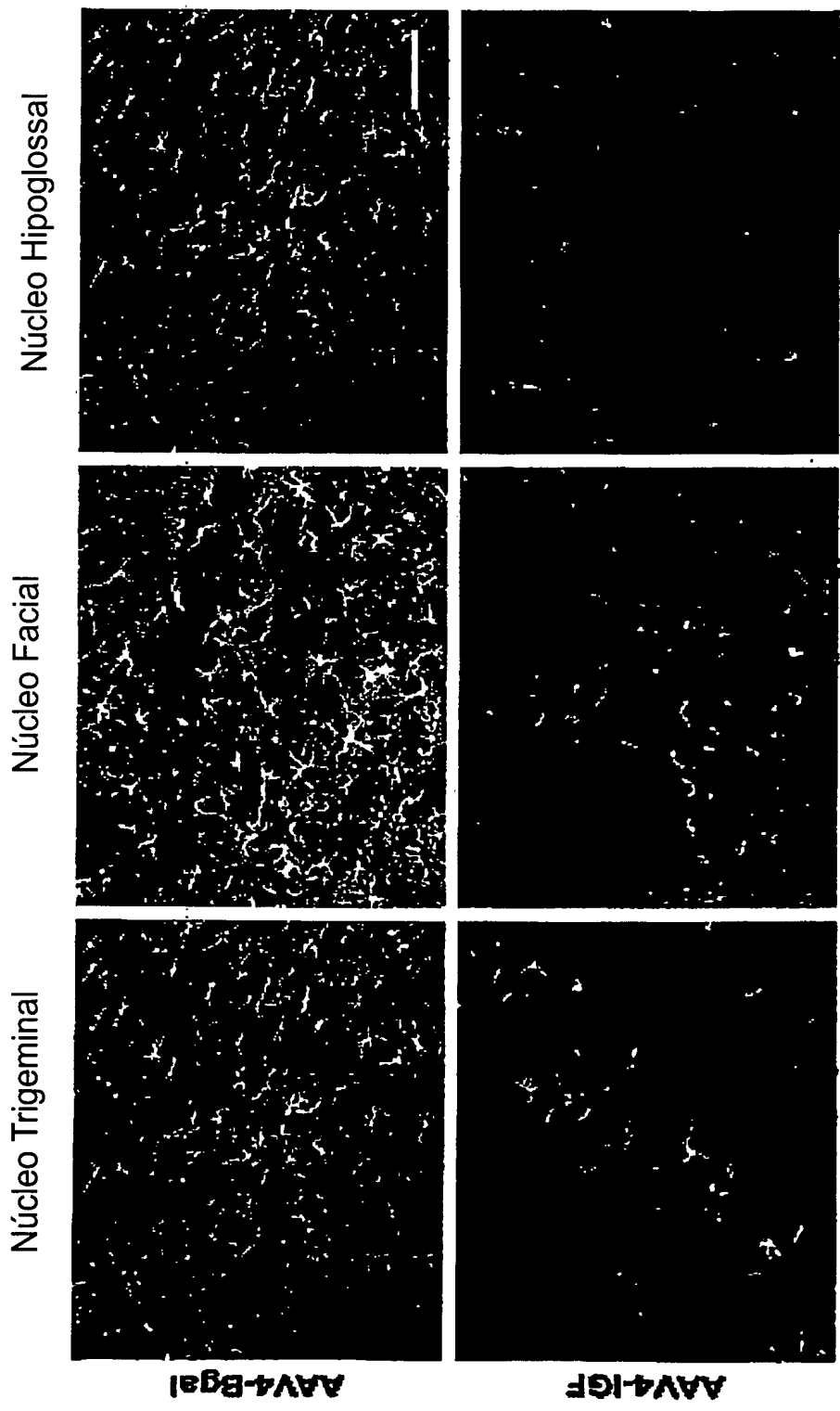


FIG. 7

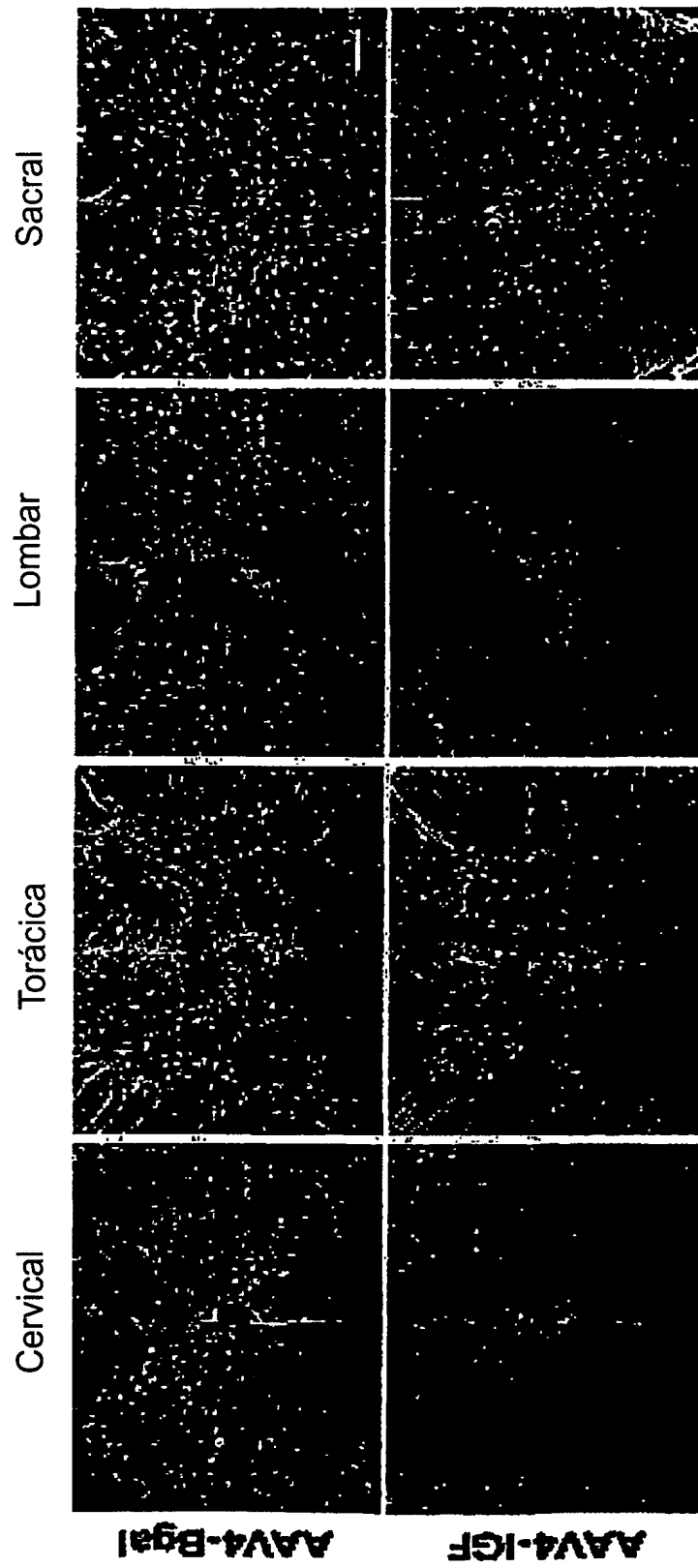


FIG. 8

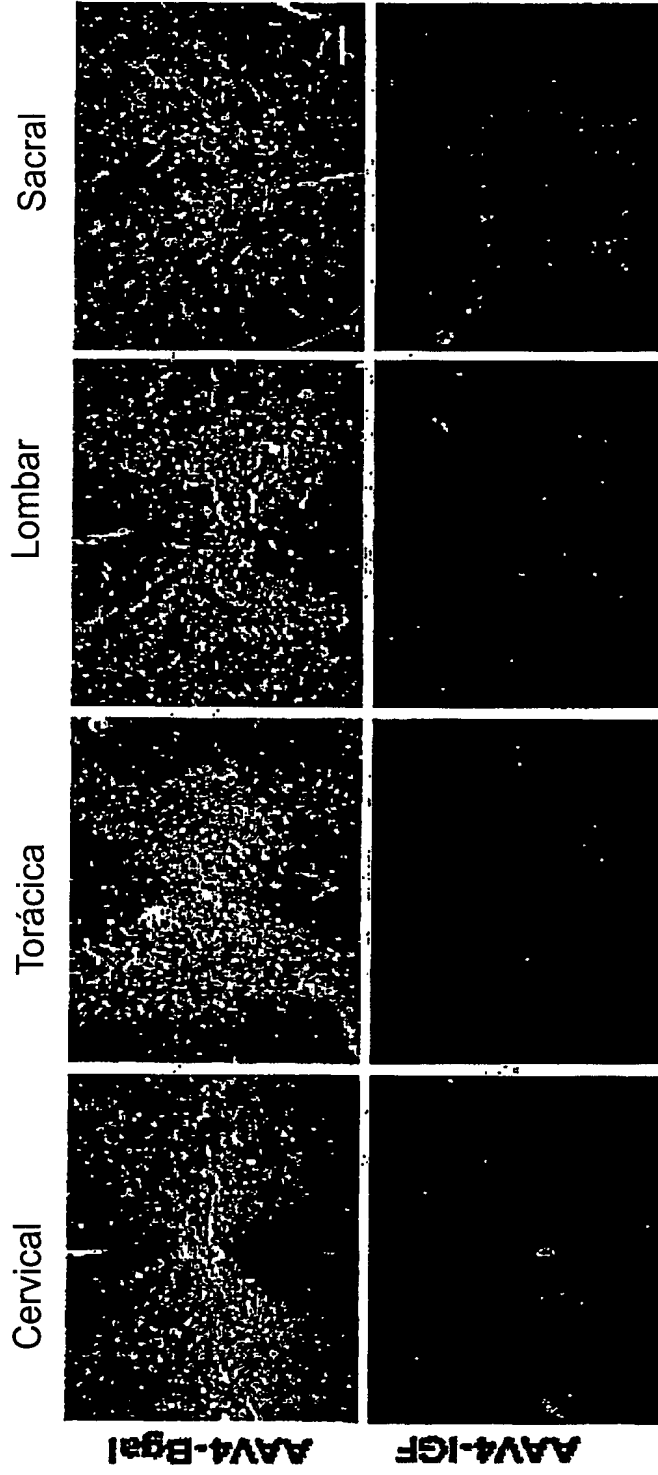


FIG. 9

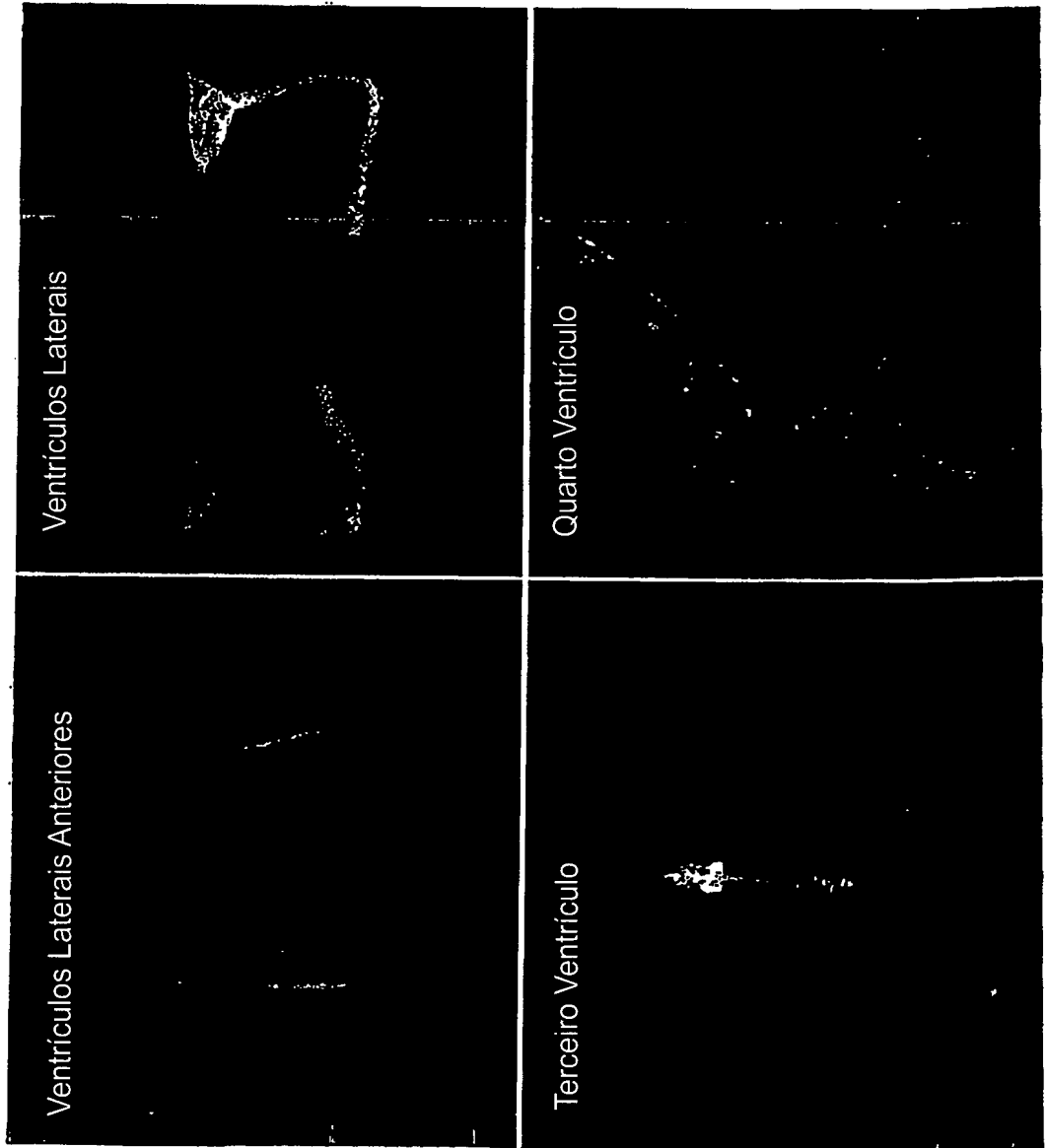


FIG. 10

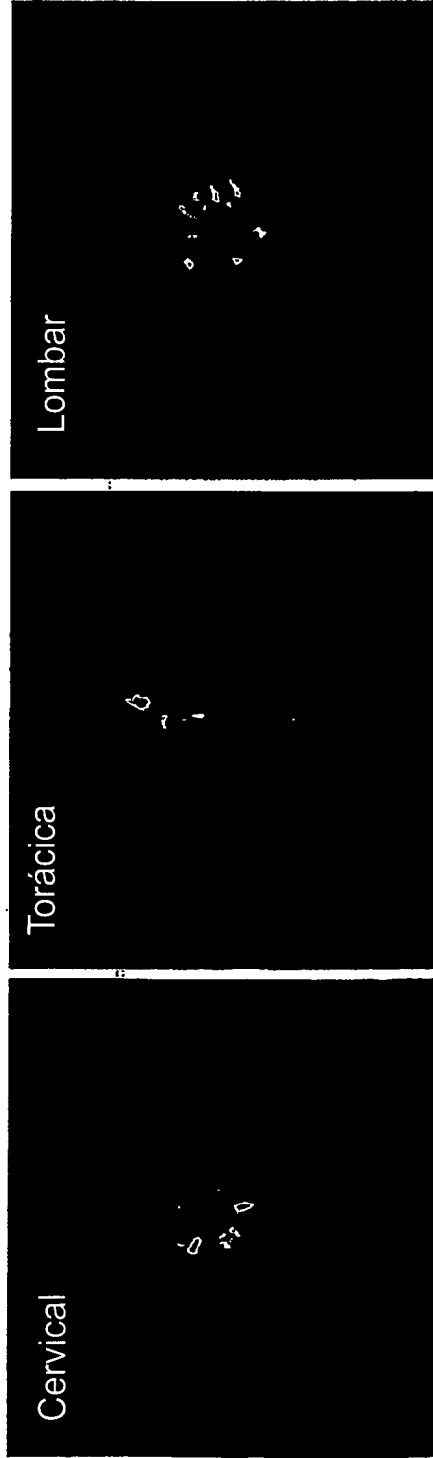


FIG. 11

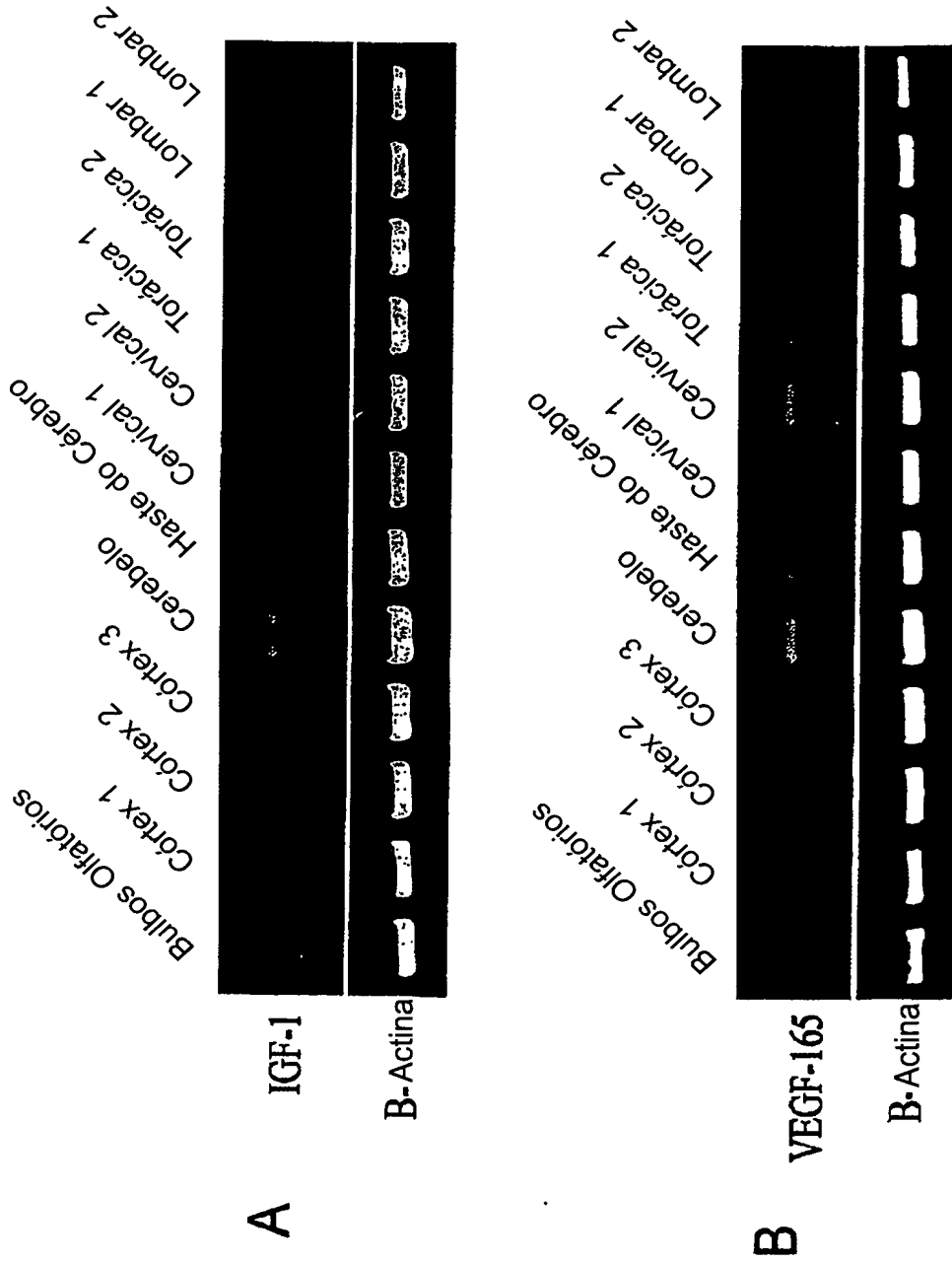


FIG. 12

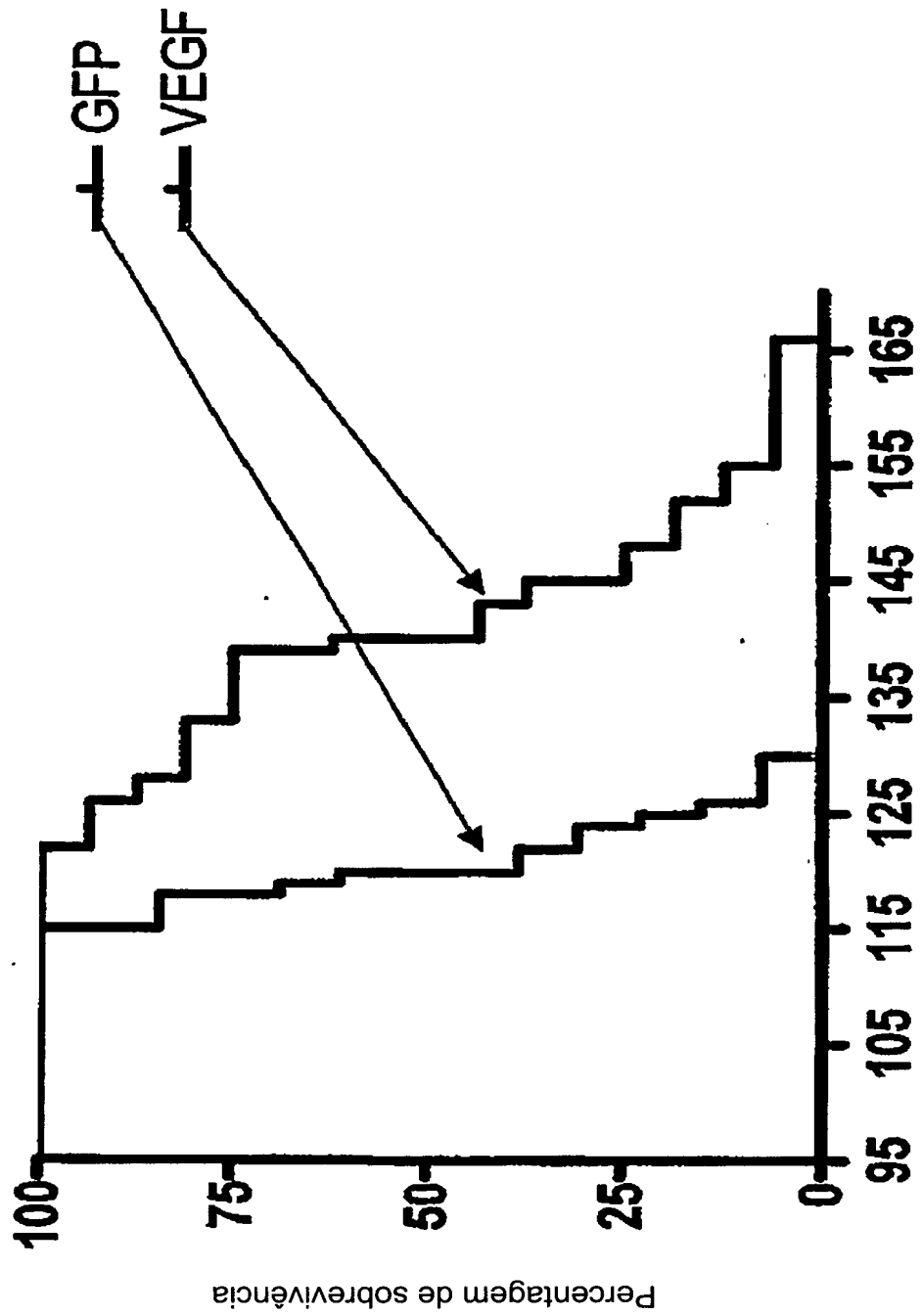
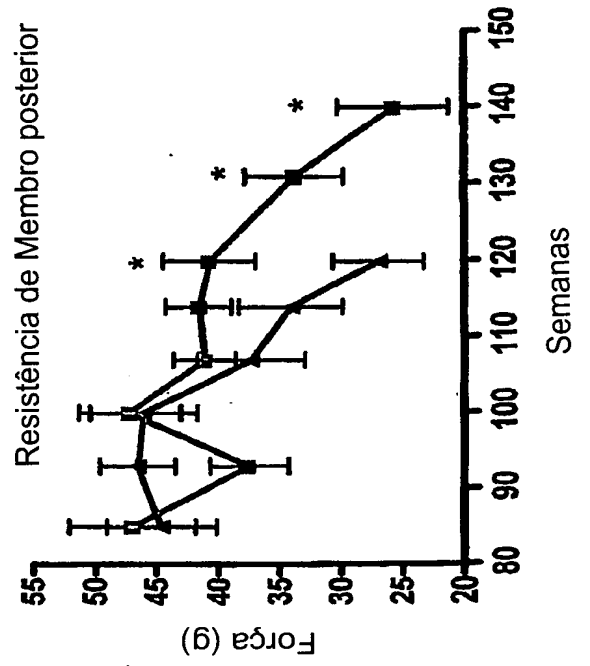
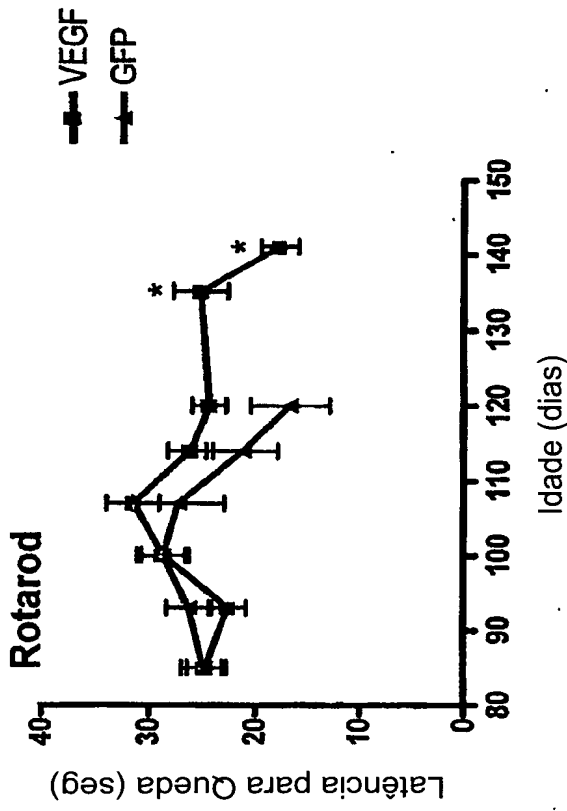


FIG. 13



RESUMO

Patente de Invenção: "TERAPIA DE GENE PARA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA E OUTRAS ENFERMIDADES DA MEDULA ESPINAL".

5 A presente invenção refere-se à descrição que proporciona métodos e composições para tratamento de enfermidades ou danos que afetam a função e controle motor em um indivíduo. Em um aspecto, a invenção se refere a um produto transgene que é distribuído a uma medula espinal do indivíduo por administração de um vetor viral neurotrófico recombinante contendo o transgene ao cérebro. O vetor viral distribui o transgene para uma
10 região do cérebro que é susceptível a infecção pelo vírus, e que expressa o produto de gene viral recombinante codificado. Também providos são composições para distribuição de um produto de transgene a uma medula espinal do indivíduo pela administração de um vetor viral neurotrófico recombinante contendo o transgene ao cérebro do indivíduo.