

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 944 358**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2018** **PCT/EP2018/052199**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2018** **WO18138371**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2018** **E 18704898 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2023** **EP 3574091**

54 Título: **Vector de expresión para la colesterol 24-hidrolasa en terapia de ataxias espinocerebelosas de repetición de poliglutamina**

30 Prioridad:

30.01.2017 EP 17305100

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

20.06.2023

73 Titular/es:

BRAINVECTIS (25.0%)
24 rue du Faubourg Saint Jacques
75014 Paris, FR;
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%);
UNIVERSIDADE DE COIMBRA (25.0%) y
CENTRO DE NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR (25.0%)

72 Inventor/es:

ALVES, SANDRO;
CARTIER-LACAVE, NATHALIE;
PEREIRA DE ALMEIDA, LUIS;
NOBREGA, CLÉVIO y
MENDONÇA, LILIANA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes

ES 2 944 358 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vector de expresión para la colesterol 24-hidrolasa en terapia de ataxias espinocerebelosas de repetición de poliglutamina

La presente invención se refiere al tratamiento de ataxias espinocerebelosas de repetición de poliglutamina.

5 Antecedentes de la invención

Las ataxias espinocerebelosas (SCA) pertenecen al grupo de trastornos neurodegenerativos caracterizados por una incoordinación de la marcha lentamente progresiva y problemas de equilibrio, a menudo asociados con una mala coordinación de las manos, el habla y los movimientos oculares. Las ataxias espinocerebelosas dan como resultado un movimiento inestable y torpe del cuerpo debido a una falla en la coordinación fina de los movimientos musculares.

- 10 Las ataxias espinocerebelosas están asociadas con la desaparición progresiva de parte de las células del sistema nervioso que se encuentran en el cerebelo, lo que lleva a la atrofia del cerebelo. Las ataxias espinocerebelosas son trastornos genéticos asociados a diferentes alteraciones génicas. En la actualidad se conocen numerosos tipos de ataxias espinocerebelosas, para las cuales se dispone de información genética específica. El primer gen de la ataxia se identificó en 1993 para un tipo de herencia dominante y se denominó "ataxia espinocerebelosa tipo 1" (SCA1).
- 15 Posteriormente, a medida que se encontraron genes dominantes adicionales, se llamaron SCA2, SCA3, etc. Por lo general, el "número de tipo de SCA se refiere al orden en que se encontró el gen. En este momento, hay al menos 29 mutaciones de genes diferentes que se han encontrado.

- La alteración más común consiste en una repetición excesiva del trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG) en algunos genes situados en diferentes cromosomas. Aquellas ataxias con expansiones de poli-CAG se denominan ataxias espinocerebelosas de repetición de poliglutamina. La repetición excesiva de CAG en un gen puede conducir a la repetición de glutamina en la proteína codificada por dicho gen, produciendo una proteína anormal.
- 20

- A modo de ejemplo, la ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3), también llamada enfermedad de Machado-Joseph (MJD), es un trastorno neurodegenerativo de aparición en adultos hereditario autosómico dominante progresivo (Durr et al., 1996), causado por una expansión de la repetición CAG en la región de codificación del gen *MJD1*, que da como resultado un tracto de poliglutamina (PoliQ) anormalmente expandido en la región codificante del gen de la ataxina-3 (ATXN3) (Kawaguchi et al., 1994). Confiere una ganancia de función tóxica a la proteína ATXN3 expandida que se acumula de forma anormal en las células neuronales, promoviendo así la formación de inclusiones intranucleares insolubles (Orr y Zoghbi, 2007; Schols et al., 2004). SCA3 se pone de manifiesto clínicamente como una variedad de disfunciones cerebelosas progresivas asociadas de forma impredecible con la degeneración del cuerpo estriado, la sustancia negra y los núcleos motores de los nervios craneales (Alves et al., 2008b; Durr et al., 1996; Klockgether et al., 1998; Rub et al., 2008), dando como resultado un amplio espectro de síntomas tales como ataxia, falta de coordinación motora, inestabilidad postural, parkinsonismo, signos piramidales y neuropatía entre otros síntomas (Burk et al., 1999; Rub et al., 2006; Schols et al., 1997; Schols et al., 2004). También se ha descrito una afectación de la médula espinal (Lukas et al., 2008).
- 25
- 30

- La prevalencia general de la SCA es de 1 por 125 000, pero en alguna parte del mundo, tales como en las islas Azores, la prevalencia de SCA3 es de hasta 1 por 140.
- 35

Hasta el momento, no existe una cura conocida para la SCA. Los tratamientos generalmente se limitan a suavizar los síntomas. Por lo tanto, existe una gran necesidad de desarrollar nuevas estrategias para la terapia en la SCA en general y ataxias espinocerebelosas de repetición de poliglutamina (SCA PoliQ) en particular.

40 Sumario de la invención

- Los autores de la invención han mostrado una disfunción del metabolismo del colesterol en pacientes con SCA PoliQ. Basándose en este descubrimiento, los autores de la invención estudiaron con éxito la posibilidad de abordar la modulación de la ruta del metabolismo del colesterol como una estrategia terapéutica para contrarrestar la SCA PoliQ, mediante el uso de un vector que comprende ácido nucleico que codifica la colesterol 24-hidroxilasa que expresa colesterol 24-hidroxilasa en las células diana.
- 45

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un vector para usar en el tratamiento de una ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina, cuyo vector comprende ácido nucleico que codifica la colesterol 24-hidroxilasa.

- En una realización, la ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina se selecciona del grupo de ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1), ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2), ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3), ataxia espinocerebelosa tipo 6 (SCA6), ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) y ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA17).
- 50

En una realización, el vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Alternativamente, el vector comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1.

En una realización, el vector se selecciona del grupo de vectores de adenovirus, lentivirus, retrovirus, herpesvirus y virus adenoasociados (AAV), preferiblemente un vector AAV, más preferiblemente un vector AAV9 o AAV10 (AAVrh.10), incluso más preferiblemente un AAVrh.10.

- 5 En una realización, el vector es para administrar directamente en el cerebro del paciente, preferiblemente en el cerebelo, cuerpo estriado, tronco encefálico, lóbulos frontotemporales y/o corteza visual, más preferiblemente en el cerebelo. Como alternativa o además, el vector es para administrar en la médula espinal del paciente.

Otro objeto de la invención es proporcionar una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de ataxias espinocerebelosas de repetición de poliglutamina, que comprende un vector que comprende ácido nucleico que codifica la colesterol 24-hidroxilasa.

10 Figuras

Figura 1- Transferencia Western representativa que muestra los niveles del marcador HA en el cerebelo y el "resto del cerebro" de ratones transgénicos MJD (n=6) frente a controles de tipo silvestre (n=6). Se usaron biopsias congeladas de seis ratones transgénicos MJD que expresaban la ATXN3 humana truncada N-terminal, con 69 repeticiones CAG y seis crías de la misma camada de control de la misma edad;

- 15 Figura 2 - Transferencias Western representativas que muestran los niveles de proteína CYP46A1 en el cerebro de ratones MJD (n=6) y controles de tipo silvestre (n=6). Densitometría óptica que pone de manifiesto una reducción de 24.3% en los niveles de proteína CYP46A1 (prueba de Mann-Whitney; $p=0.026$) en biopsias de cerebelo de ratones MJD respecto a crías de la misma camada de control (A y B). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las biopsias del "resto del cerebro" en ratones MJD y controles (prueba de Mann-Whitney; $p=0.13$) (C y D);

Figura 3 - Mediciones cuantitativas tanto de esteroides como de oxisteroides mediante espectrometría de masas-cromatografía de gases (GC/MS) en extractos de cerebelo y también en biopsias del "resto del cerebro" de ratones MJD Q69 (n=6) y crías de la misma camada de la misma edad (n=6), que muestran deficiencias en la ruta del metabolismo del colesterol en ratones MJD en relación con los crías de la misma camada de control;

- 25 Figura 4 - la sobreexpresión de CYP46A1 basada en AAV alivia la neuropatología en un modelo de ratón MJD basado en LV, 2 meses después de inyección. A) Inmunohistoquímica representativa que detecta la presencia del marcador HA en ratones LV-MJD a los que se inyectó AAVrh.10-CYP46A1, pero no en el grupo de control al que se inyectó AAVrh.10-GFP; en ratones a los que se inyectó AAVrh.10-GFP, se detecta inmunorreactividad generalizada de GFP en el cuerpo estriado del ratón mientras que no se detecta señal de HA. La inmunohistoquímica y el análisis cuantitativo para las inclusiones positivas para ataxina-3 mutante (reveladas con el anticuerpo 1H9) (A) pusieron de manifiesto una disminución estadísticamente significativa (~59%) en el número de inclusiones positivas para ataxina-3 (2751 ± 267.8 ; n=8) en comparación con el grupo de control (ratones con co-inyección de GFP; 6684 ± 717.2 inclusiones; n=8; prueba T de Student, $P = 0.0002$) (B). Se observó una disminución estadísticamente significativa en el tamaño de las inclusiones (-47%) en ratones LV-MJD tratados con AAVrh.10-CYP46A1 (59.29 ± 4.67 unidades arbitrarias (u.a.); n=8) en comparación con ratones LV-MJD a los que se inyectó control AAVrh.10-GFP (111.4 ± 3.96 u.a.; n=8; prueba T de Student, $P<0.0001$) (C). Tinción anti-ubiquitina que demostró una reducción en el número de inclusiones ubiquitinadas (análisis cualitativo) en ratones LV-MJD a los que se inyectó AAVrh.10-CYP46A1 en relación con ratones LV-MJD a los que se inyectó el control AAVrh.10-GFP (A). La sobreexpresión de CYP46A1 condujo a una reducción estadísticamente significativa (~48%) de la región empobrecida en DARPP-32 (0.48 ± 0.77 mm³; n = 8) en relación con los ratones LV-MJD a los que se inyectó el control AA Vrh.10-GFP (0.91 ± 0.14 mm³; n = 8) prueba t de Student; $P=0.015$).

- Figura 5: Efecto de la expresión de AAV-CYP46A1 en las alteraciones de la coordinación motora de ratones transgénicos MJD. Se evaluó el rendimiento de coordinación motora de ratones de tipo silvestre (WT) sin inyección y ratones transgénicos MJD a los que se inyectó AAV10 que codifica CYP46A1 (CYP) o GFP (GFP) durante 10 semanas. Los ratones se ensayaron en A) Rotarod a velocidad constante, B) Rotarod acelerado y C) ensayo de base trasera (ensayo de huella). Se observó una mejora significativa del rendimiento motor en los ratones MJD transgénicos tratados con CYP46A1 en comparación con los ratones de control (GFP). Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. Análisis ANOVA de dos vías con prueba posterior de Bonferroni; * $p<0.05$. CYP: n=10; GFP: n= 9; WT: n= 4.

- Figura 6: La sobreexpresión de AAV-CYP46A1 disminuye la agregación y mitiga la pérdida de células de Purkinje en el cerebelo de ratones transgénicos MJD. La inmunohistoquímica en ratones transgénicos MJD a los que se inyectó AAV10 que codifica CYP46A1 (CYP) o GFP (GFP) demuestra una disminución de agregados ubiquitinados (A). Los ratones transgénicos MJD a los que se inyectó AAV10-CYP46A1 presentan un número promedio mayor de células de Purkinje (B) y volumen cerebeloso mayor (C) en relación con ratones transgénicos MJD tratados con el vector de control (AAV10-GFP).

- Figura 7: Transferencia Western representativa que representa los niveles de ATXN3 mutante tras la sobreexpresión de CYP46A1 en células Neuro2A (A). El análisis de densitometría óptica puso de manifiesto una reducción de 66% y 90% de agregados de ATXN3 mutante (B) y los niveles solubles (C), respectivamente, tras la sobreexpresión de

CYP46A1 (prueba t de Student, $p = 0.0033$; $n = 4$).

Figura 8: Transferencia Western representativa que representa los niveles del marcador de autofagia LC3B-II tras la sobreexpresión de CYP46A1 en células Neuro2A (A). El análisis de densitometría óptica puso de manifiesto un aumento en la autofagia tras la sobreexpresión de CYP46A1 resaltado por un aumento en el LC3B-II en comparación con las condiciones de control, con y sin el inhibidor de autofagia cloroquina (B). Además, la sobreexpresión de CYP46A1 indujo un aumento en el flujo neto de LC3B-II en comparación con los niveles de control, lo que sugiere una activación del flujo autofágico (C). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; prueba t de Student para datos no pareados; $n = 4$).

Descripción detallada de la invención

Los autores de la invención demostraron que la administración de un vector que expresa un gen *CYP46A1* en el cerebro de un modelo de ratón de ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina, producía una disminución significativa de la disfunción neuronal y, más particularmente, de los ataques al cerebelo.

Sobre esta base, los autores de la invención proporcionan un vector viral para el tratamiento de ataxias espinocerebelosas de repetición de poliglutamina, en donde el vector expresa CYP46A1 en células del sistema nervioso central.

Ataxias espinocerebelosas de repetición de poliglutamina

La presente invención se refiere específicamente al tratamiento de ataxias espinocerebelosas de repetición de poliglutamina, que se producen cuando una proteína asociada a la enfermedad (es decir, ataxina-1, ataxina-3, etc.) contiene un número anormal de repeticiones de restos de glutamina, denominadas poliQ o una enfermedad de "repetición del trinucleótido CAG".

En el contexto de la invención, los términos "tratamiento", "trata" o "tratar" se utilizan en el presente documento para caracterizar un método o procedimiento terapéutico que tiene como objetivo (1) ralentizar o detener la progresión, agravamiento o deterioro de los síntomas del estado patológico o afección a la que se aplica dicho término; (2) aliviar o producir mejoras de los síntomas del estado patológico o afección a la que se aplica dicho término; y/o (3) revertir o curar el estado patológico o afección a la que se aplica dicho término.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a un animal, preferiblemente a un mamífero, incluso más preferiblemente a un ser humano, incluidos adultos y niños. Sin embargo, el término "sujeto" también puede referirse a animales no humanos, en particular mamíferos tales como ratones y primates no humanos.

La presente invención se refiere preferiblemente a una ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina seleccionada del grupo de ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1), ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2), ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3), ataxia espinocerebelosa tipo 6 (SCA6), ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) y ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA17).

La SCA1, o SCA tipo 1, se caracteriza por repeticiones CAG anormales en el gen que codifica la proteína ataxina 1 (*ATXN1*). Este alargamiento es de longitud variable. La longitud de repetición más corta que se ha mostrado que causa SCA1 es de 39 tripletes CAG ininterrumpidos, y la más larga observada hasta la fecha contenía 83 repeticiones. Los trectos repetidos más largos se correlacionan con una edad de inicio más temprana y una progresión más rápida. La proteína *ATXN1* mutante se pliega mal espontáneamente y forma agregados en el núcleo de las neuronas de Purkinje.

La SCA2, o SCA tipo 2, se caracteriza por repeticiones CAG anormales en la región codificante del gen *ATXN2* que produce un tracto de poliglutamina alargado en la proteína correspondiente. Las repeticiones expandidas son de tamaño variable e inestables, generalmente aumentando de tamaño cuando se transmiten a la generación sucesiva. El locus se ha mapeado en el cromosoma 12 y se ha determinado que el alelo de la enfermedad generalmente contiene de 34 a 52 repeticiones CAG, pero puede contener tan pocas como 32 o más de 100.

La SCA3, o SCA tipo 3, también llamada enfermedad de Machado-Joseph (MJD), se caracteriza por repeticiones CAG anormales en el gen que codifica la proteína ataxina 3 (*ATXN3*). La expansión de estas repeticiones de 13-36 normales a 68-79 anormales es la causa de la MJD. Existe una correlación inversa entre la edad de inicio y el número de repeticiones CAG.

La SCA6, o SCA tipo 6, se caracteriza por una inserción que extiende la región de codificación del gen *CACNA1A*, que codifica el canal de calcio dependiente de voltaje Cav2.1 P/Q, para incluir de 4-16 a 21-28 repeticiones CAG.

La SCA7, o SCA tipo 7, se caracteriza por repeticiones CAG anormales en la región codificante del gen *ATXN7*, que producen un tracto de poliglutamina alargado en la proteína correspondiente (*ATXN7*).

La SCA17, o SCA tipo 17, se caracteriza por repeticiones anormales de CAG en la región codificante del gen que codifica la proteína de unión a TATA (TBP). TBP se caracteriza por una larga cadena de glutaminas en el extremo N de la proteína. Esta región modula la actividad de unión al ADN del extremo C, y la modulación de la unión al ADN

afecta a la tasa de formación del complejo de transcripción y al inicio de la transcripción. La expansión del número de repeticiones CAG aumenta así la longitud de la cadena de glutamina y, por lo tanto, afecta a la actividad de unión al ADN de la TBP.

Las secuencias de CYP46A1

- 5 Un primer objeto de la invención se refiere a un vector para usar en el tratamiento de una SCA PoliQ, que comprende la secuencia completa del ácido nucleico que codifica la colesterol 24-hidroxisilasa.

Tal como se usa en el presente documento, el término "gen" se refiere a un polinucleótido que contiene al menos un marco de lectura abierto que es capaz de codificar un polipéptido o proteína en particular después de ser transcrito o traducido.

- 10 Como se usa en el presente documento, las expresiones "secuencia codificante" o "una secuencia que codifica una proteína particular", indican una secuencia de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante están determinados por un codón de inicio en el extremo 5' (amino) y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, ADNc de ARNm procariota o eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN procariota o eucariota e incluso secuencias de ADN sintético.

- 20 El gen *CYP46A1* codifica la colesterol 24-hidroxisilasa. Esta enzima es miembro de la superfamilia de enzimas del citocromo P450. La enzima convierte el colesterol en 24S-hidroxicolesterol (24S-OH-Chol) que puede cruzar dinámicamente la BHE, logrando que la circulación periférica sea evacuada fuera del cuerpo (Bjorkhem et al., 1998), manteniendo así la homeostasis del colesterol. Una secuencia de ADNc para CYP46A1 se describe en el número de acceso de Genbank AF094480 (SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2.

La invención hace uso de una construcción de ácido nucleico que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma para el tratamiento de una ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina.

- 25 Las variantes incluyen, por ejemplo, variantes naturales debido a variaciones alélicas entre individuos (p. ej., polimorfismos), formas alternativas de corte y empalme, etc. El término variante también incluye secuencias del gen CYP46A1 de otras fuentes u organismos. Las variantes son preferiblemente sustancialmente homólogas a la SEQ ID NO: 1, es decir, presentan una identidad de secuencia de nucleótidos típicamente de al menos aproximadamente 75%, preferiblemente al menos aproximadamente 85%, más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% con la SEQ ID NO: 1. Las variantes de un gen CYP46A1 también incluyen secuencias de ácido nucleico, que se hibridan con una secuencia como se define anteriormente (o una cadena complementaria de la misma) en condiciones de hibridación rigurosas. Las condiciones de hibridación rigurosas típicas incluyen temperaturas superiores a 30°C, preferiblemente superiores a 35°C, más preferiblemente superiores a 42°C, y/o salinidad inferior a aproximadamente 500 mM, preferiblemente inferior a 200 mM. El experto en la técnica puede ajustar las condiciones de hibridación modificando la temperatura, salinidad y/o concentración de otros reactivos tales como SDS, SSC, etc.

Vectores no virales

En una realización, el uso del vector según la presente invención es un vector no viral. Normalmente, el vector no viral puede ser un plásmido que codifica CYP46A1. Este plásmido se puede administrar directamente o mediante un liposoma, un exosoma o una nanopartícula.

- 40 Vectores virales

Los vectores virales de administración de genes útiles en la práctica de la presente invención se pueden construir utilizando metodologías bien conocidas en la técnica de la biología molecular. Normalmente, los vectores virales que portan transgenes se ensamblan a partir de polinucleótidos que codifican el transgén, elementos reguladores adecuados y elementos necesarios para la producción de proteínas virales que median la transducción celular.

- 45 Las expresiones "transferencia de genes" o "administración de genes" se refieren a métodos o sistemas para insertar de forma fiable ADN extraño en células hospedantes. Dichos métodos pueden dar como resultado la expresión transitoria del ADN transferido no integrado, la replicación extracromosómica y la expresión de replicones transferidos (p. ej., episomas) o la integración de material genético transferido en el ADN genómico de las células hospedantes.

- 50 Ejemplos de vectores virales incluyen vectores de adenovirus, lentivirus, retrovirus, virus del herpes y virus adenoasociados (AAV).

Dichos virus recombinantes se pueden producir mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como por transfección de células de empaquetamiento o por transfección transitoria con plásmidos auxiliares o virus. Los ejemplos típicos de células de empaquetamiento de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Los protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes defectuosos en la replicación se pueden encontrar,

por ejemplo, en los documentos WO95/14785, WO96/22378, US5 882 877, US6 013 516, US4 861 719, US5 278 056 y WO94/19478.

En una realización preferida, se emplean vectores virales adenoasociados (AAV).

Por "vector AAV" se entiende un vector derivado de un serotipo de virus adenoasociado, que incluye sin limitación, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, tal como AAVrh.10, AAV-PHP.B (Benjamin E. Deverman et al., 2016), etc. Los vectores AAV pueden tener uno o más de los genes del AAV de tipo natural eliminados en su totalidad o en parte, preferiblemente los genes rep y/o cap, pero conservan secuencias ITR flanqueantes funcionales. Las secuencias ITR funcionales son necesarias para el rescate, replicación y empaquetamiento del virión de AAV. Por lo tanto, un vector AAV se define en el presente documento para incluir al menos las secuencias requeridas en cis para la replicación y el empaquetamiento (p. ej., ITR funcionales) del virus. No es necesario que las ITR sean las secuencias de nucleótidos de tipo natural y pueden estar alteradas, p. ej., por la inserción, delección o sustitución de nucleótidos, siempre que las secuencias proporcionen rescate, replicación y empaquetamiento funcionales. Los vectores de expresión AAV se construyen usando técnicas conocidas para proporcionar al menos como componentes unidos operativamente en la dirección de la transcripción, elementos de control que incluyen una región de inicio de la transcripción, el ADN de interés (es decir, el gen CYP46A1) y una región de terminación de la transcripción. Se pueden incluir dos copias del ADN de interés, como una construcción autocomplementaria (McCarty et al., 2001).

En una realización más preferida, el vector AAV es un vector AAV9 o AAV10 (AAVrh.10), o un vector derivado de uno de estos serotipos. En una realización más preferida, el vector AAV es un vector AAVrh.10.

Los elementos de control se seleccionan para que sean funcionales en una célula de mamífero. La construcción resultante que contiene los componentes unidos operativamente está unida (5' y 3') con secuencias ITR de AAV funcionales. Por "repeticiones terminales invertidas de virus adenoasociado" o "ITR de AAV" se entiende las regiones reconocidas en la técnica que se encuentran en cada extremo del genoma del AAV que funcionan juntas en cis como orígenes de la replicación del ADN y como señales de empaquetamiento para el virus. Las ITR de AAV, junto con la región codificante de rep de AAV, proporcionan la escisión y el rescate eficientes, y la integración de una secuencia de nucleótidos interpuesta entre dos ITR flanqueantes en el genoma de una célula de mamífero. Las secuencias de nucleótidos de las regiones ITR de AAV son conocidas. (Véase, p. ej., Kotin, 1994; Berns, KI "Parvoviridae and their Replication" en Fundamental Virology, 2ª Edición, (B. N. Fields y D. M. Knipe, eds.) para la secuencia de AAV-2. Tal como se usa en el presente documento, una "ITR de AAV" no comprende necesariamente la secuencia de nucleótidos de tipo natural, sino que puede estar alterada, p. ej., mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos. Además, la ITR de AAV puede derivar de cualquiera de varios serotipos de AAV, que incluyen, pero no se limitan a, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV6, etc. Además, las ITR 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector AAV no tienen que ser necesariamente idénticas o derivar del mismo serotipo o aislado de AAV, siempre que funcionen según lo previsto, es decir, para permitir la escisión y el rescate de la secuencia de interés de un vector o genoma de una célula hospedante, y para permitir la integración de la secuencia heteróloga en el genoma de la célula receptora cuando los productos génicos de Rep AAV están presentes en la célula.

Particularmente preferidos son los vectores derivados de serotipos de AAV que tienen tropismo y altas eficiencias de transducción en células del sistema nervioso central (SNC) de mamíferos, particularmente neuronas. Se proporciona una revisión y comparación de las eficiencias de transducción de diferentes serotipos en Davidson et al., 2000. En un ejemplo preferido, se ha mostrado que los vectores basados en AAV2 dirigen la expresión a largo plazo de transgenes en el SNC, preferiblemente transduciendo neuronas. En otros ejemplos no limitantes, los vectores preferidos incluyen vectores derivados de los serotipos AAV4 y AAV5, que también se ha mostrado que transducen células del SNC (Davidson et al, véase antes). En particular, el vector puede ser un vector AAV que comprende un genoma derivado de AAV5 (en particular, las ITR son ITR de AAV5) y una cápside derivada de AAV5. En otro ejemplo no limitante, los vectores preferidos incluyen vectores obtenidos mediante el uso de evolución dirigida por AAV basada en recombinación de cre (CREATE) como AAV-PHP.B.

En una realización particular de la invención, el vector es un vector AAV pseudotipado. Específicamente, un vector AAV pseudotipado comprende un genoma de AAV derivado de un primer serotipo de AAV y una cápside derivada de un segundo serotipo de AAV. Preferiblemente, el genoma del vector AAV se deriva de AAV2. Además, la cápside se deriva preferiblemente de AAV5. Los ejemplos no limitantes específicos de vectores AAV pseudotipados incluyen un vector AAV que comprende un genoma derivado de AAV2 en una cápside derivada de AAV5, un vector AAV que comprende un genoma derivado de AAV2 en una cápside derivada de AAVrh.10, etc.

La secuencia de nucleótidos seleccionada está unida operativamente a elementos de control que dirigen la transcripción o expresión de la misma en el sujeto in vivo. Dichos elementos de control pueden comprender secuencias de control normalmente asociadas con el gen seleccionado. En particular, tales elementos de control pueden incluir el promotor del gen CYP46A1, en particular el promotor del gen CYP46A1 humano (Ohyama Y et al., 2006)

Alternativamente, se pueden emplear secuencias de control heterólogas. Las secuencias de control heterólogas útiles generalmente incluyen aquellas derivadas de secuencias que codifican genes virales o de mamíferos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK), el promotor temprano de SV40, el

promotor LTR del virus del tumor mamario de ratón; promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP); un promotor del virus del herpes simple (HSV), un promotor del citomegalovirus (CMV) tal como la región promotora temprana inmediata del CMV (CMVIE), el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotores sintéticos, promotores híbridos y similares. Además, las secuencias derivadas de genes no virales, tales como el gen de la metalotioneína murina, también encontrarán uso en el presente documento. Dichas secuencias promotoras están disponibles comercialmente en, p. ej., Stratagene (San Diego, CA). Para los fines de la presente invención, serán de uso particular tanto los promotores heterólogos como otros elementos de control, tales como promotores inducibles y específicos del SNC, potenciadores y similares.

Los ejemplos de promotores heterólogos incluyen el promotor de CMV. Los ejemplos de promotores específicos del SNC incluyen los aislados de los genes de la proteína básica de mielina (MBP), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), sinapsinas (p. ej., promotor del gen de la sinapsina 1 humana) y enolasa específica de neuronas (NSE).

Los ejemplos de promotores inducibles incluyen elementos que responden al ADN para ecidisona, tetraciclina, hipoxia y aúfina.

El vector de expresión de AAV que alberga la molécula de ADN de interés unida por ITR de AAV puede construirse insertando directamente la(s) secuencia(s) seleccionada(s) en un genoma de AAV del que se han escindido los principales marcos de lectura abiertos ("ORF") del AAV. También se pueden eliminar otras partes del genoma del AAV siempre que quede una parte suficiente de las ITR para permitir las funciones de replicación y empaquetamiento. Dichas construcciones pueden diseñarse utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Véase, p. ej., las patentes de EE. UU. N.º 5 173 414 y 5 139 941; Publicaciones internacionales N.º WO 92/01070 (publicada el 23 de enero de 1992) y WO 93/03769 (publicada el 4 de marzo 1993); Lebkowski et al., 1988; Vicent et al., 1990; Carter, 1992; Muzyczka, 1992; Kotin, 1994; Shelling y Smith, 1994; y Zhou et al., 1994. Alternativamente, las ITR del AAV pueden escindirse del genoma viral o de un vector AAV que contiene las mismas y fusionarse en 5' y 3' de una construcción de ácido nucleico seleccionada que está presente en otro vector utilizando técnicas de ligación estándar. Los vectores AAV que contienen ITR se han descrito, p. ej., en la patente de EE. UU. N.º 5 139 941. En particular, allí se describen varios vectores AAV que están disponibles en la American Type Culture Collection ("ATCC") con los números de acceso 53222, 53223, 53224, 53225 y 53226. Además, se pueden producir sintéticamente genes quiméricos para incluir secuencias ITR de AAV dispuestas en 5' y 3' de una o más secuencias de ácido nucleico seleccionadas. Pueden usarse codones preferidos para la expresión de la secuencia del gen quimérico en células del SNC de mamíferos. La secuencia quimérica completa se ensambla a partir de oligonucleótidos que solapan preparados mediante métodos estándar. (Véase, p. ej., Edge, 1981; Nambair et al., 1984; Jay et al., 1984). Con el fin de producir viriones de rAAV, se introduce un vector de expresión de AAV en una célula hospedante adecuada usando técnicas conocidas, tales como por transfección. Se conocen en la técnica en general una serie de técnicas de transfección. (Véase, p. ej., Graham et al., 1973; Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, y Chu et al., 1981). Los métodos de transfección particularmente adecuados incluyen coprecipitación de fosfato de calcio (Graham et al., 1973), microinyección directa en células cultivadas (Capecchi, 1980), la electroporación (Shigekawa et al., 1988), transferencia de genes mediada por liposomas (Mannino et al., 1988), transducción mediada por lípidos (Felgner et al., 1987) y administración de ácido nucleico utilizando microproyectiles de alta velocidad (Klein et al., 1987).

Por ejemplo, un vector viral preferido, tal como el AAVrh.10, comprende, además de una secuencia de ácido nucleico que codifica la colesterol 24-hidroxilasa, la estructura principal del vector AAV con ITR derivada de AAV-2, el promotor, tal como el gen PGK (fosfoglicerato quinasa) de ratón o el promotor híbrido de citomegalovirus/ β -actina (CAG) que consiste en el potenciador del gen inmediato de citomegalovirus, el promotor, el donador de empalme y el intrón del gen de la β -actina de pollo, el aceptor de empalme de la β -globina de conejo, o cualquier promotor neuronal tal como el promotor del receptor de dopamina-1 o el receptor de dopamina-2 con o sin la forma natural o mutante del elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE).

Administración de los vectores

Se describe un método de tratamiento de la ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina, cuyo método comprende administrar un vector que comprende ácido nucleico que codifica la colesterol 24-hidroxilasa a un paciente que lo necesite. El vector puede administrarse directamente en el cerebro del sujeto o mediante inyección intravascular, intravenosa, intranasal, intraventricular o intratecal.

Además, se describe un método para tratar una ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina (SCA PoliQ) en un sujeto, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar un vector como se define anteriormente, que comprende un ácido nucleico que codifica la colesterol 24-hidroxilasa; y

(b) administrar el vector al cerebro del sujeto, de modo que dicho vector transduce células en el cerebro, y de modo que las células transducidas expresan la colesterol 24-hidroxilasa en un nivel terapéuticamente eficaz.

Ventajosamente, el vector es un vector viral, más ventajosamente un vector AAV, incluso ventajosamente un vector AAV 9 o AAV10, tal como AAVrh.10.

El vector puede administrarse al cerebelo, cuerpo estriado, tronco encefálico, lóbulos frontotemporales y/o corteza visual, médula espinal, preferiblemente al menos al cerebelo. En particular, el vector puede administrarse exclusivamente al cerebelo.

Los métodos de suministro o administración de vectores virales a neuronas y/o astrocitos y/u oligodendrocitos y/o microglía incluyen generalmente cualquier método adecuado para la administración de vectores a dichas células, directamente o a través de la transducción de células hematopoyéticas, de modo que es transducida al menos una parte de células de una población celular conectada sinápticamente seleccionada. El vector puede administrarse a cualquier célula del sistema nervioso central, células del sistema nervioso periférico o ambos. Preferiblemente, el vector se administra a células del cerebro. En general, el vector se administra a las células del cerebro, incluidas, por ejemplo, células del tronco encefálico (médula, protuberancia y mesencéfalo), cerebelo, sustancia negra, cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen), lóbulos frontotemporales, corteza visual, médula espinal o combinaciones de los mismos, o preferiblemente cualquier subpoblación adecuada de los mismos.

Para administrar el vector específicamente a una región particular y a una población particular de células del cerebro, el vector puede administrarse mediante microinyección estereotáctica. Por ejemplo, los pacientes tienen la base del marco estereotático fijada en su lugar (atornillada al cráneo). Se obtienen imágenes del cerebro con la base del marco estereotático (MRI compatible con marcadores fiduciales) usando MRI de alta resolución. Luego, las imágenes de MRI se transfieren a un ordenador que ejecuta un software estereotático. Se utiliza una serie de imágenes coronales, sagitales y axiales para determinar el objetivo (lugar de inyección del vector) y la trayectoria. El software traduce directamente la trayectoria en coordenadas tridimensionales apropiadas para el marco estereotático. Se perforan orificios de trepanación sobre el sitio de entrada y se coloca el aparato estereotático con la aguja implantada a la profundidad dada. Luego, el vector se inyecta en los sitios objetivo, y finalmente se mezcla con un agente de contraste. Dado que el vector se integra en las células objetivo, en lugar de producir partículas virales, la posterior propagación del vector es menor y principalmente una función de difusión pasiva desde el sitio de inyección y, por supuesto, el transporte trans-sináptico deseado, antes de la integración. El grado de difusión puede controlarse ajustando la relación de vector a vehículo fluido.

Las vías de administración adicionales también pueden comprender la aplicación local del vector bajo visualización directa, p. ej., aplicación cortical superficial, aplicación intranasal u otra aplicación no estereotática.

Las células objetivo de los vectores de la presente descripción son células del cerebro de un sujeto afectado por SCA PoliQ, preferiblemente células neurales. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano, generalmente un adulto, pero puede ser un niño o un bebé.

El vector también puede administrarse a modelos biológicos de la enfermedad. En ese caso, el modelo biológico puede ser cualquier mamífero en cualquier etapa de desarrollo en el momento del parto, p. ej., embrionario, fetal, infantil, juvenil o adulto, preferiblemente es un adulto. Además, las células diana pueden ser esencialmente de cualquier fuente, especialmente primates no humanos y mamíferos de órdenes Roedor (ratones, ratas, conejos, hámsteres), Carnívora (gatos, perros) y Arteriodactyla (vacas, cerdos, ovejas, cabras, caballos), así como cualquier otro sistema no humano (p. ej., el sistema modelo de pez cebra).

Preferiblemente, el método comprende la administración intracerebral, a través de inyecciones estereotáticas. Sin embargo, también se pueden adaptar otros métodos de administración conocidos de acuerdo con la invención. Por ejemplo, para una distribución más amplia del vector por el cerebro, puede inyectarse en el líquido cefalorraquídeo, p. ej., por punción lumbar, punción en cisterna magna o ventricular. Para dirigir el vector al cerebro, puede inyectarse en la médula espinal o en los ganglios periféricos, o en la carne (por vía subcutánea o intramuscular) de la parte del cuerpo de interés. En determinadas situaciones, el vector puede administrarse por una aproximación intravascular. Por ejemplo, el vector se puede administrar por vía intraarterial (carótida) en situaciones donde la barrera hematoencefálica está alterada. Además, para una administración más global, el vector puede administrarse durante la "apertura" de la barrera hematoencefálica lograda mediante la infusión de soluciones hipertónicas que incluyen manitol o administración local por ultrasonidos.

Los vectores usados en el presente documento pueden formularse en cualquier vehículo adecuado para la administración. Por ejemplo, se pueden poner en una suspensión, solución o emulsión farmacéuticamente aceptable. Los medios adecuados incluyen preparaciones salinas y liposomales. Más específicamente, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son el propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluidos medios salinos y tamponados. Los vehículos intravenosos incluyen restablecedores de fluidos y nutrientes, restablecedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

También se puede usar un sistema de dispersión coloidal para el suministro de genes dirigidos. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas o exosomas.

- 5 Las dosis y pautas preferidas pueden ser determinadas por un médico y dependen de la edad, sexo, peso del sujeto y etapa de la enfermedad. Como ejemplo, para la administración de colesterol 24-hidroxiase usando un vector de expresión viral, cada dosis unitaria de vector que expresa la colesterol 24-hidroxiase puede comprender de 2.5 a 100 μ l de una composición que incluye un vector de expresión viral en un fluido farmacéuticamente aceptable y que proporciona de 10^{10} hasta 10^{15} partículas virales que expresan colesterol 24-hidroxiase por ml de composición.

Composición farmacéutica

- 10 Un objeto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de SCA PoliQ, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector según la invención.

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del vector de la invención para tratar la SCA PoliQ con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

- 15 Se entenderá que la dosis diaria total de los compuestos y composiciones de la presente invención la decidirá el médico tratante basado en el buen criterio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración y velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o
20 coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos en la técnica médica. Por ejemplo, está dentro de la experiencia en la técnica comenzar las dosis del compuesto con niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los productos puede variar en un amplio intervalo por adulto por día. La cantidad terapéuticamente eficaz del vector según la invención que se debe administrar, así como la dosificación para
25 el tratamiento de una afección patológica con el número de partículas virales o no virales y/o composiciones farmacéuticas de la invención, dependerá de numerosos factores, que incluyen la edad y estado del paciente, la gravedad de la alteración o trastorno, el método y la frecuencia de administración y el péptido particular a utilizar.

- 30 La presentación de las composiciones farmacéuticas que contienen el vector según la invención puede ser en cualquier forma que sea adecuada para la administración intramuscular, intracerebral, intranasal, intratecal, intraventricular o intravenosa. En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración intramuscular, intranasal, intravenosa, intracerebral, intratecal o intraventricular, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos.

- 35 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que se puede inyectar. Éstas pueden ser, en particular, soluciones salinas estériles, isotónicas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que tras la adición, según el caso, de agua esterilizada o suero fisiológico, permiten la constitución de soluciones inyectables estériles.

- 40 Tras la formulación, las soluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas, tales como el tipo de soluciones inyectables, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármacos y similares.

También se pueden administrar dosis múltiples.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante el siguiente ejemplo.

45 **Ejemplo**

Los beneficios terapéuticos de la sobreexpresión de CYP46A1 se evaluaron en dos modelos de ratón con ataxia espinocerebelosa PoliQ: un modelo animal basado en lentivirus de MJD/SCA3 y un modelo de ratón transgénico de PoliQ con patología grave establecida.

Materiales y métodos

50 **Animales**

Se obtuvieron ratones C57B1/6 de dos meses de edad (n=8) de Charles River (España) y ratones transgénicos MJD Q69 de tres meses de edad (n=6) y crías de la misma camada de tipo silvestre de la misma edad (n=6) (Oue et al., 2009; Torashima et al., 2008). Los ratones transgénicos MJD (cepa C57BL/6) sobreexpresan la ATXN3 humana

truncada N-terminal, que contiene 69 repeticiones CAG y un epítipo de marcador de hemaglutinina (HA) N-terminal, dirigido específicamente en células de Purkinje del cerebelo por el promotor L7 (Oue et al., 2009). Este fragmento de ATXN3 truncado carece de 286 aminoácidos N-terminales que contienen el dominio de ubiquitina-proteasoma (dominio Josephin) y motivos de interacción de ubiquitina (UIM). Por lo tanto, la proteína truncada consta de un tracto de 69 poliQ con solo 4 y 42 aminoácidos en su extremo N y extremo C, respectivamente. Se estableció una colonia de estos ratones transgénicos en el Centro de Neurociencia y Biología Celular de Coimbra. Los ratones se alojaron en una habitación con temperatura controlada y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. La comida y el agua estaban disponibles a voluntad. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la directiva del Consejo de la Comunidad Europea (2010/63/EU) para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

10 Producción de vectores lentivirales

Los vectores lentivirales que codifican la ataxina-3 mutante humana (LV-PGK-Atx-3 72Q) se produjeron en la línea celular HEK293T con un sistema de cuatro plásmidos, como se describió anteriormente (Alves et al., 2008b). Las partículas lentivirales se resuspendieron en BSA al 1% en PBS estéril. El contenido de partículas virales de los lotes se evaluó valorando los niveles de antígeno p24 del VIH-1 mediante ELISA (Retro Tek, Gentaur, París, Francia). Las reservas virales concentradas se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Diseño de plásmidos AAV y producción de vectores.

Los vectores AAV se produjeron y purificaron mediante Atlantic Gene Therapues (INSERM U1089, Nantes, Francia). La producción de vectores se ha descrito en otros lugares (Hudry et al., 2010). Las construcciones virales para AAVrh.10-GFP y AAVrh.10-CYP46A1 contenían el casete de expresión que consistía en los genes *Gfp* o los *Cyp46a1* humanos, dirigidos por un potenciador temprano de CMV/promotor sintético (CAG) de β -actina de pollo (CAG) rodeado por secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV2. También se generó el vector AAVrh.10-CAG-GFP y se usó como control.

Inyecciones estereotácticas en el cerebro del ratón.

Se anestesiaron ratones de cinco semanas de edad con avertina (14 ml g/l y 250 mg kg/l por vía intraperitoneal). En cuatro de cada animal, se coinyectaron 400 000 ng de antígeno p24 de vectores lentivirales que codifican ATXN3 72Q (MUT ATXN3) y 3.10^{12} vg/ml de AAVrh.10 que codifica CYP46A1 o la proteína verde fluorescente (GFP; control) en un volumen final de 2 μ l, de forma estereotáctica (0.2 μ l/min) en el cuerpo estriado en las siguientes coordenadas: anteroposterior: +0.6 mm, lateral: $\pm$ 1.8 mm, ventral: -3.3 mm y barra dentada: 0. Después de la inyección, la aguja de la jeringa se dejó en el sitio durante 5 min más antes de levantarla lentamente. La piel se cerró usando una sutura Prolene 6-0® (Ethicon, Johnson and Johnson, Bruselas, Bélgica). Para las inyecciones en el cerebelo, se inyectó en el vermis cerebeloso de ratones transgénicos MJD Q69 de 6 semanas de edad (n=25) y crías de la misma camada de tipo silvestre de la misma edad (n=10) AAVrh10-CYP46A1 o AAVrh10-GFP (2 μ l; 4.10^9 vg) a 0.25 μ l/min en las coordenadas: -1.6 mm rostral a lambda, 0 mm línea media y 1 mm ventral a la superficie del cráneo, con la barra bucal fijada en -3.3.

35 Muestras de cerebro

Se sacrificaron ratones transgénicos MJD Q69 (n=6) y crías de la misma camada de tipo silvestre de la misma edad (n=6) a los tres meses de edad. Los animales, que recibieron una sobredosis de pentobarbital sódico, se perfundieron transcardiacamente con PBS 0.1 M enfriado con hielo antes de la extracción del cerebro. Para el procesamiento de transferencia Western, el cerebelo y el "resto del cerebro" del hemisferio cerebral izquierdo se diseccionaron y luego se homogeneizaron en un tampón de lisis (TBS, NaCl 150 mM y Triton al 1%) que contenía inhibidores de fosfatasa (Pierce) y proteasa (Roche). Después de la centrifugación (20 min, 13 000 rpm, 4°C), se recogió el líquido sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteína (ensayo de proteína de BCA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.). Se almacenaron partes alícuotas de lisado (3 mg de proteína/ml) a -80°C hasta su uso. El cerebelo y el "resto del cerebro" del hemisferio cerebral izquierdo se diseccionaron y conservaron a -80°C hasta el análisis por GC-MS. Además, los ratones C57B1/6 (n=8) a los que se inyectaron vectores virales se perfundieron transcardiacamente con PBS 0.1 M enfriado con hielo, seguido de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 0.1 M, antes de la extracción del cerebro. Los cerebros se fijaron posteriormente en PFA al 4% en PBS 0.1 M durante 3 días y se crioprotegieron por incubación en una solución de sacarosa al 20%/PBS 0.1 M. Las secciones coronales del cerebro (25 μ m) se cortaron en un micrótopo de congelación (Leica, Wetzlar, Alemania), se recogieron en serie y se almacenaron a 4°C, flotando libremente en PBS con azida de sodio al 0.02% hasta el procesamiento inmunohistoquímico. Se extrajeron los cerebros de ratones transgénicos MJD Q69 a los que se inyectó AAVrh10-CYP46A1 o AAVrh10-GFP y ratones de tipo silvestre de la misma edad, se fijaron posteriormente en PFA al 4% durante 24 h y se crioprotegieron mediante incubación en tampón de sacarosa/fosfato al 25% durante 48 h. Posteriormente, los cerebros se congelaron y se seccionaron en forma sagital (secciones de 40 μ m) utilizando un criostato (LEICA CM3050 S).

Ensayos de comportamiento en ratones transgénicos MJD

Para evaluar el impacto de la sobreexpresión de AAVrh10-CYP46A1 en el fenotipo motor, se inyectó AAVrh10-CYP46A1 (n=10) o AAVrh10-GFP (control) (n=9) a ratones MJD transgénicos (cepa C57BL/6); además, se utilizaron cuatro animales de tipo silvestre de la misma camada. Se entrenó a los ratones en una batería de pruebas motoras, comenzando a las 5-6 semanas de edad, y se realizaron cada 4 semanas, comenzando desde la semana 2 después de la inyección hasta 10 semanas después de la inyección. Los experimentos fueron evaluados por un operador experimentado con enmascaramiento. Todos los ensayos se realizaron en el mismo cuarto oscuro después de 30 min de aclimatación.

Rotarod

La coordinación motora y el equilibrio se evaluaron con un aparato Rotarod (Letica Scientific Instruments). Los ratones se colocaron en el aparato Rotarod (Letica Scientific Instruments), a una velocidad constante (5 rpm) durante un máximo de 5 min y/o a velocidad acelerada (4-40 rpm, en 5 min) y se registró la latencia de caída. Todos los ensayos se realizaron en el mismo cuarto oscuro después de 30 min de aclimatación. Los ratones realizaron cuatro ensayos para cada punto temporal con un descanso de 15-20 minutos entre ensayos. Para el análisis, se utilizó la latencia media de caída del Rotarod de tres ensayos. Los ratones se entrenaron y realizaron este ensayo cada 2/4 semanas hasta 10 semanas después del inicio del tratamiento. Un operador experimentado realizó los ensayos con enmascaramiento.

Análisis de patrón de huellas

Se usó el ensayo del patrón de huellas (seguimiento de pisadas) para comparar la marcha de los ratones a los que se inyectó AAVrh10-CYP46A1 con los ratones a los que se inyectó AAVrh10-GFP. Por lo tanto, las patas traseras y delanteras se recubrieron con pinturas no tóxicas rojas y azules, respectivamente. Los animales se pusieron en el suelo de una pista (con paredes de 15 cm de alto) y caminaron a lo largo de una hoja de papel blanco de 100 cm de largo y 10 cm de ancho. Los patrones de las huellas se analizaron en cuanto a la distancia entre huellas secuenciales de las patas traseras, medidas ortogonales a la dirección de la marcha. La base entre el centro de la huella trasera y el centro de la huella trasera precedente (base trasera) se registró a lo largo de una secuencia de cinco pasos consecutivos, excluyendo las huellas hechas al principio y al final de la carrera.

Mediciones de colesterol y oxisterol

El análisis de colesterol y oxisterol siguió el método de "referencia" (Dzeletovic et al., 1995) para minimizar la formación de artefactos de autooxidación. Brevemente, las muestras de tejido estriado de ratón se pesaron y homogeneizaron con un aparato TissueLyser II (Qiagen) en una solución de 500 µl que contenía hidroxitolueno butilado (BHT, 50 µg/ml) y EDTA (0.5 M). En este punto, se añadió una mezcla de patrones internos [epicoprostanol, ²H₇-7-latosterol, ²H₆-desmosterol, ²H₆-lanosterol y ²H₇-24(R/S)-hidroxicolessterol] (Avanti Polar Lipids). La hidrólisis alcalina se realizó en atmósfera de Ar usando KOH etanólico 0.35 M durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la neutralización de la solución con ácido fosfórico, los esteroides se extrajeron en cloroformo. La fase inferior se recogió, se secó bajo una corriente de nitrógeno y el residuo se disolvió en tolueno. Luego se separaron los oxisteroides del colesterol y sus precursores en un cartucho de sílice Isolute de 100 mg (Biotage); el colesterol se eluyó en propan-2-ol al 0.5% en hexano seguido de oxisteroides en propan-2-ol al 30% en hexano. Las fracciones de esteroles y oxisterol se sililaron de forma independiente con Regisil® + TMCS al 10% [bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida + trimetilclorosilano al 10%] (Regis Technologies) como se describió anteriormente (Chevy et al., 2005). Los derivados de trimetilsililéter de esteroides y oxisteroides se separaron por cromatografía de gases (Hewlett-Packard 6890 series) en una columna capilar de polaridad media RTX-65 (polisiloxano 65% difenilo-35% dimetilo, longitud 30 m, diámetro 0.32 mm, espesor de película 0.25 µm; Restek). El espectrómetro de masas (Agilent 5975 inert XL) en serie con la cromatografía de gases se configuró para la detección de iones positivos. Los iones se produjeron en el modo de impacto de electrones a 70 eV. Se identificaron por el fragmentograma en el modo de barrido y se cuantificaron por monitoreo selectivo de los iones específicos después de normalización y calibración con los patrones internos y externos apropiados [epicoprostanol m/z 370, ²H₇-7-latosterol m/z 465, ²H₆-desmosterol m/z 358, ²H₆-lanosterol m/z 504, ²H₇-24(R/S)-hidroxicolessterol m/z 553, colesterol m/z 329, 7-latosterol m/z, 7-deshidrocolesterol m/z 325, 8-deshidrocolesterol m/z 325, desmosterol m/z 343, lanosterol m/z 393 y 24(R/S)-hidroxicolessterol m/z 413].

Transferencia Western

Las concentraciones de proteína total se determinaron utilizando el kit BCA (Pierce). Se separaron por electroforesis cantidades iguales de extracto de proteína total (30 µg) utilizando SDS-PAGE en geles Bis-Tris al 4-12% (gel NuPAGE® Novex Bis-tris Midi 15 o 26 pocillos, Life Technologies, Carlsbad, EE. UU.) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas bloqueadas (leche descremada en polvo al 5% en TBS-Tween-20 al 0.1%) se incubaron con anticuerpos primarios durante la noche a 4°C y se lavaron tres veces con TBS-Tween-20 al 0.1% (T-BST) durante 10 min. A continuación, las membranas se marcaron con anticuerpos IgG-HRP secundarios producidos contra cada anticuerpo primario correspondiente. Después de tres lavados con T-BST, las membranas se incubaron con reactivo quimioluminiscente ECL (sustrato Clarity Western ECL; GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) según las instrucciones del proveedor. La actividad de peroxidasa se detectó con el sistema de cámara Fusion TX7

(Fisher Scientific). La normalización se realizó mediante análisis de densitometría con el software de análisis de imágenes Quantity One 1D (versión 4.4; Biorad, Hercules, CA, EE. UU.). Las densidades ópticas se normalizaron con respecto a una "proteína de referencia" (GAPDH). Se calculó una relación de partición y se normalizó con respecto a la muestra con el valor más alto definido como 1.

5 Anticuerpos primarios

Los anticuerpos utilizados en los análisis de transferencia Western (WB) e inmunohistoquímicos (IHC) se enumeran en la tabla 1, a continuación.

Tabla 1: Anticuerpos utilizados en análisis de transferencia western (WB) e inmunohistoquímicos (IHC)

Anticuerpos primarios	Fuente	WB	IHC
de ratón anti-ATXN3 (clon 1H9)	Millipore	-	1:2000
de ratón anti-marcador de hemaglutinina	Covance	1:4000	1:5000
de conejo anti-ubiquitina	Dako	-	1:3000
de conejo anti-CYP46A1	Abcam	1:2000	1:3000
de conejo anti-DARPP32	Millipore	-	1:2000
de conejo anti-GFP	Abcam	-	1:5000
de ratón anti-GAPDH	Abcam	1:4000	-
de conejo anti-LC3B	Cell Signalling	1:1000	-
de ratón anti-tubulina	Sigma	1:5000	-

10 Inmunotinción

El procedimiento inmunohistoquímico se inició inactivando la peroxidasa endógena mediante incubación de secciones de flotación libre en fenilhidrazina durante 25 min a 37°C. Después de tres lavados, los cortes se bloquearon en PBS/Triton X-100 al 0.1% que contenía suero de cabra normal al 10% (NGS, Gibco) durante 1 h a t.a. A continuación, las secciones se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios durante la noche a 4°C. Después de tres lavados, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (1:250; Vector Laboratories Inc., CA, EE. UU.) diluido en PBS/Triton X-100 al 0.1% y NGS al 10% durante 2 h a t.a. Después de tres lavados, los anticuerpos unidos se visualizaron mediante el sistema de amplificación ABC (kit Vectastain ABC, Vector Laboratories, West Grove, EE. UU.) y tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina (kit de sustrato de peroxidasa, DAB, Vector Laboratories, CA, EE. UU.) como sustrato. Las secciones se montaron, se deshidrataron pasándolas dos veces por soluciones de etanol y toluol y se cubrieron con cubreobjetos con Eukitt® (O. Kindler GmbH & CO, Friburgo, Alemania).

Adquisición de imágenes

Las imágenes de las secciones inmunoteñidas se adquirieron con un macroscopio Z6 APO (Leica) y el software LAS V3.8 (Leica), a temperatura ambiente, con un microscopio de campo claro Leica DM 5000B equipado con una cámara digital Leica DFC310FX. Se tomaron fotografías para comparación en condiciones idénticas de adquisición de imágenes, y todos los ajustes de brillo y contraste se aplicaron uniformemente a todas las imágenes.

Análisis cuantitativo inmunohistoquímico de agregados de ATXN3 y empobrecimiento de DARPP-32 en el modelo de MJD basado en LV

Los cortes de cerebro se analizaron y se tomaron imágenes a t.a. con un microscopio Axiovert 200M (cámara digital color CCD Axiocam HRc; Carl Zeiss), a 5 (objetivo en aire, Fluor, 0.25 NA) y 20 aumentos (objetivo en aire, LD-PlanNeofluar, 0.4 NA). Las imágenes compuestas de regiones completas que contenían agregados o empobrecidas en DARPP-32 se adquirieron automáticamente usando la función MozaiX del software AxioVision. La cuantificación de agregados positivos para ATXN3 y la determinación de la zona de empobrecimiento en DARPP-32 se realizó en 7-8 cortes para cada ratón, repartidos por la extensión anteroposterior del cuerpo estriado y separados por 200 µm. El recuento de agregados positivos para ATXN3 se realizó en imágenes ampliadas 20x de cada hemisferio utilizando ImageJ (Institutos Nacionales de Salud). Después de establecer el umbral manualmente de las imágenes para que las acumulaciones positivas para ATXN3 reconocibles se incluyeran en el examen, las partículas >3 µm² se analizaron y contaron automáticamente (escala: 2 píxeles/µm), y el cálculo estimativo del número total de agregados en todo el cuerpo estriado se realizó como se ha descrito anteriormente (Alves et al., 2008a; Alves et al., 2010). La extensión de las lesiones de ATXN3 MUT en el cuerpo estriado se analizó digitalizando 6-8 secciones teñidas con DARPP-32 por animal (200 µm entre secciones de 25 µm de espesor), seleccionadas para obtener una muestra rostro-caudal completa del cuerpo estriado con un escáner de portaobjetos y mediante la cuantificación del área de la lesión con un programa de análisis de imágenes semiautomático (software ImageJ, NIH, MD, EE. UU.), para definir manualmente las regiones con disminución de la reactividad de los anticuerpos y cuantificar su área (escala: 0.5 píxeles/µm). Se analizaron secciones a lo largo de todo el cuerpo estriado. El área del cuerpo estriado que mostraba una pérdida de tinción con DARPP-32 se midió para cada animal con una macro independiente del operador. Luego se estimó el volumen usando la siguiente fórmula: volumen = $d(a_1 + a_2 + a_3 + \dots)$, donde d es la distancia entre las secciones en serie (200 µm), y a_1 , a_2 , a_3 etc. son áreas empobrecidas en DARPP-32 para secciones en serie individuales (Alves et al.,

2008b). El valor de gris promedio de todos los píxeles medidos en el área lesionada se registró para cada área empobrecida. Los resultados se presentan como el valor calculado para el volumen de la región empobrecida en DARPP-32 para cada animal. En todos los casos, las imágenes, mediciones y cuantificaciones se realizaron con enmascaramiento del tratamiento.

5 Análisis cuantitativo de inmunohistoquímica en ratones transgénicos MJD

Cuantificación del volumen del cerebelo: El volumen del cerebelo se evaluó con enmascaramiento barriendo el área por lóbulo en 8 secciones teñidas con violeta de cresilo, cubriendo toda la extensión del cerebelo. El volumen del cerebelo se obtuvo multiplicando el área total por la distancia entre secciones en serie (320 μ m).

10 Cuantificación del tamaño de las capas granulares y moleculares: La cuantificación se realizó a lo largo de 4 secciones de tinción con violeta de cresilo repartidas en la extensión anteroposterior del cerebelo con enmascaramiento, utilizando un objetivo de 20x. Para cada sección, el tamaño de las capas se evaluó con enmascaramiento por lóbulo en 3 a 5 mediciones diferentes (dependiendo del tamaño del lóbulo).

15 Cuantificación de células de Purkinje: Se adquirieron imágenes de fluorescencia de 8 secciones sagitales que cubrían todo el cerebelo, teñidas con anti-calbindina y DAPI, con un microscopio Zeiss Axio Imager Z2 utilizando un objetivo de 20x. Para cada sección y el número de células de Purkinje se contaron manualmente para cada lóbulo del cerebelo con enmascaramiento. Los datos se representan como el valor medio del número de células de Purkinje en todo el cerebelo o por lóbulo.

20 Cuantificación de agregados de ubiquitina: El número de agregados de ubiquitina se evaluó en los lóbulos 9 y 10 automáticamente usando el software Cell Profiler, a partir de imágenes de 8 secciones sagitales que cubrían todo el cerebelo, teñidas con anti-ubiquitina y DAPI que se adquirieron con un microscopio Zeiss Axio Imager Z2 usando un objetivo de 20x. Los módulos de análisis aplicados fueron los mismos para todos los animales e imágenes. Los datos se representan como el número medio de agregados de ubiquitina por sección.

Tinción con violeta de cresilo

25 Las secciones de cerebelo se tiñeron con violeta de cresilo durante 2 minutos, se diferenciaron en tampón de acetato pH 3.8 a 4 (acetato de sodio al 2.72% y ácido acético al 1.2%; 1:4 v/v), se deshidrataron pasándolas dos veces por soluciones de etanol y toluol y se montaron con Eukitt® (O. Kindler GmbH & CO. Friburgo, Alemania).

Cultivo y transfección de células de neuroblastoma

30 La línea celular de neuroblastoma de ratón (células N2a) obtenida del banco de biología celular American Type Culture Collection (CCL-131) se mantuvo en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 mg/ml (Gibco) a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5 %/aire. La Atx3 mutante humana de longitud completa con 84 glutaminas (pEGFP-Atx3Q84; (Chai et al., 2002) se transfectó en las células Neuro2A utilizando PEI (polietilenimina) y una concentración total de 0.5 mg de cada ADN. Las células se lisaron para procesamiento de transferencia Western 48 horas después de la transfección.

Medición de flujo autofágico

35 El flujo autofágico se midió por medio del ensayo de renovación de LC3B, que se utiliza para cuantificar la cantidad de LC3B-II que es suministrada a los lisosomas (Aveleira et al., 2015). Para este fin, se midieron los niveles de LC3B-II en presencia y ausencia de cloroquina (ChQ, SIGMA, 100 μ m), un inhibidor de la degradación autolisosomal. El flujo autofágico se calculó restando el valor densitométrico de LC3B-II en muestras sin cloroquina (LC3B-II - ChQ) de la muestra correspondiente tratada con cloroquina (LC3B-II + ChQ) para cada condición.

40 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando la prueba de Mann-Whitney y la prueba t de Student de datos emparejados o no emparejados o ANOVA para comparaciones múltiples. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. Se establecieron umbrales significativos en $P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$, tal como se define en el texto. Todos los análisis se realizaron con GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, EE. UU.).

45 Resultados

Niveles reducidos de los niveles de proteína CYP46A1 en el cerebelo de ratones transgénicos MJD

50 Los niveles de CYP46A1 se evaluaron en biopsias congeladas de seis ratones transgénicos MJD que expresan la ATXN3 humana truncada N-terminal, con 69 repeticiones CAG y seis crías de la misma camada de control de la misma edad mediante transferencia Western. En particular, se analizaron los niveles de proteína CYP46A1 en el cerebelo, ya que la ataxina-3 humana mutante se expresaba específicamente en las células de Purkinje del cerebelo (Oue et al., 2009). Como región de control, se utilizó el "resto del cerebro" (todo el tejido cerebral excepto el cerebelo), en el que no se detectó expresión de ataxina-3 humana mutante (Figura 1). El análisis de transferencia Western demostró

una reducción de 24.3% en los niveles de proteína CYP46A1 (prueba de Mann-Whitney; $p = 0.026$) en biopsias de cerebelo de ratones MJD con respecto a crías de la misma camada de control (Figura 2A y B). Por el contrario, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en extractos del "resto del cerebro" entre ratones MJD y crías de la misma camada de control (prueba de Mann-Whitney; $p = 0.13$) (Figura 2C y D).

- 5 En general, estos datos respaldan la relevancia de CYP46A1, una enzima clave en la ruta del metabolismo del colesterol, como objetivo terapéutico en las ataxias espinocerebelosas humanas, en particular, la MJD.

Desregulación de la ruta del metabolismo del colesterol en el cerebro de ratones transgénicos MJD

10 Para determinar el impacto de la deficiencia de CYP46A1 en la MJD, se analizó el metabolismo del colesterol realizando mediciones cuantitativas tanto de esteroides como de oxisteroides por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS) en extractos de cerebelo de ratones MJD Q69 y crías de la misma camada de la misma edad. Por lo tanto, se midieron el lanosterol, el primer esteroide de la ruta metabólica del colesterol, junto con los productos intermedios del colesterol de las rutas de Kandutsch-Russell (latosterol) y Bloch (desmosterol). Primero se comparó el contenido de colesterol y 24S-OHC y se observó una reducción estadísticamente significativa (21.3%) en los niveles de 24S-OHC en ratones MJD Q69 ($20.62 \pm 1.14 \mu\text{g/g}$; $n=6$) con respecto a crías de la misma camada de tipo silvestre ($26.19 \pm 0.78 \mu\text{g/g}$; $n=6$, prueba T de Student, $P=0.002$) (Figura 3A). No se observaron diferencias estadísticamente significativas para el contenido de colesterol del cerebelo entre ratones MJD y ratones de tipo silvestre (Figura 3A). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los oxisteroides 25S-OHC y 27S-OHC y para el resto de los esteroides (lanosterol, 7-latosterol, desmosterol, 7-DHC y 8-DHC) (Figura 3A).

20 Como la ataxina-3 humana mutante sólo se expresa en las células de Purkinje del cerebelo, se usó el "resto del cerebro" para medir los niveles de los oxisteroides y esteroides mencionados anteriormente. Sorprendentemente, se detectó un aumento estadísticamente significativo en los niveles de 24S-OHC en el "resto del cerebro" de ratones MJD Q69 ($6.32 \pm 0.40 \mu\text{g/g}$; $n=6$), respecto a crías de la misma camada de control ($4.68 \pm 0.37 \mu\text{g/g}$; $n=6$, prueba T de Student, $P=0.013$) (Figura 3B). También se encontró un aumento estadísticamente significativo en los niveles de colesterol en ratones MJD Q69 ($10.74 \pm 0.41 \text{ mg/g}$; $n=6$) en comparación con ratones de tipo silvestre ($8.68 \pm 0.53 \text{ mg/g}$; $n=6$; prueba T de Student, $P=0.011$) (Figura 3B). Los niveles del desmosterol, precursor del colesterol, aumentaron en ratones MJD Q69 ($243.0 \pm 14.93 \mu\text{g/g}$; $n=6$) respecto a los ratones de tipo silvestre ($172.5 \pm 14.6 \mu\text{g/g}$; $n=6$; prueba T de Student, $P=0.007$), así como los niveles de 7-latosterol ($4.68 \pm 0.37 \mu\text{g/g}$ en ratones normales; $n=6$ frente a $6.32 \pm 0.40 \mu\text{g/g}$ en ratones MJD Q69; $n=6$; prueba T de Student, $P=0.054$) (Figura 3B). En la misma línea, los niveles de lanosterol aumentaron ligeramente en ratones MJD Q69 ($4.30 \pm 0.30 \mu\text{g/g}$; $n=6$) en comparación con ratones de tipo silvestre ($3.46 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$; $n=6$, prueba T de Student, $P=0.07$) (Figura 3B). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el 7-deshidrocolesterol (7-DHC) y para el 8-deshidrocolesterol (8-DHC). Además, los niveles del oxisterol 27-OHC se redujeron en ratones MJD Q69 ($0.21 \pm 0.035 \mu\text{g/g}$; $n=6$) respecto a ratones de tipo silvestre ($0.60 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$; $n=6$; prueba T de Student $P=0.0006$). No se observaron diferencias en los niveles de 25-OHC entre MJD Q69 y ratones de tipo silvestre (Figura 3B).

- 35 En conjunto, estos resultados sugieren alteraciones en la ruta del metabolismo del colesterol en regiones afectadas por MJD tales como el cerebelo (en el que se expresa específicamente la ATXN3 mutante) y también en regiones en las que no se detecta ATXN3 mutante (resto del cerebro).

La sobreexpresión de CYP46A1 alivia la neuropatología en un modelo de ratón MJD basado en LV

40 A continuación, la invención investigó si la regulación por aumento de la ruta del metabolismo del colesterol, a través del aumento de los niveles de CYP46A1, podría mejorar la eliminación de ataxina-3 mutante, retrasando así el establecimiento de la neuropatología asociada a la MJD. A continuación, se evaluó el efecto terapéutico de la sobreexpresión de CYP46A1 en el modelo de ratón MJD basado en LV (Alves et al., 2008b; Nobrega et al., 2013). Para este propósito, se coexpresaron LV que codifica ataxina-3 humana mutante y un AAV que codifica CYP46A1 en el cuerpo estriado de un modelo de ratón MJD y se sacrificaron los ratones dos meses después de la inyección. La inmunohistoquímica dirigida por HA puso de manifiesto la presencia del marcador HA en ratones LV-MJD a los que se inyectó AAVrh.10-CYP46A1, pero no en el grupo de control al que se inyectó AAVrh.10-GFP (Figura 4A). Por el contrario, en ratones a los que se inyectó AAVrh.10-GFP, se detectó una inmunorreactividad de GFP robusta y generalizada en el cerebro del ratón, mientras que no se detectaron señales positivas para HA (Figura 4A).

50 En el modelo de ratón MJD, la inmunohistoquímica (con el anticuerpo 1H9) y el análisis cuantitativo para las inclusiones positivas para ataxina-3 mutante (Figura 4A) pusieron de manifiesto una disminución estadísticamente significativa mediada por CYP46A1 (~59%) en el número de inclusiones positivas para ataxina-3 (2751 ± 267.8 ; $n=8$) en comparación con el grupo de control (ratones con coinyección de GFP; 6684 ± 717.2 inclusiones; $n=8$; prueba T de Student, $P=0.0002$) (Figura 4B). La superficie de las inclusiones también se analizó y demostró una disminución estadísticamente significativa en el tamaño de las inclusiones (~47%) en ratones LV-MJD tratados con AAVrh.10-CYP46A1 (59.29 ± 4.67 unidades arbitrarias (u.a.); $n=8$) en comparación con ratones LV-MJD a los que se inyectó el control AAVrh.10-GFP (111.4 ± 3.96 u.a.; $n=8$; prueba T de Student, $P<0.0001$) (Figura 4B). Estos resultados se completaron con inmunotinción anti-ubiquitina que demostró una reducción en el número de inclusiones ubiquitinadas en ratones LV-MJD a los que se inyectó AAVrh.10-CYP46A1 respecto a ratones LV-MJD en los que se inyectó el control AAVrh.10-GFP (Figura 4A). En vista de estos resultados, a continuación se inspeccionó si la eliminación de

ataxina-3 humana mutante conferiría neuroprotección en el modelo de ratón LV-MJD. Se ha descrito que la sobreexpresión de ataxina-3 mutante basada en LV en el cuerpo estriado de ratón promueve el empobrecimiento del marcador neuronal DARPP-32, que se puede cuantificar con precisión (Alves et al., 2008b). Por lo tanto, se realizó inmunohistoquímica para DARPP-32 (Figura 4D). La sobreexpresión de CYP46A1 condujo a una reducción estadísticamente significativa ($\sim 48\%$) de la disfunción neuronal, evaluada por la disminución de la región empobrecida en DARPP-32 a los 2 meses ($0.48 \pm 0.77 \text{ mm}^3$; $n=8$) respecto a los ratones LV-MJD a los que se inyectó el control AAVrh.10-GFP ($0.91 \pm 0.14 \text{ mm}^3$; $n=8$) Prueba t de Student; $P=0.015$).

En general, estos datos respaldan que la sobreexpresión de CYP46A1 tiene propiedades terapéuticas, promoviendo la eliminación de la ataxina-3 humana mutante mal plegada, lo que confiere la conservación de los marcadores neuronales y la neuroprotección en un modelo de ratón LV-MJD.

La terapia génica de CYP46A1 mediada por AAV mejora la neuropatología y la coordinación motora en ratones transgénicos MJD

Se realizó la siguiente investigación de si la regulación por aumento de CYP46A1 aliviaría las deficiencias motoras y del cerebelo después del inicio de la enfermedad, usando un modelo de ratón MJD transgénico (Torashima et al., 2008). Este modelo se caracteriza por un fuerte fenotipo motor y neuropatológico y es particularmente adecuado para ensayar terapias moleculares (Nobrega et al., 2014; Mendonca et al., 2015; Nobrega et al., 2015). Para evaluar el potencial de la sobreexpresión de CYP46A1 para mejorar el fenotipo motor de ratones transgénicos MJD con deficiencias motoras graves, se inyectó AAVrh10 que codifica CYP46A1 o GFP (control) en el cerebelo de ratones transgénicos MJD adultos y se evaluó el rendimiento motor cada 2/4 semanas hasta 10 semanas después de la inyección del virus. Usando el ensayo del Rotarod a velocidad constante (Fig. 5A) y el ensayo del Rotarod acelerado (Fig. 5B) se observó que, en el momento de la inyección, los ratones transgénicos MJD ya mostraban alteraciones motoras marcadas, en comparación con los ratones de tipo silvestre (WT). Además, a lo largo del estudio, los ratones que expresan CYP46A1 tienen un mejor rendimiento motor en comparación con los ratones GFP, aunque solo 10 semanas después de la inyección de AAV, la diferencia de latencia de caída observada entre los ratones que expresan CYP46A1 y GFP se volvió significativa (Fig. 5A, CYP 53.07 s frente a GFP 17.48 s) para ambos ensayos del Rotarod. Esta mejora en la función motora se analizó más a fondo con el ensayo del patrón de huellas, en concreto el ensayo de la base trasera. Se observó que los ratones tratados con AAVrh10-CYP46A1 tienen una tendencia a un mejor rendimiento de la base trasera a las 10 semanas después de la inyección del virus (Fig. 5C, AAVrh10-CYP46A1: $3.17 \pm 0.07 \text{ cm}$ frente a AAVrh10-GFP: $3.40 \pm 0.11 \text{ cm}$); sin embargo, no se observó diferencia significativa entre ambos grupos con este ensayo.

Para investigar si las mejoras en la función motora también estaban relacionadas con las mejoras neuronales, se evaluaron a continuación el número de agregados y la neuropatología del cerebelo de los ratones que recibieron inyección. Como en (Nobrega et al., 2013b; Nobrega et al., 2014), la transducción de vectores virales se detectó con preferencia en los lóbulos IX y X de la corteza cerebelosa. De acuerdo con los datos de comportamiento, el número promedio de agregados de ubiquitina se redujo significativamente en los lóbulos transducidos en ratones a los que se inyectó AAVrh10-CYP46A1 en comparación con los controles a los que se inyectó AAVrh10-GFP (Fig. 6). Este modelo de ratón transgénico se caracteriza por una pérdida de células de Purkinje y una fuerte desorganización de la corteza cerebelosa (Oue et al., 2009). Es importante destacar que el número promedio de células de Purkinje era significativamente mayor en los animales a los que se inyectó AAVrh10-CYP46A1 en comparación con los controles (Fig. 6). Además, el volumen del cerebelo era mayor en los lóbulos IX y X en ratones a los que se inyectó AAVrh10-CYP46A1, así como el espesor de la capa granular (Fig. 6). En conjunto, estos datos muestran que la regulación por aumento de CYP46A1 media un alivio fuerte del fenotipo motor y las anomalías neuropatológicas en un modelo de ratón transgénico MJD grave-progresivo.

La sobreexpresión de CYP46A1 induce autofagia y elimina ATXN3 mutante en células Neuro2A

A continuación, se investigó el mecanismo molecular de la acción de CYP46A1 y su impacto en las células Neuro2A que expresan ATXN3 mutante (EGFP-Q84). El análisis de los niveles de especies de ATXN3 mutantes por transferencia Western puso de manifiesto que la sobreexpresión de CYP46A1 reduce significativamente esos niveles en comparación con las condiciones de control (Fig. 7A), tanto en agregados (1 ± 0.0 frente a 0.449 ± 0.11 ; $n=4$; Fig. 7B), así como en la proteína soluble (1 ± 0.0 frente a 0.09 ± 0.06 ; $n=4$; Figura 7C). Basándose en estos resultados, a continuación se realizaron investigaciones para determinar si CYP46A1 estaba reduciendo la ATXN3 mutante a través de la autofagia, como una ruta celular principal para eliminar especies agregadas (Fig. 8A). De hecho, se encontró que la sobreexpresión de CYP46A1 aumentó significativamente los niveles de LC3B-II (2.12 ± 0.35 ; $n=4$) en comparación con la condición de control (1 ± 0.0 ; $n=4$). Este aumento en los niveles de LC3B-II fue aún mayor tras la sobreexpresión de CYP46A1 en comparación con la condición de inanición (control positivo de autofagia; 1.58 ± 0.02 ; $n=4$) (Fig. 8B). Además, en presencia del inhibidor de la autofagia (cloroquina - ChQ) los resultados observados siguen la misma tendencia, es decir, un aumento en los niveles de LC3B-II tras la sobreexpresión de CYP46A1 (6.74 ± 1.31 ; $n=4$) en comparación con la condición de control (2.83 ± 0.44 ; $n=4$) (Figura 8B). Además, la sobreexpresión de CYP46A1 aumentó significativamente el flujo autofágico, destacado por un aumento en el flujo neto de LC3B-II (2.80 ± 0.16 ; $n=4$) en comparación con la condición de control (1 ± 0.0 ; $n=4$) (Fig. 8C).

En conjunto, estos resultados muestran que CYP46A1 es un potente modulador de ATXN3 mutante, reduciendo sus niveles a través de una activación robusta de la ruta de autofagia.

5 Así, se demostró que los niveles de CYP46A1 están disminuidos en extractos de cerebelo de ratones MJD/PoliQ. También se mostró que la sobreexpresión de AAVrh10-CYP46A1 en un modelo de ratón animal de MJD basado en lentivirus confería neuroprotección al reducir la acumulación de ataxina-3 humana mutante, asociada a la conservación de marcadores neuronales. Esto se confirmó en ratones transgénicos MJD adultos, en los que la sobreexpresión de AAVrh10-CYP46A1 en el cerebelo indujo un alivio notable de las alteraciones del comportamiento motor correlacionado con la mitigación de la neuropatología asociada a la MJD, en particular, la disminución de la proteína mal plegada y la reducción de la pérdida de células de Purkinje y de la contracción de la capa celular en el cerebelo.

10 Por lo tanto, AAV-CYP46A1 reduce la acumulación de ataxina-3 mal plegada, aliviando la neuropatología asociada a la MJD y, por lo tanto, mejorando los defectos del comportamiento motor.

Sorprendentemente, se demostró en células de neuroblastoma que CYP46A1 activa la autofagia disminuyendo la deposición de ATXN3 mutante.

Por lo tanto, estos resultados respaldan a CYP46A1 como un objetivo terapéutico relevante para las SCA.

Referencias

- Alves, S., et al., 2008a. Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease. *PLoS One*. 3, e3341.
- Alves, S., et al., 2008b. Striatal and nigral pathology in a lentiviral rat model of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*. 17, 2071-83.
- Alves, S., et al., 2010. Silencing ataxin-3 mitigates degeneration in a rat model of Machado-Joseph disease: no role for wild-type ataxin-3? *Hum Mol Genet*. 19, 2380-94.
- Bjorkhem, I., et al., 1998. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J Lipid Res*. 39, 1594-600.
- Burk, K., et al., 1999. Autosomal dominant cerebellar ataxia type I: oculomotor abnormalities in families with SCA1, SCA2, and SCA3. *J Neurol*. 246, 789-97.
- Chevy, F., Humbert, L., Wolf, C., 2005. Sterol profiling of amniotic fluid: a routine method for the detection of distal cholesterol synthesis deficit. *Prenat Diagn*. 25, 1000-6.
- Durr, A., et al., 1996. Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: Clinical, molecular, and neuropathological features. *Annals of Neurology*. 39, 490-499.
- Dzeletovic, S., et al., 1995. Time course of oxysterol formation during in vitro oxidation of low density lipoprotein. *Chem Phys Lipids*. 78, 119-28.
- Hudry, E., et al., 2010. Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Mol Ther*. 18, 44-53.
- Kawaguchi, Y., et al., 1994. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet*. 8, 221-8.
- Kotin, et al. 1994. Parvoviridae and their Replication. *Fundamental Virology*.

Klockgether, T., et al., 1998. Autosomal dominant cerebellar ataxia type I. MRI-based volumetry of posterior fossa structures and basal ganglia in spinocerebellar ataxia types 1, 2 and 3. *Brain*. 121 (Pt 9), 1687-93.

Lukas C., et al., 2008. Spinal cord atrophy in spinocerebellar ataxia type 3 and 6 : impact on clinical disability. *J Neurol*. 2008 Aug;255(8):1244-9. doi: 10.1007/s00415-008-0907-6. Epub 2008 Jun 5.

McCarty, DM., et al., 2001. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *gene Ther*. 2001 Aug;8(16):1248-54.

Nobrega, C., et al., 2013. Overexpression of mutant ataxin-3 in mouse cerebellum induces ataxia and cerebellar neuropathology. *Cerebellum*. 12, 441-55.

Orr, H.T., Zoghbi, H.Y., 2007. Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci*. 30, 575-621.

Oue, M., et al., 2009. Characterization of mutant mice that express polyglutamine in cerebellar Purkinje cells. *Brain Res*. 1255, 9-17.

Rub, U., et al., 2006. Degeneration of ingestion-related brainstem nuclei in spinocerebellar ataxia type 2, 3, 6 and 7. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 32, 635-49.

Rub, U., Brunt, E.R., Deller, T., 2008. New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Curr Opin Neurol*. 21, 111-6.

Schols, L., et al., 1997. Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Ann Neurol*. 42, 924-32.

Schols, L., et al., 2004. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol*. 3, 291-304.

Torashima, T., et al., 2008. Lentivector-mediated rescue from cerebellar ataxia in a mouse model of spinocerebellar ataxia. *EMBO Rep*. 9, 393-9.

Benjamin E. Deverman et al., 2016. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat Biotechnol*. 34(2):204-209.

REIVINDICACIONES

1. Un vector para usar en el tratamiento de una ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina, cuyo vector comprende un ácido nucleico que codifica la colesterol 24-hidroxilasa.
- 5 2. El vector para usar en el tratamiento de una ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina según la reivindicación 1, en donde la ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina se selecciona del grupo de ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1), ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2), ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3), ataxia espinocerebelosa tipo 6 (SCA6), ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) y ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA17).
- 10 3. El vector para usar en el tratamiento de una ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina según la reivindicación 1, en donde la ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina es la ataxia espinocerebelosa de tipo 3 (SCA3).
4. El vector para usar en el tratamiento de una ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- 15 5. El vector para usar en el tratamiento de una ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1.
6. El vector para usar en el tratamiento de una ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se selecciona del grupo de vectores de adenovirus, lentivirus, retrovirus, herpesvirus y virus adenoasociados (AAV).
- 20 7. El vector para usar en el tratamiento de una ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es un vector AAV.
8. El vector para usar en el tratamiento de una ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina según la reivindicación 7, que es un vector AAV9 o AAV10, tal como AAVrh.10, preferiblemente un AAVrh.10.
9. El vector para usar en el tratamiento de una ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es para administrar directamente en el cerebro del paciente.
- 25 10. El vector para usar en el tratamiento de una ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina según la reivindicación 9, que es para administrar al cerebelo, tronco encefálico, sustancia negra, cuerpo estriado, lóbulos frontotemporales y/o corteza visual, preferiblemente al cerebelo.
11. El vector para usar en el tratamiento de una ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es para administrar en la médula espinal del paciente.
- 30 12. El vector para usar en el tratamiento de una ataxia espinocerebelosa de repetición de poliglutamina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que se administra por inyección intravascular, intravenosa, intranasal, intraventricular o intratecal.
- 35 13. Una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de ataxias espinocerebelosas de repetición de poliglutamina, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

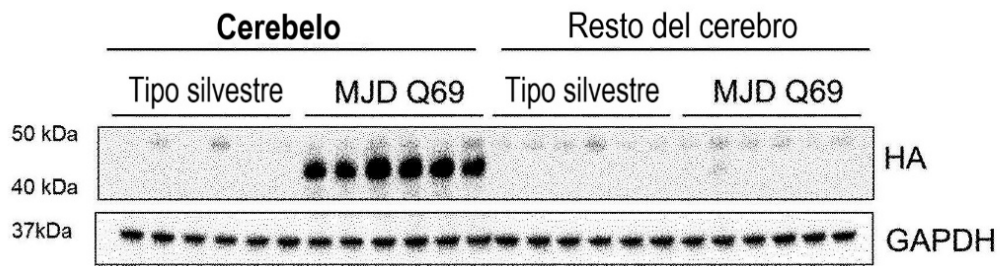


FIGURA 1

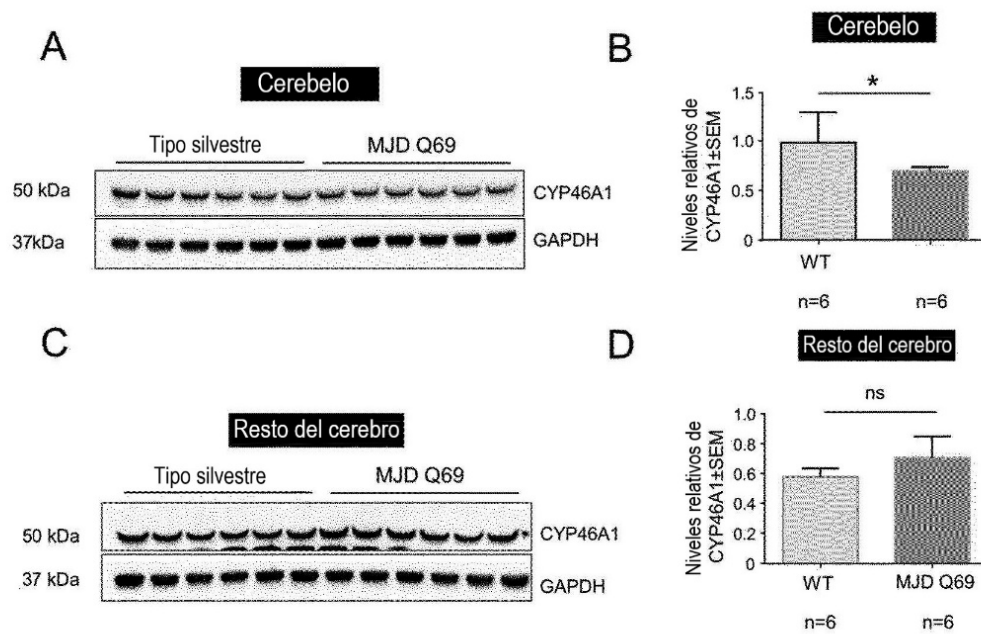


FIGURA 2

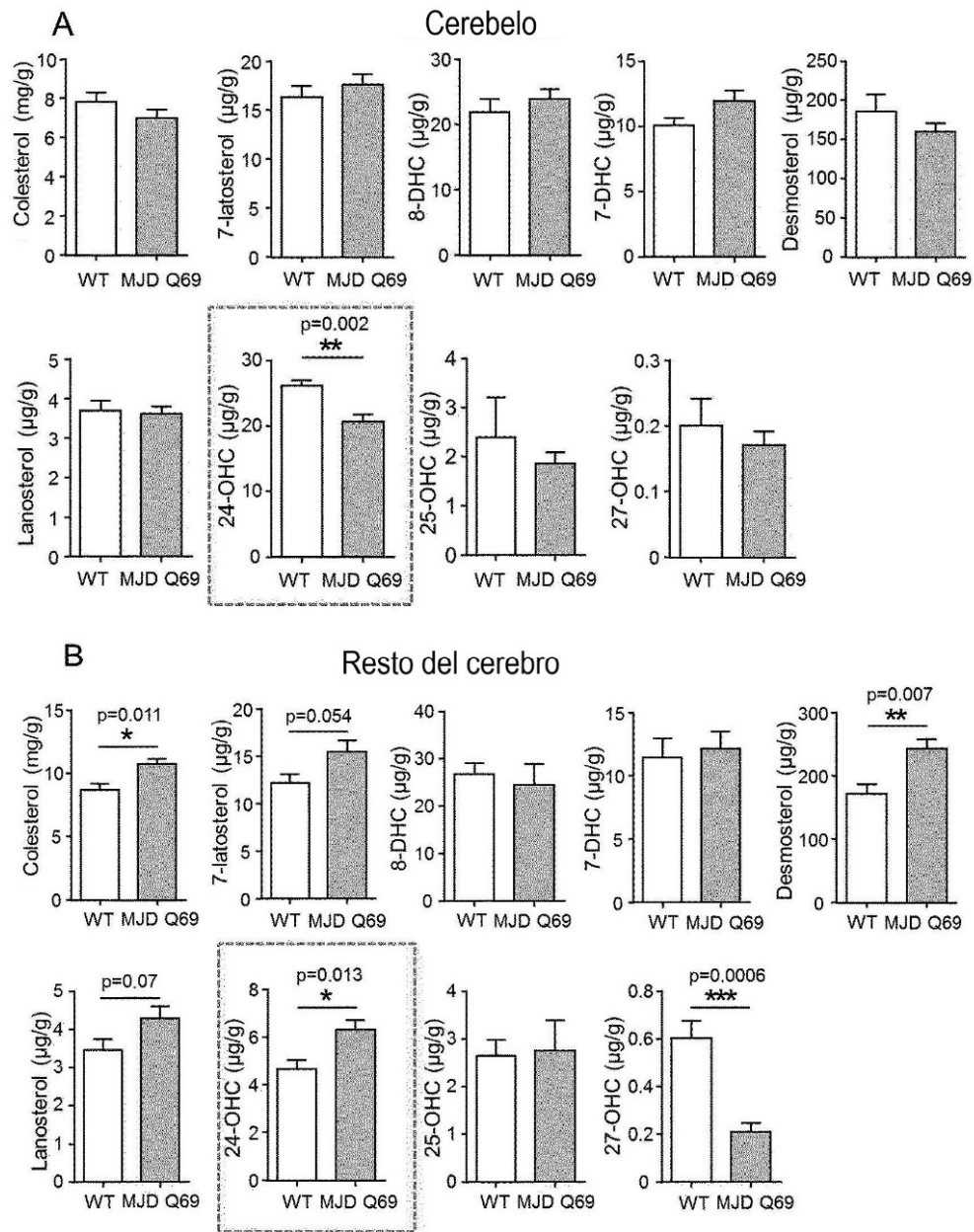


FIGURA 3

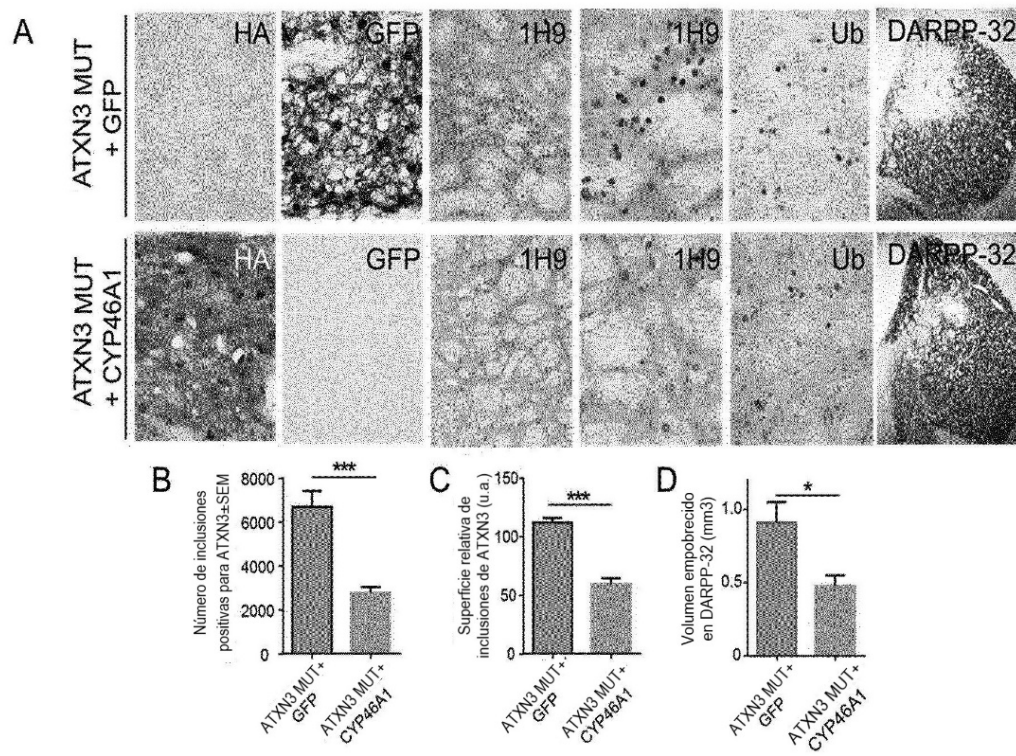


FIGURA 4

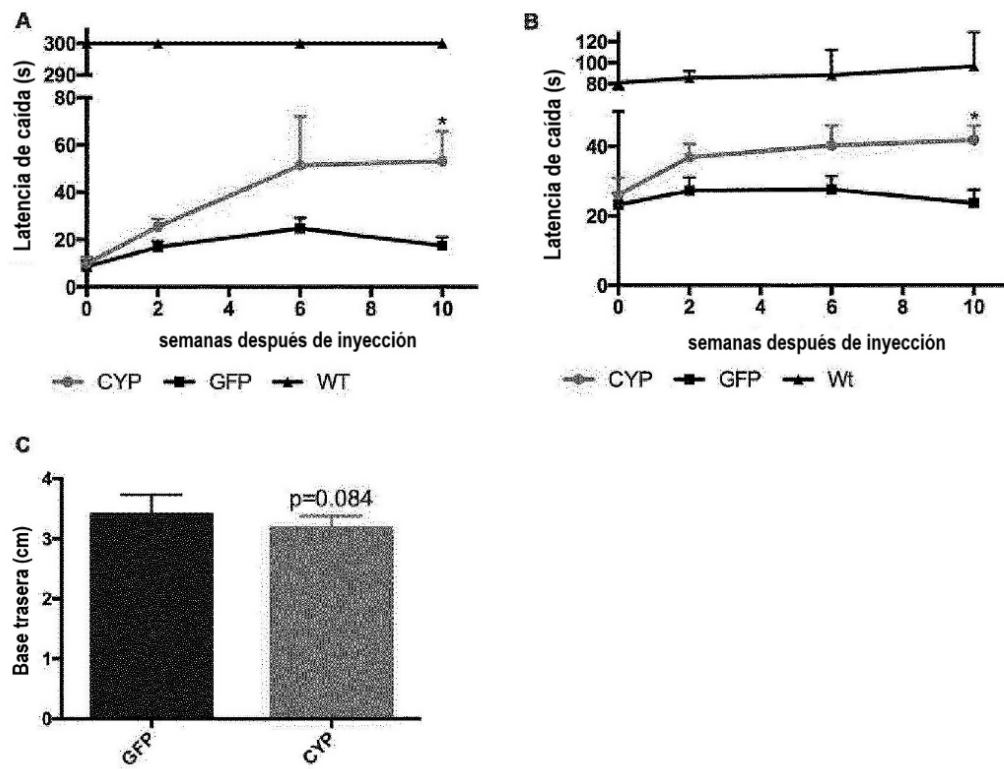


FIGURA 5

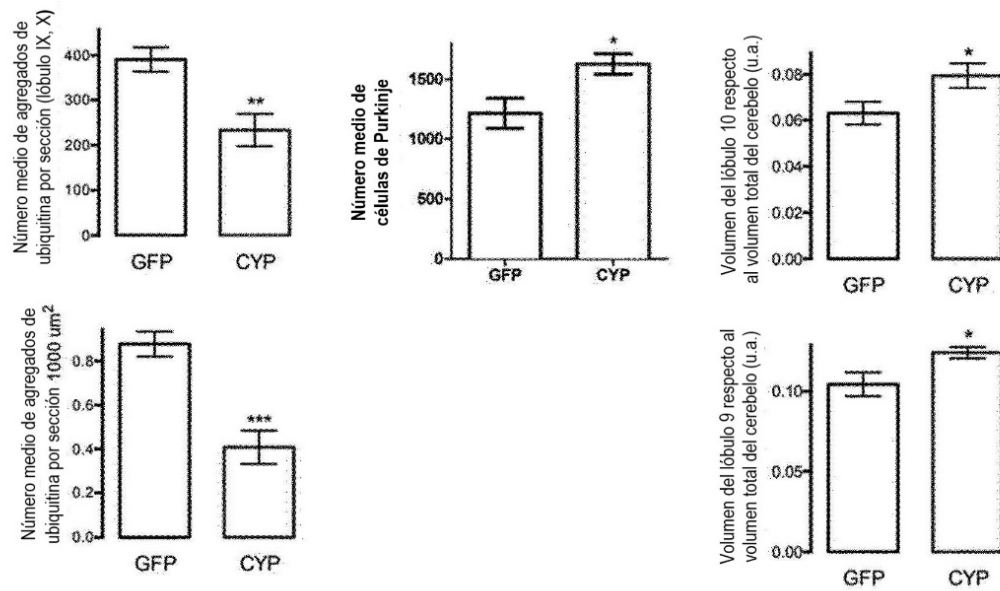


FIGURA 6

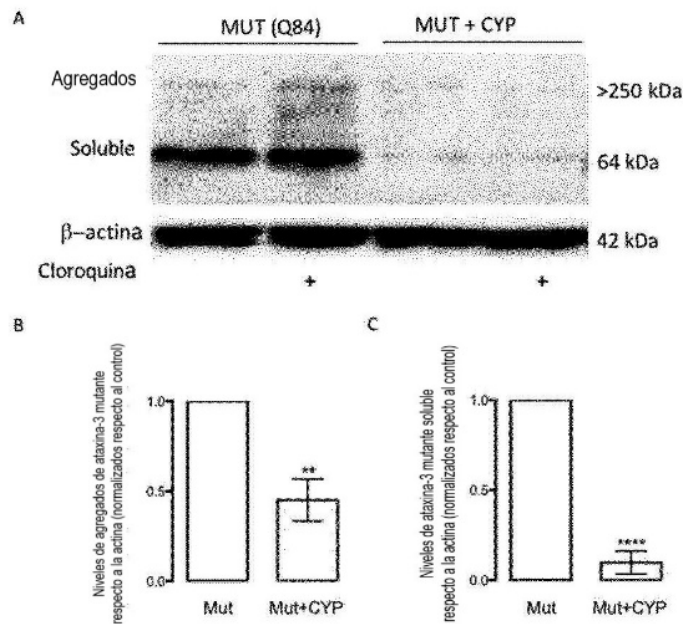


FIGURA 7

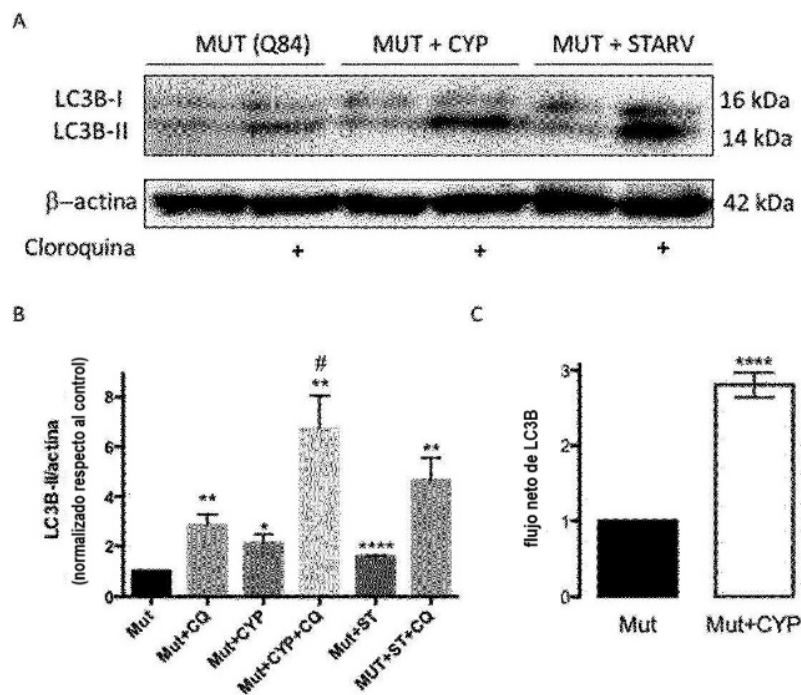


FIGURA 8