



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

(21) **PI0611540-3 A2**

(22) Data de Depósito: 02/05/2006
(43) Data da Publicação: 21/09/2010
(RPI 2072)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 48/00
C12N 15/86

(54) Título: **TERAPIA DE GENE PARA DISTÚRBIOS DE ESPINHA DORSAL**

(30) Prioridade Unionista: 02/05/2005 US 60/677,213,
08/04/2006 US 60/790,217

(73) Titular(es): GENZYME CORPORATION

(72) Inventor(es): JAMES DODGE, LAMYA SHIHABUDDIN,
MARCO A. PASSINI, SENG H. CHENG

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2006016943 de 02/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/119341 de 09/11/2006

(57) Resumo: TERAPIA DE GENE PARA DISTÚRBIOS DE ESPINHA DORSAL. A presente invenção refere-se a métodos e composições para tratar distúrbios ou lesões que afetam a função motora e controle em um indivíduo. Em um aspecto, a invenção fornece um método para liberar um transgene à espinha dorsal de um indivíduo administrando um vetor viral neurotrópico recombinante contendo o transgene. O vetor viral libera o transgene a uma região da região dos núcleos cerebelares profundos do cérebro. Também fornecidos são composições e métodos para liberar um transgene à espinha dorsal de um indivíduo administrando um vetor viral neurotrópico recombinante contendo o transgene à região do córtex motor do cérebro do indivíduo.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**TERAPIA DE GENE PARA DISTÚRBIOS DE ESPINHA DORSAL**".

Este pedido de patente reivindica prioridade sob 35 U. S. C. § 119(e) para o Pedido Provisório US Nº 60/677.213, depositado em 2 de maio de 2005, e Pedido de patente Provisório US Nº 60/790.217, depositado em 8 de abril de 2006, os conteúdos dos quais são aqui incorporados por referência.

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se às composições e métodos para tratar distúrbios que afetam a função motora de um sujeito e em particular, função motora afetada por doença ou lesão ao cérebro e/ou espinha dorsal.

Antecedentes da Invenção

Terapia de gene é uma modalidade de tratamento emergente para distúrbios que afetam o sistema nervoso central (CNS). Terapia de gene do CNS foi facilitada pelo desenvolvimento de vetores virais capazes de infectar eficazmente neurônios pós-mitóticos. O sistema nervoso central é composto da espinha dorsal e do cérebro. A espinha dorsal leva informação sensória do sistema nervoso periférico para o cérebro e leva informação motora do cérebro para vários efetores. Para uma revisão de vetores virais para liberação de gene para o sistema nervoso central, vide Davidson et al. (2003) *Nature Rev.* 4:353-364.

Vetores associados a adenovírus (AAV) são considerados úteis para terapia de gene do CNS porque eles têm um perfil de toxicidade e de imunogenicidade favorável, são capazes de transduzir células neuronais e são capazes de mediar expressão a longo prazo no CNS (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 dos vetores de AAV encontra-se na habilidade de alguns vetores de AAV de sofrer transporte retrógrado e/ou anterógrado em células neuronais. Neurônios em uma região do cérebro são interconectados por axônios às regiões do cérebro distais assim provendo um sistema de transporte para liberação de vetor. Por exemplo, um vetor de AAV pode ser administrado no ou próximos dos terminais dos axônios dos neurô-

5 nios. Os neurônios interiorizam o vetor de AAV e o transportam de uma maneira retrógrada ao longo do axônio para o corpo celular. Propriedades similares de adenovírus, HSV, e vírus de pseudorraivas foram demonstradas liberar genes para as estruturas distais dentro do cérebro (Soudas et al. (2001) *FASEB J.* 15:2283-2285; Breakefield et al. (1991) *New Biol.* 3:203-218; e deFalco et al. (2001) *Science*, 291 :2608-2613).

Vários grupos relataram que a transdução do cérebro por sorotipo de AAV 2 (AAV2) é limitado ao sítio de injeção intracraniano (Kaplitt et al. (1994) *Nat. Genet.* 8:148-154; Passini et al. (2002) *J. Neurosci.* 22:6437-6446; e Chamberlin et al. (1998) *Brain Res.* 793:169-175). Recentes relatórios sugerem que transporte axonal retrógrado dos vetores virais neurotrópicos pode também ocorrer em circuitos seletos do cérebro de rato normal (Kaspar et al. (2002) *Mol. Ther.* 5:50-56 (vetor de AAV); Kasper et al. (2003) *Science* 301:839-842 (vetor lentiviral) e Azzouz et al. (2004) *Nature* 429:413-417 (vetor lentiviral). Roaul et al. (2005) *Nat. Med.* 11(4):423-428 e Ralph et al. (2005) *Nat. Med.* 11(4):429-433 relatam que injeção intramuscular de lentivírus expressam RNA de interferência de superóxido dismutase de Cu/Zn humano (SOD1) retardou o princípio da doença de esclerose lateral amiotrófica (ALS) em um modelo roedor terapeuticamente relevante de ALS.

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

30 Porém, uma necessidade ainda existe por composições e métodos para tratar disfunção da espinha dorsal que resulta em perda da função motora em pacientes humanos. Esta invenção satisfaz esta necessidade e fornece vantagens relacionadas também.

Sumário da Invenção

Esta invenção fornece métodos e composições para liberar um

transgene à espinha dorsal e / ou à região do tronco cerebral de um sujeito administrando um vetor viral neurotrópico recombinante contendo o transgene a pelo menos uma região da região dos núcleos cerebelares profundos (DCN) do cérebro do sujeito. A liberação viral está sob condições que favorecem expressão do transgene na espinha dorsal e / ou na região do tronco cerebral.

Em outro aspecto, a invenção fornece métodos e composições para liberar um transgene à espinha dorsal de um sujeito administrando um vetor viral neurotrópico recombinante contendo o transgene à região do córtex motor do cérebro do sujeito. A liberação do vetor viral está sob condições que favorecem expressão do transgene na espinha dorsal. Vetores virais administrados à região do córtex motor são interiorizados através de neurônios motores por meio de sua região do corpo celular e o transgene é expressado. O transgene expresso pode depois sofrer transporte anterógrado para a porção terminal de axônio do neurônio motor, que está presente na espinha dorsal. Devido à natureza do córtex motor, vetores virais administrados a esta região do cérebro podem também ser interiorizados por terminais dos axônios de neurônios motores. O vetor viral também pode sofrer transporte retrógrado ao longo do axônio do neurônio motor e ser expressado no corpo celular do neurônio motor.

Também fornecidos são composições e métodos para liberar um transgene a um neurônio motor em um sujeito administrando um vetor viral neurotrópico recombinante contendo o transgene a pelo menos uma região da região dos núcleos cerebelares profundos do cérebro do sujeito. A liberação do vetor está sob condições que favorecem expressão do transgene em um neurônio motor distal para o sítio de administração.

Também fornecidos são métodos e composições para liberar um transgene a um neurônio motor em um sujeito administrando um vetor viral neurotrópico contendo o transgene à região do córtex motor do cérebro do sujeito e em que a administração está sob condições que favorecem expressão do transgene em um neurônio motor distal ao sítio de administração.

Em um aspecto alternado, a invenção fornece composições e

métodos para tratar um distúrbio de neurônio motor em um sujeito administrando um vetor viral neurotrópico recombinante contendo um transgene terapêutico a pelo menos uma região da região dos núcleos cerebelares profundos do cérebro do sujeito. Administração é feita sob condições que favorecem expressão do transgene em uma quantidade terapeuticamente eficaz em pelo menos uma subdivisão da espinha dorsal e / ou na região do tronco cerebral.

Em ainda um aspecto adicional, a invenção fornece composições e método para melhorar os sintomas de um distúrbio de neurônio motor em um sujeito administrando um vetor viral neurotrópico recombinante contendo o transgene terapêutico à região do córtex motor do cérebro do sujeito e sob condições que favorecem expressão do transgene em uma quantidade terapeuticamente eficaz em pelo menos uma subdivisão da espinha dorsal e / ou da região do tronco cerebral.

É para ser entendido que tanto a descrição geral anterior como a descrição detalhada a seguir são exemplares e explicativas apenas e não são restritivas da invenção como reivindicada.

Breve Descrição das Figuras

A figura 1 é um esquemático de como o DCN poderia ser usado para transportar vírus terapêutico à espinha dorsal. Linhagens que originam dentro da caixa preta que esboça o DCN representam terminais dos axônios que originam de corpos celulares (pontas da flecha) localizados dentro da espinha dorsal.

A figura 2 é uma reprodução de uma seção transversal histológica através da junção de ponto-medular e cerebelo, mostrando as três regiões do DCN.

A figura 3 é uma vista esquemática do cerebelo que foi cortado ao longo da linhagem do verme (seção sagital) e depois aplainado, como também uma seção horizontal através da espinha dorsal e uma representação da musculatura esquelética. Ela mostra as vias aferentes principais (entrada).

A figura 4 é um diagrama mostrando as vias eferentes principais (saídas) do DCN.

A figura 5 esquematicamente mostra os circuitos neurais no córtex cerebral, ligando as entradas às saídas. As fibras trepadeiras originam na oliva inferior que recebe as entradas do córtex cerebral, espinha dorsal e sentidos especiais (visuais e audíveis). Entradas de fibra musgosa originam de todos os outros aferentes como aferentes vestibulares, aferentes espinhais, fusos musculares, órgãos de tendão de golgi, receptores de articulação, receptores de pele e o córtex cerebral. Há também três tipos de interneurônios inibidores no sistema intrínseco, incluindo células de cesta, células de golgi e células estreladas. Estes estão envolvidos na inibição lateral e na sintonia fina da função dos neurônios motores.

As figuras 2 a 5 são reproduzidas de Williams et al. (2005) *The Human Brain: Capítulo 3: The Cerebellum*, disponível no sítio de rede: www.vh.org/adult/provider/anatomy/BrainAnatomy/Ch3Text/Section07.html.

As figuras 6A a 6E mostram tingimento imunopositivos de esfingomielina de ácido humano ("hASM") em seções cerebelares sagitais seguindo injeção de vetores de sorotipo de AAV diferentes [(A)2/1, (B)2/2, (C)2/5, (D)2/7 e (E)2/8] codificando para ASM humana nos núcleos cerebelares profundos de camundongos de ASMKO.

As figuras 7A a 7E demonstram transporte de proteína de esfingomielina de ácido humano ("hASM") para a espinha dorsal dos núcleos cerebelares profundos. Este efeito foi observado em camundongos tratados com AAV2/2-ASM, AAV2/5-ASM, AAV2/7-ASM & AAV2/8-ASM (A) ampliação de 10X de hASM; (B) ampliação de 40X de hASM; (C) hASM confocal; (D) ChAT confocal; e (E) hASM confocal & ChAT.

A figura 8 graficamente mostra níveis de homogeneizado de tecido cerebelar seguindo injeção de vetores de sorotipo de AAV diferentes (2/1, 2/2, 2/5, 2/7 e 2/8) codificando para ASM humana nos núcleos cerebelares profundos (n=5/grupo). Grupos não conectados pela mesma letra são significativamente ($p < 0,0001$) diferentes.

As figuras 9A a 9G mostram tingimento imunopositivos de calbindina em seções cerebelares sagitais seguindo injeção de vetores de sorotipo de AAV diferentes [(A)2/1, (B)2/2, (C)2/5, (D)2/7 e (E)2/8] codificando

para ASM humana nos núcleos cerebelares profundos de camundongos de ASMKO.

As figuras 10A e 10B mostram desempenho de rotarod de aceleração e de oscilação (em 14 semanas de idade) em camundongos de ASMKO (injetados com AAV- β gal), WT e de ASMKO tratado com AAV-ASM (n=8/grupo). Grupos não conectados pela mesma letra são significativamente diferentes. Camundongos injetados com AAV2/1-ASM e AAV2/8-ASM demonstraram uma latência significativamente mais longa ($p < 0,0009$) para cair que os camundongos de ASMKO injetados com AAV2/1- β gal no teste de rotarod de aceleração. Para o teste de rotarod de oscilação, camundongos injetados com AA2/1-ASM demonstraram uma latência significativamente mais longa ($p < 0,0001$) para cair que os camundongos injetados com AAV2/1- β gal.

As figuras 11A e 11B mostram desempenho de rotarod em camundongos de ASMKO (n=8), WT (n=8) e bilateralmente tratados com AAV-ASM (n=5/grupo) (em 20 semanas de idade). Para teste tanto de aceleração como de oscilação, camundongos tratados com AAV-ASM desempenharam-se significativamente melhor ($p < 0,001$) que camundongos de ASMKO tratados com AAV2/1- β gal. Desempenho de camundongos injetados com AAV2/1-ASM foi indistinguível de camundongos do tipo selvagem em ambos os testes de aceleração e oscilação.

Figura 12A ilustra as conexões entre as regiões dos núcleos cerebelares profundos (mediana, interposta e lateral) e as regiões da espinha dorsal (cervical, torácica, lombar, e sacra). Figura 12B ilustra as conexões entre as regiões dos núcleos cerebelares profundos (mediana, interposta e lateral) e as regiões do tronco cerebral (cérebro médio, pons e medula). As conexões são representadas por setas que iniciam na região do corpo celular de um neurônio e termina na região terminal de axônio do neurônio. Por exemplo, as três regiões do DCN cada uma tem neurônios com corpos celulares que enviam axônios que terminam na região cervical da espinha dorsal enquanto a região cervical da espinha dorsal tiver corpos celulares que enviam axônios que terminam nas regiões mediais ou interpostas do DCN.

A figura 13 ilustra distribuição de proteína fluorescente verde no tronco cerebral, ou neurônios motores superiores, seguindo liberação de DCN de AAV que codifica para proteína fluorescente verde (GFP).

5 A figura 14 ilustra distribuição de proteína fluorescente verde nas regiões da espinha dorsal seguindo liberação de DCN de AAV que codifica para proteína fluorescente verde (GFP).

A figura 15 ilustra a redução no tingimento da proteína acídica fibrilar glial (GFAP) no tronco cerebral seguindo liberação de DCN de AAV que codifica para IGF-1 quando comparada à liberação de DCN de AAV que
10 codifica para GFP.

A figura 16 ilustra a redução no tingimento da proteína acídica fibrilar glial (GFAP) dentro dos núcleos oromotores (núcleo trigeminal, núcleo hipoglossal e núcleo facial) seguindo liberação de DCN de AAV que codifica para IGF-1 quando comparada à liberação de DCN de AAV que codifica pa-
15 ra GFP.

A figura 17 ilustra a redução no tingimento da proteína acídica fibrilar glial (GFAP) ao longo da espinha dorsal seguindo liberação de DCN de AAV que codifica para IGF-1 quando comparada à liberação de DCN de AAV que codifica para GFP.

20 A figura 18 ilustra a distribuição de mRNA de IGF-1 dentro do sistema nervoso central (CNS) seguindo liberação de DCN de AAV que codifica para IGF-1 quando comparada à liberação de DCN de AAV que codifica para GFP. Beta-actina é usada como um controle positivo para comparar níveis de mRNA total.

25 A figura 19 ilustra que liberação de DCN de AAV-IGF-1 promoveu a sobrevivência dos neurônios motores. A diferença entre camundongos tratados com AAV codificando para IGF-1 quando comparada à liberação de DCN de AAV que codifica para GFP é estatisticamente significativa para um valor $p = 0,01$ como indicado pelo asterisco.

30 A figura 20 ilustra as melhorias funcionais no desempenho de rotarod, resistência ao aperto de membro traseiro, e resistência ao aperto de membro dianteiro em camundongos tratados com liberação de DCN de AAV

que codifica para IGF-1 quando comparada à liberação de DCN de AAV que codifica para GFP.

5 A figura 21 ilustra o aumento na sobrevivência mediada por liberação de DCN de AAV que codifica para IGF-1 quando comparada à liberação de DCN de AAV que codifica para GFP.

A figura 22 mostra distribuição de GFP dentro do cérebro de camundongo seguindo liberação bilateral de um vetor de expressão de GFP de AAV1 aos núcleos cerebelares profundos (DCN). Além do DCN, tingimento positivo de GFP também foi observado nos bolbos olfatórios, córtex cerebral, 10 tálamo, tronco cerebral, córtex cerebelares e espinha dorsal. Todas destas áreas ou recebem projeções e/ou enviam projeções ao DCN.

Descrição Detalhada da Invenção

A fim de que a presente invenção possa ser entendida mais facilmente, certos termos são primeiro definidos. Definições adicionais são expostas ao longo da descrição detalhada. 15

A prática da presente invenção empregará, a menos que do contrário indicado, técnicas convencionais de imunologia, biologia molecular, microbiologia, biologia celular e DNA recombinante que estão dentro da habilidade da técnica. Vide, por exemplo, Sambrook, Fritsch e Maniatis, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2ª edição (1989); *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (F. M. Ausubel, et al. eds., (1987)); a série *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.): PCR 2: *A PRACTICAL APPROACH* (M. J. MacPherson, B. D. Hames e G. R. Taylor, eds. (1995)), Harlow e Lane, eds. (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY 25 MANUAL, AND ANIMAL CELL CULTURE* (R.I. Freshney, ed. (1987)).

Como usado no relatório descritivo e nas reivindicações, a forma singular "um", "uma" e "o/a" inclui referências plurais a menos que o contexto dite claramente o contrário. Por exemplo, o termo "uma célula" inclui uma pluralidade de células, incluindo suas misturas.

30 Como aqui usado, o termo "compreendendo" é intencionado significar que as composições e métodos incluem os elementos recitados, mas não excluindo outros. "Consistindo essencialmente em" quando usado para

definir composições e métodos, significará excluindo outros elementos de qualquer significação essencial à combinação. Desse modo, uma composição consistindo essencialmente nos elementos como definidos aqui não excluiria contaminantes de traço do método de isolamento e de purificação e veículos farmacologicamente aceitáveis, como solução salina tamponada de fosfato, conservantes, e similares. "Consistindo em" significará excluindo mais que elementos de traço de similares ingredientes e etapas de método substanciais para administrar as composições desta invenção. Modalidades 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 entendido, embora nem sempre explicitamente declarado, que todas as designações numéricas são precedidas pelo termo "cerca de". Isto é também para ser entendido, embora nem sempre explicitamente declarado, que os reagentes descritos aqui são meramente exemplares e que equivalentes de tais são conhecidos na técnica.

O termo "transgene" refere-se a um polinucleotídeo que é introduzido em uma célula e é capaz de ser transcrito no RNA e opcionalmente, transladado e/ou expresso sob condições apropriadas. Em um aspecto, ele confere uma propriedade desejada a uma célula à qual foi introduzido, ou do contrário leva a um resultado terapêutico ou diagnóstico desejado. Em outro aspecto, pode ser transcrito em uma molécula que medeia interferência de RNA, como siRNA.

Os termos "partículas de genoma (gp)", ou "equivalentes de genoma", como usados em referência a uma titulação viral, referem-se ao número de vírions contendo o genoma de DNA de AAV recombinante, independente da infecciosidade ou funcionalidade. O número de partículas de genoma em uma preparação de vetor particular pode ser medido por procedimentos 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)", "partícula infecciosa" ou "unidade de replicação", como usados em referência a uma titulação viral, referem-se ao número de partículas infecciosas de vetor de AAV recombinante e competentes para replicação quando medidas pelo ensaio de centro infeccioso, também conhecido como ensaio de centro de replicação, como descrito, por exemplo, em McLaughlin et al. (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973.

O termo "unidade de transdução (tu)" como usado em referência a uma titulação viral, refere-se ao número de partículas infecciosas de vetor de AAV recombinante que resultam na produção de um produto de transgene funcional quando medidas em ensaios funcionais 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 terapêuticamente eficaz" e seus cognatos referem-se àquela quantidade de um RNA, DNA ou produto de expressão de DNA e/ou RNA que resulta em prevenção ou retardo de princípio ou melhora dos sintomas em um sujeito ou um conseguimento de um resultado biológico desejado, como correção de neuropatologia, por exemplo, patologia celular associada a uma doença neuronal motora como ALS. O termo "correção terapêutica" refere-se àquele grau de correção que resulta em prevenção ou retardo de princípio ou melhora dos sintomas em um sujeito. A quantidade eficaz pode ser determinada através de métodos empíricos conhecidos.

Uma "composição" é também intencionada abranger uma combinação de agente ativo e similar veículo, por exemplo, composto ou composição, inerte (por exemplo, um agente detectável ou marcação) ou ativo, como um adjuvante, diluente, aglutinante, estabilizante, tampões, sais, solventes lipofílicos, conservante, adjuvante ou similares. Veículos também incluem excipientes farmacêuticos e proteínas de aditivos, peptídeos, aminoácidos, lipídios e carboidratos (por exemplo, açúcares, incluindo monossacarídeos, di-, tri-, tetra- e oligossacarídeos; açúcares derivatizados como alditóis, ácidos aldônicos, açúcares estereificados e similares; e polissacarídeos ou po-

límeros de açúcar) que podem estar presentes isoladamente ou em combinação, compreendendo sozinho ou em combinação 1-99,99 % em peso ou volume. Excipientes de proteína exemplares incluem albumina de soro como albumina de soro humano (HSA), albumina humana recombinante (rHA),
5 gelatina, caseína, e similares. Componentes de aminoácido/anticorpo representativos que podem também funcionar em uma capacidade de tamponação, incluem alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutâmico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartame, e similares. Excipientes de carboidrato são também in-
10 tencionados dentro do escopo desta invenção, exemplos destes incluem mas não são limitados a monossacarídeos como frutose, maltose, galactose, glicose, D-manose, sorbose, e similares; dissacarídeos, como lactose, sucrose, trealose, celobiose, e similares; polissacarídeos, como rafinose, melizitol, maltodextrinas, dextranas, amidos, e similares; e alditóis, como mani-
15 tol, xilitol, maltitol, lactitol, sorbitol de xilitol (glucitol) e mioinositol.

O termo veículo também inclui um tampão ou um agente de ajuste de pH; tipicamente, o tampão é um sal preparado de um ácido ou base orgânicos. Tampões representativos incluem sais de ácido orgânico como
20 sais de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucônico, ácido carbônico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético, ou ácido ftálico; Tris, cloridrato de trometamina, ou tampões de fosfato. Veículos adicionais incluem excipientes/aditivos poliméricos como polivinilpirrolidonas, ficóis (um açúcar polimérico), dextratos (por exemplo, ciclodextrinas, como 2-hidroxi-propila-
25 -quadratura-ciclodextrina), polietileno glicóis, agentes aromatizantes, agentes antimicrobianos, adoçantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensoativos (por exemplo, polissorbatos como "TWEEN 20" e "TWEEN 80"), lipídios (por exemplo, fosfolipídeos, ácidos graxos), esteróides (por exemplo, colesterol), e agentes quelantes (por exemplo, EDTA).

Como aqui usado, o termo "veículo farmacêuticamente aceitável"
30 abrange quaisquer dos veículos farmacêuticos padrão, como uma solução salina tamponada de fosfato, água, e emulsões, como um óleo/água ou emulsão de água/óleo, e vários tipos de agentes umectantes. As composições

também podem incluir estabilizantes e conservantes e qualquer um dos veículos observados acima com a provisão adicional que eles são aceitáveis para o uso in vivo. Para exemplos de veículos, estabilizantes e adjuvantes, vide Martin *REMINGTON'S PHARM. SCI.*, 15^a Ed. (Mack Publ. Co., Easton 5 (1975) e Williams & Williams, (1995), e ao "*PHYSICIAN'S DESK REFERENCE*", 52^a ed., Medical Economics, Montvale, NJ. (1998).

Um "sujeito", "indivíduo" ou "paciente" é usado alternadamente aqui que se refere a um vertebrado, preferivelmente um mamífero, mais preferivelmente um humano. Mamíferos incluem, mas não são limitados a, mu- 10 rinos, ratos, símios, seres humanos, animais de fazenda, animais desportivos, e animais de estimação.

Um "controle" é um sujeito ou amostra alternativa usada em um experimento para propósito de comparação. Um controle pode ser "positivo" ou "negativo". Por exemplo, onde o propósito do experimento for determinar 15 uma correlação de um nível de expressão alterado de um gene com um tipo particular de patologia (vide ALS, por exemplo, infra), é em geral preferível usar um controle positivo (um sujeito ou uma amostra de um sujeito, carregando tal alteração e exibindo característica de sintomas daquela doença), e um controle negativo (um sujeito ou uma amostra de um sujeito carecendo 20 da expressão alterada e sintoma clínico daquela doença).

"Diferencialmente expresso" como aplicado a um gene, refere-se à produção diferencial do mRNA transcrito do gene ou do produto de proteína codificado pelo gene. Um gene diferencialmente expresso pode ser sobre-expressado ou subexpressado quando comparado ao nível de expressão de uma célula normal ou de controle. Em um aspecto, isto se refere a 25 um diferencial que é pelo menos 1,5 vez, ou pelo menos 2,5 vezes, ou alternativamente pelo menos 5 vezes, ou alternativamente pelo menos 10 vezes mais alto ou menor que o nível de expressão detectado em uma amostra de controle. O termo "diferencialmente expresso" também se refere às seqüências de nucleotídeo em uma célula ou tecido que são expressas onde silenciosas em uma célula de controle ou não expressas onde expressadas em 30 uma célula de controle.

Como aqui usado, o termo "modular" significa variar a quantidade ou intensidade de um efeito ou resultado, por exemplo, intensificar, aumentar, diminuir ou reduzir.

5 Como aqui usado o termo "melhorar" é sinônimo com "aliviar" e significa reduzir ou iluminar. Por exemplo pode-se melhorar os sintomas de uma doença ou distúrbio os tornando mais suportáveis.

Em aspectos onde transferência de gene é mediada por um Vektor viral de DNA, como um adenovírus (Ad) ou adenovírus associado (AAV), um constructo de vetor refere-se ao polinucleotídeo que compreende o genoma viral ou parte deste, e um transgene. Adenoviroses (Ads) são um grupo de vírus relativamente bem-caracterizados, homogêneos incluindo mais de 50 sorotipos. Vide, por exemplo, Pedido de Patente de PCT Internacional Nº WO 95/27071. Ads são fáceis de crescer e não requerem integração no genoma da célula hospedeira. Vetores derivados de Ads recombinantes, particularmente aqueles que reduzem o potencial para recombinação e geração de vírus do tipo selvagem, foram também construídos. Vide, Pedidos de Patente de PCT Internacional Nos. WO 95/00655 e WO 95/11984. AAV do tipo selvagem tem infecciosidade e especificidade altas que integram no genoma da célula hospedeira. Vide, Hermonat e Muzyczka (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 :6466-6470 e Lebkowski, et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:3988-3996.

A invenção fornece um método para liberar um transgene à espinha dorsal e / ou tronco cerebral em um sujeito administrando um vetor viral neurotrópico recombinante contendo um transgene a pelo menos uma região da região dos núcleos cerebelares profundos do cérebro, em que a liberação está sob condições que favorecem expressão do transgene em um sítio distal ao sítio de administração. A liberação pode também resultar em expressão do transgene no sítio de administração.

A menos que do contrário especificamente indicado, expressão do transgene não é limitada à translação para um polipeptídeo ou proteína mas também inclui replicação e/ou transcrição do polinucleotídeo de transgene.

Em outro aspecto, a invenção fornece um método de liberar um produto de transgene terapêutico a uma célula alvo do CNS que é um neurônio ou uma célula glial em um mamífero afligido com um distúrbio neuronal motor, por exemplo, ALS ou lesão de espinha dorsal traumática. O transgene pode codificar para IGF-1.

Em outro aspecto, a invenção é um método para liberar um transgene à espinha dorsal em um sujeito administrando um vetor viral neurotrópico recombinante contendo o dito transgene à região do córtex motor do cérebro, em que a dita liberação está sob condições que favorecem expressão do dito transgene em um sítio distal ao dito sítio de administração.

Em ainda um aspecto adicional, o vetor viral da invenção é administrado pelo menos a uma região da região dos núcleos cerebelares profundos do cérebro onde o produto de transgene é expressado e liberado na espinha dorsal e / ou na região do tronco cerebral do sujeito.

Em outra modalidade, o vetor viral é administrado pelo menos a uma região da região dos núcleos cerebelares profundos do cérebro que é interconectada com o tronco cerebral e os neurônios motores espinhais. Estas regiões alvos têm conexões diretas com células (por exemplo, interneurônios e astrócitos) que compõem o ambiente celular do neurônio motor. A administração libera o produto de transgene ao ambiente celular do neurônio motor onde o produto medeia um efeito benéfico nas células que o compõem.

Em uma modalidade, a invenção é um método para liberar um transgene ou modular sua expressão, em um neurônio motor em um sujeito administrando um vetor viral neurotrópico contendo o transgene à região do córtex motor do cérebro do sujeito, em que o transgene é expressado em uma região do neurônio motor distal ao dito sítio de administração.

Em uma modalidade alternada, a invenção é um método para tratar um distúrbio de neurônio motor em um sujeito administrando um vetor viral neurotrópico recombinante contendo um transgene terapêutico a pelo menos uma região da região dos núcleos cerebelares profundos do cérebro do sujeito, em que o transgene é expressado em uma quantidade terapêuti-

camente eficaz em pelo menos uma subdivisão da espinha dorsal do sujeito. Estas subdivisões incluem um ou mais de cervical, torácica, lombar ou sacra (vide figura 1, Figura 12A). O transgene podem também ser expressado em uma quantidade terapeuticamente eficaz em pelo menos uma região do tronco cerebral, como, por exemplo, o cérebro médio, pons, ou medula (vide figura 12B). Ele pode também ser expressado em uma quantidade terapeuticamente eficaz tanto em pelo menos uma região do tronco cerebral como em pelo menos uma subdivisão da espinha dorsal do sujeito.

Esta invenção é também um método para melhorar os sintomas de um distúrbio de neurônio motor em um sujeito administrando um vetor viral neurotrópico recombinante contendo um transgene terapêutico à região do córtex motor do cérebro, em que o dito transgene é expressado em uma quantidade terapeuticamente eficaz em pelo menos uma subdivisão da espinha dorsal do sujeito. Estas subdivisões incluem uma ou mais de cervical, torácica, lombar ou sacra (vide figura 1, Figura 12A).

Vetores virais neurotrópicos adequados para a prática desta invenção incluem, mas não são limitados a, vetores virais adeno-associados (AAV), vetores virais de herpes simples (patente U. S. Nº 5.672.344) e vetores lentivirais.

Nos métodos da invenção, AAV de qualquer sorotipo pode ser usado. Em certas modalidades, AAV de qualquer sorotipo pode ser usado contanto que o vetor seja capaz de sofrer transporte axonal retrógrado em um cérebro comprometido com a doença, ou transporte axonal em um cérebro não-comprometido. O sorotipo do vetor viral usado em certas modalidades da invenção é selecionado do grupo consistindo em AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, e AAV8 (vide, por exemplo, Gao et al. (2002) PNAS, 99:11854-11859; e *Viral Vectors for Gene Therapy. Methods and Protocols*, ed. Machida, Human Press, 2003). Outro sorotipo além daqueles listados aqui pode ser usado. Além disso, vetores de AAV pseudotipados podem também ser utilizados nos métodos descritos aqui. Vetores de AAV pseudotipados são aqueles contendo o genoma de um sorotipo de AAV no capsídeo de um segundo sorotipo de AAV; por exemplo, um vetor de AAV

contendo o capsídeo de AAV2 e o genoma de AAV1 ou um vetor de AAV contendo o capsídeo de AAV5 e o genoma de AAV2 (Auricchio et al., (2001) *Hum. Mol. Genet*, 10(26):3075-81).

Vetores de AAV são derivados de parvovíroses de DNA unifilar (ss) que são não-patogênicos aos mamíferos (revisado em Muzyska (1992) *Curr. Top. Microb. Immunol.*, 158:97-129). Brevemente, vetores com base em AAV têm os genes virais rep e cap que respondem por 96 % do genoma viral removido, deixando as duas repetições terminais invertidas (ITRs) de 145 pares de base (bp) de flanqueamento que são usadas para iniciar a replicação de DNA viral, embalagem e integração. Na ausência do vírus auxiliar, AAV do tipo selvagem integra no genoma da célula hospedeira humana com especificidade de sítio preferencial no cromossomo 19q 13.3 ou pode permanecer episossomalmente expresso. Uma partícula de AAV simples pode acomodar até 5 kb de ssDNA, portanto deixando cerca de 4,5 kb para um transgene e elementos reguladores, que é tipicamente suficiente. Porém, sistemas de trans-junção como descrito, por exemplo, na Patente dos Estados Unidos Nº 6.544.785, quase podem dobrar este limite.

Em uma modalidade ilustrativa, AAV é AAV2 ou AAV1. Adenovírus associado de muitos sorotipos, especialmente AAV2, foi extensivamente estudado e caracterizado como vetores de terapia de gene. Aqueles versados na técnica estarão familiarizados com a preparação de vetores de terapia de gene baseado em AAV funcionais. Numerosas referências para vários métodos de produção, purificação e preparação de AAV para administração em sujeitos humanos podem ser encontradas no corpo extensivo da literatura publicada (vide, por exemplo, *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Human Press, 2003). Adicionalmente, terapia de gene com base em AAV alvejada para células do CNS foi descrita nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 6.180.613 e 6.503.888. Vetores de AAV e exemplares adicionais são vetores recombinantes de sorotipos AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 e AAV2/8 que codificam proteína humana.

Em certos métodos da invenção, o vetor compreende um transgene operavelmente ligado a um promotor. O transgene codifica uma molé-

cula biologicamente ativa, expressão desta no CNS resulta em pelo menos correção parcial de neuropatologia. As seqüências de cDNA genômicas e funcionais de ASM humana foram publicadas (vide, por exemplo, Patente dos Estados Unidos Nº 5.773.278 e 6.541.218). O gene de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) tem uma estrutura complexa que é bem-conhecida na técnica. Ele tem pelo menos dois produtos de mRNA alternativamente juntados que surgem da transcrição de gene. Há um peptídeo de 153 aminoácidos, conhecido por vários nomes incluindo IGF-1A ou IGF-1Ea, e um peptídeo de 195 aminoácidos, conhecido por vários nomes incluindo IGF-1B ou IGF-1Eb. A forma madura de IGF-1 é um polipeptídeo de 70 aminoácidos. Ambos IGF-1Ea e IGF-1Eb contêm o peptídeo de 70 aminoácidos maduro, mas difere na seqüência e comprimento de suas extensões terminais de carboxila. As seqüências de peptídeo de IGF-1Ea e IGF-1Eb são representadas pelas SEQ ID NOS: 1 e 2, respectivamente. Os cDNAs genômico e funcional de IGF-1 humano, como também informação adicional com relação ao gene de IGF-1 e seus produtos, estão disponíveis no Acesso de Unigene Nº NM_00618.

O nível de expressão de transgene em células eucarióticas é grandemente determinado pelo promotor transcripcional dentro do cassete de expressão de transgene. Promotores que mostram atividade a longo prazo e são específicos para tecido e até mesmo para célula são usados em algumas modalidades. Exemplos não-limitativos de promotores incluem, mas não são limitados a, promotor de citomegalovírus (CMV) (Kaplitt et al. (1994) *Nat. Genet.* 8:148-154), promotor de CMV/ β 3-globina humana (Mandel et al. (1998) *J. Neurosci.* 18:4271-4284), promotor de GFAP (Xu et al. (2001) *Gene Ther.* 8:1323-1332), promotor de enolase neurônio-específico de 1,8 kb (NSE) (Klein et al. (1998) *Exp. Neurol.* 150:183-194), promotor de beta actina de galinha (CBA) (Miyazaki (1989) *Gene* 79:269-277), promotor de β -glucuronidase (GUSB) (Shipley et al. (1991) *Genetics* 10:1009-1018), e promotores de ubiquitina como aqueles isolados de ubiquitina humana A, ubiquitina humana B, e ubiquitina humana C como descritos na patente US Nº 6.667.174. Para prolongar a expressão, outros elementos reguladores podem adicio-

nalmente ser operavelmente ligados ao transgene, como, por exemplo, o Elemento Pós-regulador do vírus de Hepatite de Woodchuck (WPRE) (Donello et al. (1998) *J. Virol.* 72:5085-5092) ou o sítio de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH).

5 Para algumas aplicações de terapia de gene do CNS, pode ser necessário controlar a atividade transcricional. Para este fim, regulação farmacológica da expressão de gene com vetores virais pode ser obtida incluindo vários elementos reguladores e promotores responsivos aos fármacos como descritos, por exemplo, em Haberman et. al. (1998) *Gene Ther.* 10 5:1604-16011; e Ye et al. (1995) *Science* 283:88-91.

Nos métodos desta invenção, o vetor viral pode ser administrado contatando uma terminação axonal terminal de um neurônio com uma composição contendo um vetor viral que carrega o transgene, permitindo a partícula viral ser endocitosada e transportado intracelularmente (de modo retró-
15 grado) ao longo do axônio para o corpo celular do neurônio; permitindo expressar o produto de transgene terapêutico, em que o produto de transgene terapêutico assim alivia a patologia no sujeito. O efeito pode ser nos neurônios motores, em células que compõem o ambiente dos neurônios motores (como interneurônios e astrócitos), ou em ambos. Em certas modalidades, a
20 concentração do vetor na composição é pelo menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, ou 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, ou 50 ($\times 10^9$ tu/ml); ou (c) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, ou 50 ($\times 10^{10}$ iu/ml).

Em métodos adicionais desta invenção, o vetor viral pode ser
25 administrado contatando o corpo celular de um neurônio com uma composição contendo um vetor viral que carrega o transgene, permitindo a partícula viral ser endocitosada, permitindo expressar o produto de transgene terapêutico e transportado de modo anterógrado intracelularmente ao longo do axônio para o axônio terminal do neurônio, em que o produto de transgene terapêutico assim alivia a patologia no sujeito. O efeito pode ser nos neurônios
30 motores, em células que compõem o ambiente dos neurônios motores (como interneurônios e astrócitos), ou em ambos. Em certas modalidades, a

concentração do vetor na composição é pelo menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, ou 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, ou 50 ($\times 10^9$ tu/ml); ou (C) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, ou 50 ($\times 10^{10}$ iu/ml).

5 Em um aspecto, o transgene codifica uma molécula biologicamente ativa, expressão desta no CNS resulta em pelo menos correção parcial da neuropatologia. Em algumas modalidades, o produto de transgene terapêutico é uma molécula de RNA que inibe expressão de SOD em um sujeito assim aliviando e impedindo os sintomas de ALS. Vide Roaul et al.
10 (2005) *Nat. Med.* 11(4):423 - 428 e Ralph et al. (2005) *Nat. Med.* 11(4):429-433.

 Em um aspecto ao executar estes métodos, o transgene expressa uma quantidade terapêutica de uma proteína selecionada do grupo consistindo em fator-1 de crescimento de insulina (IGF-1), calbindina D28, parvalbumina, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, EPO (eritropoietina), CBP (proteína de
15 ligação da ligadora proteína ligadora de elemento de resposta de cAMP [CREB]), SMN-1, SMN-2, e CNTF (fator neurotrófico ciliar).

 Alternativamente, o transgene inibe expressão de uma forma mutante de uma proteína, por exemplo, SOD mutante que resulta em ALS. Roaul et al. (2005) supra e Ralph et al. (2005) supra.

20 Para identificação das estruturas no cérebro humano, vide, por exemplo, *The Human Brain: Surface, Three-Dimensional Suctional Anatomy With MRI, and Blood Supply*, 2ª ed., eds. Deuteron et al., Springer Vela, 1999; *Atlas of the Human Brain*, eds. Mai et al., Academic Press; 1997; e *Coplanar Sterotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging*, eds. Tamarack et al., Thyme Medical Pub.,
25 1988. Para identificação de estruturas no cérebro de camundongo, vide, por exemplo, *The Mouse Brain in Sterotaxic Coordinates*, 2ª ed., Academic Press, 2000. A figura 1 esquematicamente mostra a espinha dorsal e suas quatro subdivisões: cervical, torácica, lombar e sacra.

30 A invenção em questão fornece métodos para modular, corrigir ou aumentar a função motora em um sujeito afligido com dano neuronal motor. Para o propósito de ilustração apenas, o sujeito pode sofrer de um ou

mais de esclerose lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular bulbar espinhal, atrofia muscular espinhal, ataxia cerebelar espinhal, esclerose lateral primária (PLS), ou lesão de espinha dorsal traumática.

Sem estar limitado pela teoria, a patologia associada ao dano de neurônio motor pode incluir degeneração dos neurônios motores, gliose, anormalidades de neurofilamento, perda de fibras mielinadas em tratos corticoespinhais e raízes ventrais. Por exemplo, dois tipos de princípio foram reconhecidos: princípio bulbar, que afeta os neurônios motores superiores (córtex e neurônios motores do tronco cerebral), afeta os músculos faciais, fala e engolição; e princípio de membro, que afeta os neurônios motores inferiores (neurônios motores da espinha dorsal), é refletido por espasticidade, fraqueza generalizada, atrofia muscular, paralisia, e insuficiência respiratória. Em ALS, sujeitos têm princípio bulbar e de membro. Em PLS, sujeitos têm princípio bulbar.

Sem estar limitado pela teoria, uma modalidade da invenção encontra-se na habilidade para fornecer uma molécula terapêutica (por exemplo, uma proteína ou peptídeo) para cada divisão da espinha dorsal. Isto pode ser realizado injetando um vetor de AAV no DCN. Além disso, pode ser importante alvejar lâmina individual dentro de cada divisão da espinha dorsal. Lâmina são sub-regiões específicas dentro das regiões do cérebro e espinha dorsal. Pode ser desejável em certas modalidades alvejar lâmina específica dentro de uma certa divisão da espinha dorsal. Considerando que o dano dos neurônios motores pode ocorrer dentro dos neurônios motores superiores também, pode também ser desejável fornecer uma molécula terapêutica (por exemplo, uma proteína ou peptídeo) às divisões do tronco cerebral. Em uma modalidade, pode ser desejável fornecer a molécula terapêutica tanto para a espinha dorsal, incluindo algumas ou todas as subdivisões como também para o tronco cerebral, incluindo algumas ou todas as subdivisões. A invenção imediata usa a introdução de um vetor de AAV no DCN para realizar a liberação acima descrita de uma molécula terapêutica para a(s) região(ões) da espinha dorsal) e / ou tronco cerebral. A figura 12A ilustra as conexões entre as regiões dos núcleos cerebelares profundos e da espinha

dorsal enquanto a Figura 12B ilustra as conexões entre as regiões dos núcleos cerebelares profundos e do tronco cerebral.

A habilidade para organizar e executar ações motoras complexas depende dos sinais das áreas motoras no córtex cerebral, isto é, do córtex motor. Comandos corticais motores descem em dois tratos. As fibras corticobulbares controlam os núcleos motores no tronco cerebral que move os músculos faciais e as fibras corticoespinhais controlam os neurônios motores espinhais que inervam os músculos do tronco e do membro. O córtex cerebral também indiretamente influencia a atividade motora espinhal agindo nas vias do tronco cerebral descendentes.

O córtex motor primário encontra-se ao longo do giro pré-central na área de Broadmann (4). Os axônios dos neurônios corticais que projetam junto à espinha dorsal correm no trato corticoespinhal, um fardo volumoso de fibras contendo aproximadamente 1 milhão de axônios. Cerca de um terço destes origina do giro pré-central do lóbulo frontal. Outro terço origina da área 6. O restante origina nas áreas 3, 2, e 1 no córtex sensorio somático e regula a transmissão de entrada aferente através do corno dorsal.

As fibras corticoespinhais correm junto com as fibras corticobulbares através do membro traseiro da cápsula interna para alcançar a porção ventral do cérebro médio. Elas separam no pons em fardos pequenos de fibras que cursam entre os núcleos de pontina. Elas reagrupam-se na medula para formar a pirâmide medular. Cerca de três quartos das fibras corticoespinhais cruzam a mediana na decussação piramidal na junção da medula e espinha dorsal. As fibras cruzadas descem na parte dorsal das colunas laterais (coluna dorsolateral) da espinha dorsal, formando o trato corticoespinhal lateral. As fibras não-cruzadas descem nas colunas ventrais como o trato corticoespinhal ventral.

As divisões laterais e ventrais do trato corticoespinhal terminam quase nas mesmas regiões de massa cinzenta espinhal como os sistemas laterais e medianos do tronco cerebral. O trato corticoespinhal lateral projeta-se primariamente para núcleos motores na parte lateral do corno ventral e para interneurônios na zona intermediária. O trato corticoespinhal ventral

projeta-se bilateralmente para a coluna de célula ventromedial e para porções adjacentes da zona intermediária contendo os neurônios motores que inervam os músculos axiais. A figura 3 esquematicamente mostra as vias aferentes principais (entrada).

5 Profundamente dentro do cerebelo está a substância cinzenta chamada os núcleos cerebelares profundos denominados o núcleo medial (fastigial), o núcleo interposto (proposto) e o núcleo lateral (dentado). Como aqui usado, o termo "núcleos cerebelares profundos" coletivamente referem-se a estas três regiões. A figura 2 esquematicamente mostra as três regiões
10 do DCN. A figura 4 esquematicamente mostra as vias eferentes principais (saída) do DCN. A figura 5 esquematicamente mostra os circuitos neurais no córtex cerebral. As figuras 12A e 12B esquematicamente mostram as conexões entre o DCN e a espinha dorsal ou o tronco cerebral, respectivamente.

Se desejado, a estrutura do cérebro humano pode ser correlata-
15 da às estruturas similares no cérebro de similar mamífero. Por exemplo, a maioria dos mamíferos, incluindo os humanos e roedores, mostra uma organização topográfica similar das projeções entorrinais-hipocampais, com neurônios na parte lateral tanto do córtex entorrinal lateral e mediano que se projeta para a parte dorsal ou pós septal do hipocampo, enquanto que a pro-
20 jeção para o hipocampo ventral origina-se primariamente dos neurônios nas partes medianas do córtex entorrinal (*Principles of Neural Science*, 4ª ed., eds Kandel et al., McGraw-Hill, 1991; *The Rat Nervous System*, 2ª ed., ed. Paxinos, Academic Press, 1995). Além disso, células da camada II do córtex entorrinal projetam-se para o giro dentado, e elas terminam nos dois terços
25 externos da camada molecular do giro dentado. Os axônios das células da camada III projetam-se bilateralmente para as áreas do cornu ammonis CA1 e CA3 do hipocampo, terminando na camada molecular stratum lacunose.

Em um aspecto, os métodos descritos incluem administrar ao
30 CNS de um sujeito afligido um vetor viral neurotrópico que carrega um transgene codificando um produto terapêutico e permitindo expressar o transgene dentro do CNS distalmente do sítio de administração em um nível terapêutico. Além disso, o vetor pode compreender um polinucleotídeo que codifica

para uma molécula biologicamente ativa eficaz para tratar o distúrbio de CNS. Tais moléculas biologicamente ativas podem compreender peptídeos incluindo mas não limitados às versões nativas ou mutadas de proteínas de comprimento total, versões nativas ou mutadas de fragmentos de proteína, polipeptídeos sintéticos, anticorpos, e fragmentos de anticorpo como as moléculas de Fab. Moléculas biologicamente ativas podem também compreender nucleotídeos incluindo polinucleotídeos de DNA unifilamentar ou bifilamentar e polinucleotídeos de RNA unifilamentar ou bifilamentar. Para uma revisão das tecnologias de nucleotídeo exemplares que podem ser usadas na prática dos métodos descritos aqui, vide Kurreck, (2003) *J. Eur. J. Biochem.* 270, 1628-1644 [tecnologias antissenses]; Yu et al., (2002) *PNAS* 99(9), 6047-6052 [tecnologias de interferência de RNA]; e Elbashir et al., (2001) *Genes Dev.*, 15(2):188-200 [tecnologia de siRNA].

Em uma modalidade ilustrativa, a administração é realizada por injeção direta de uma solução de vetor de titulação alta no DCN de um sujeito ou paciente. Por exemplo, a administração é através de injeção direta em uma ou mais regiões dos núcleos cerebelares profundos do cérebro selecionadas do grupo consistindo na região medial (fastigial), região interposta (proposta) e a região lateral (dentada). O DCN é um sítio atrativo para injeção devido a suas conexões eferentes e aferentes extensivas com o tronco cerebral e espinha dorsal. Estas células fornecem um meio eficiente e minimamente invasivo para liberar vetor viral e transgene expresso para as regiões da espinha dorsal e as regiões do tronco cerebral. Sem estar limitado pela teoria, o vetor viral pode ser levado pelos terminais dos axônios e de modo retrógrado transportado ao longo do axônio para o corpo celular destes neurônios que se projetam ao longo na região da espinha dorsal e/ou tronco cerebral. Corpos de célula de neurônios estão também presentes no DCN que tem terminações terminais dos axônios que terminam, por exemplo, na região cervical da espinha dorsal. Vetor viral absorvido por estes corpos celulares, ou transgene expresso resultante do vetor viral ou ambos, pode ser de modo anterógrado transportado para as terminações terminais dos axônios na região espinal cervical. Portanto, usando o DCN como um sítio

de injeção, apenas um volume pequeno de vetor viral é injetado mas este medeia a expressão de transgene significativa ao longo de uma ou mais regiões na espinha dorsal e/ou no tronco cerebral.

Em algumas modalidades, os métodos compreendem administração de um vetor neurotrópico de titulação alta que carrega um transgene terapêutico de forma que o produto de transgene é expressado a um nível terapêutico em um segundo sítio dentro do CNS distal do primeiro sítio. Em algumas modalidades, a titulação viral da composição é pelo menos: (a) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, ou 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, ou 50 ($\times 10^9$ tu/ml); ou (c) 5, 6, 7, 8, 8,4, 9, 9,3, 10, 15, 20, 25, ou 50 ($\times 10^{10}$ iu/ml). Em outras modalidades, a administração é realizada por injeção intraparenquimal direta de uma solução de vetor neurotrópico de titulação alta no cérebro doente, depois disso o transgene é expressado distal, contralateral ou ipsilateralmente, para o sítio de administração a um nível terapêutico pelo menos 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 mm do sítio de administração.

A distância entre os primeiro e segundo sítios é definida como a região de distância mínima entre o sítio de administração (primeiro sítio) e o limite da transdução detectável do sítio distal (segundo sítio) quando medida usando procedimentos conhecidos na técnica ou como descrito nos Exemplos, por exemplo, hibridação in situ. Alguns neurônios no CNS de mamíferos maiores podem atravessar distâncias grandes em virtude de suas projeções axonais. Por exemplo, em humanos, alguns axônios podem atravessar uma distância de 1000 mm ou mais. Desse modo, em vários métodos da invenção, o vetor pode ser axonalmente transportado ao longo do comprimento inteiro do axônio a uma tal distância a alcançar e transduzir o corpo celular de origem.

Um sítio de administração de vetor dentro do CNS é escolhido com base na região alvo desejada de neuropatologia e a topologia dos circuitos do cérebro envolvida desde que um sítio de administração e a região alvo tenham conexões axonais. A região alvo pode ser definida, por exemplo, usando coordenadas 3-D esterotáxicas. Em algumas modalidades, o sítio de

administração é escolhido de forma que pelo menos 0,1, 0,5, 1, 5, ou 10 % da quantidade total de vetor injetados são liberados distalmente na região alvo de pelo menos 1, 200, 500, ou 1000 mm³. Um sítio de administração pode ser localizado em uma região inervada por neurônios de projeção que conectam regiões distais do cérebro. Por exemplo, a substância negra e área segmentária ventral enviam projeções densas ao caudado e putamen (coletivamente conhecidos como o estrato). Neurônios dentro da substância negra e tegmento ventral podem ser alvejados para transdução por transporte retrógrado de AAV seguindo injeção no estrato. Como outro exemplo, o hipocampo recebe projeções axonais bem-definidas, previsíveis de outras regiões do cérebro. Outros sítios de administração podem ser localizados, por exemplo, na espinha dorsal, tronco cerebral (medula, cérebro médio e pons), mesencéfalo, cerebelo (incluindo os núcleos cerebelares profundos), diencéfalo (tálamo, hipotálamo), telencéfalo (estrato de corpo, córtex cerebral, ou, dentro do córtex, os lóbulos occipitais, temporais, parietais ou frontais), ou combinações destes.

O segundo sítio (alvo) pode ser localizado em qualquer região do CNS, incluindo o cérebro e a espinha dorsal contendo uns neurônios que se projetam para o primeiro sítio (administração). Em algumas modalidades, o segundo sítio está em uma região do CNS selecionada da substância negra, a medula oblonga, o tronco cerebral, ou a espinha dorsal.

Para liberar o vetor especificamente para uma região particular do sistema nervoso central, especialmente para uma região particular do cérebro, ele pode ser administrado através de microinjeção estereotáxica. Por exemplo, no dia da cirurgia, pacientes terão a base de estrutura estereotáxica fixada no lugar (atarraxadas no crânio). O cérebro com base de estrutura estereotáxica (MRI-compatível com marcações fiduciárias) será imageado usando MRI de resolução alta. As imagens de MRI depois serão transferidas para um computador que opera software estereotáxico. Uma série de imagens coronais, sagitais e axiais será usada para determinar o sítio alvo de injeção de vetor, e trajetória. O software translada diretamente a trajetória em coordenadas 3-dimensionais apropriadas para a estrutura estereotáxica.

Orifícios de trepanação são perfurados acima do sítio de entrada e do aparelho estereotáxico localizado com a agulha implantada na profundidade dada. O vetor em um veículo farmacologicamente aceitável depois será injetado. O vetor é depois administrado através de injeção direta ao sítio alvo primário e de modo retrógrado transportado para sítios alvos distais por meio de axônios. Rotas adicionais de administração podem ser usadas, por exemplo, aplicação cortical superficial sob visualização direta, ou outra aplicação não-estereotáxica.

Além disso porque cada região do DCN alveja regiões específicas do CNS (vide figura 1 e Figuras 12A e 12B), pode-se especificamente alvejar a região do CNS à qual o transgene é liberado pré-selecionando a região do DCN para administração. Como é evidente para aqueles versados na técnica, uma multidão de liberações de doseamento e alvejadas pode ser alcançada variando a localização, seqüência e número de administrações de transgene. O volume total do material a ser administrado, e o número total de partículas de vetor a ser administradas, serão determinados por aqueles versados na técnica com base em aspectos conhecidos da terapia de gene. Eficácia terapêutica e segurança podem ser testadas em um modelo animal apropriado. Por exemplo, uma variedade de modelos animais bem-caracterizados existe para LSDs, por exemplo, como descrito aqui ou em Watson et al. (2001) *Methods Mol. Med.* 76:383-403; ou Jeyakumar et al. (2002) *Neuropath. Appl. Neurobiol.*, 28:343-357 e ALS (vide Tu et al. (1996) *P.N.A.S.* 93:3155-3160; Roaul et al. (2005) *Nat. Med.* 11(4):423-428 e Ralph et al. (2005) *Nat. Med.* 11(4):429-433).

Em camundongos experimentais, o volume total de solução de AAV é injetado por exemplo, entre 1 a 5 μ l. Para outros mamíferos, incluindo o cérebro humano, volumes e taxas de liberação são apropriadamente escalonados. Por exemplo, foi demonstrado que os volumes de 150 μ l podem ser injetados seguramente no cérebro de primatas (Janson et al. (2002) *Hum. Gene Ther.* 13:1391-1412). Tratamento pode consistir em uma injeção simples por sítio alvo, ou pode ser repetido ao longo do trato de injeção, se necessário. Sítios de injeção múltiplos podem ser usados. Por exemplo, em

algumas modalidades, além do primeiro sítio de administração, uma composição contendo um vetor viral que carrega um transgene é administrada a outro sítio que pode ser contralateral ou ipsilateral ao primeiro sítio de administração. Injeções podem ser simples ou múltiplas, unilaterais ou bilaterais.

5 Preparações de AAV de titulação alta podem ser produzidas usando técnicas conhecidas na técnica, por exemplo, como descritas na Patente dos Estados Unidos Nº 5.658.776 e *Viral vectors for gene Therapy: Methods and protocols*, ed. Machida, Human Press, 2003.

10 Os exemplos a seguir fornecem modalidades ilustrativas da invenção. Alguém versado na técnica reconhecerá as numerosas modificações e variações que podem ser executadas sem alterar o espírito ou escopo da presente invenção. Tais modificações e variações são abrangidas dentro do escopo da invenção. Os exemplos não limitam a invenção de forma alguma.

15 Exemplos

Titulação de Vetores Recombinantes

 Titulações de vetor de AAV foram medidas de acordo com número de cópia de genoma (partículas de genoma por mililitro). Concentrações de partícula de genoma foram com base em Taqman® PCR do DNA de
20 vetor como previamente relatado (Clark et al. (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278). Brevemente, AAV-ASM purificado foi tratado com tampão de digestão de capsídeo (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,0 mM EDTA, 0,5 % SDS, 1,0 mg/ml proteinase K) a
25 50°C durante 1 hora para liberar DNA do vetor. Amostras de DNA foram postas através de uma reação em cadeia de polimerase (PCR) com preparados
 que anelam as seqüências específicas no DNA do vetor, como a região de promotor, transgene, ou a seqüência de poli A. Os resultados de PCR foram depois quantificados por um software de Taqman® de Tempo Real,
30 como aquele fornecido pelo Perkin Elmer-Applied Biosystems (Foster City, CA) Prism 7700 Sequence Detector System.

 Vetores que carregam um gene de marcador ensaiável como o gene de β -galactosidase ou de proteína fluorescente verde (GFP) podem ser

titulados usando um ensaio de infecciosidade. Células suscetíveis (por exemplo, células de HeLa ou COS) são transduzidas com o AAV e um ensaio é executado para determinar a expressão de gene como tingimento de células transduzida de vetor de β -galactosidase com X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo) ou microscopia de fluorescência para células transduzidas de GFP. Por exemplo, o ensaio é executado como segue: 4 x 10⁴ células de HeLa são banhadas em cada poço de uma placa de cultura de 24 poços usando meios de crescimento normais. Após ligação, isto é, aproximadamente 24 horas depois, as células são infetadas com Ad tipo 5 a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10 e transduzidas com diluições seriais do vetor empacotado e incubadas a 37°C. Um a três dias depois, antes dos efeitos citopáticos extensivos serem observados, o ensaio apropriado é executado nas células (por exemplo, tingimento de X-gal ou microscopia de fluorescência). Se um gene repórter como β -galactosidase for usado, as células são fixas em 2 % de paraformaldeído, 0,5 % de glutaraldeído e tingidas para atividade de β -galactosidase usando X-gal. As diluições de vetor que dão células bem separadas são separadas. Cada célula positiva representa 1 unidade de transdução (tu) de vetor.

Expressão de Proteína Funcional Impede Prejuízo Motor em um Modelo de Camundongo Terapeuticamente Relevante

Camundongos de ASMKO são um modelo aceito de doença de Niemann-Pick dos tipos A e B (Horinouchi et al. (1995) *Nat. Genetics* 10:288-293; Jin et al. (2002) *J. Clin. Invest.* 109:1183-1191; e Otterbach (1995) *Cell* 81:1053-1061). Doença de Niemann-Pick (NPD) é classificado como uma doença de armazenamento lisossomal e é um distúrbio neurometabólico herdado caracterizado por uma deficiência genética em ácido esfingomielinase (ASM; esfingomielin colinofosfoidrolase, EC 3.1.3.12). A carência de proteína de ASM funcional resulta na acumulação de substrato de esfingomielin dentro dos lisossomas de neurônios e glios ao longo do cérebro. Isto leva à formação de números grandes de lisossomas expandidos no pericari-
on que é uma característica conspícua e o fenótipo celular primário de NPD do tipo A. A presença de lisossomas expandidos correlata com a perda da

função celular normal e um curso neurodegenerativo progressivo que leva à morte do indivíduo afetado na infância prematura (*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, eds. Scriver et al., McGraw-Hill, Nova Iorque, 2001, págs. 3589-3610). Fenótipos celulares secundários (por exemplo, anormalidades metabólicas adicionais) estão também associados a esta doença, notavelmente à acumulação de nível alto de colesterol no compartimento lisossomal. Esfingomielinase tem afinidade forte por colesterol que resulta no seqüestrando de quantidades grandes de colesterol nos lisossomas de camundongos de ASMKO e pacientes humanos (Leventhal et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:44976-44983; Slotte (1997) *Subcell. Biochem.* 28:277-293; e Viana et al. (1990) *J. Med. Genet.* 27:499-504.)

O experimento a seguir, avaliou a habilidade relativa dos vetores de sorotipo AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 e AAV2/8 recombinantes que codificam ASM humana (hASM) para expressar proteína de hASM, corrigir patologia de armazenamento de colesterol, sofrer transporte, salvar células de Purkinje, e iniciar restabelecimento funcional no camundongo de ASMKO após injeção unilateral dentro dos núcleos cerebelares profundos. Um grupo adicional de camundongos de ASMKO recebeu injeções bilaterais no DCN para avaliar se propagação/expressão de proteína de transgene melhorariam o restabelecimento funcional de comportamento.

Sessenta e seis camundongos (ASMKO) machos homozigotos (-/-) modificados para de ácido esfingomielinase foram criados e dezesseis controles machos de ninhada do tipo selvagem de junções de heterozigoto (+/-). Camundongos foram genotipados por PCR seguindo o procedimento descrito em Gal et al. (1975) *N Engl J Med*:293:632-636. Camundongos da colônia original foram retrocruzados com a cepa de C57/Bl6. Os animais foram alojados sob ciclo 12:12 horas de luz/escuridão e supridos ad libitum com alimento e água. Todos os procedimentos foram executados sob um protocolo aprovado pelo Institutional Animal Care and Use Committee.

Após serem anestesiados com isoflurano, os camundongos (~7 semanas de idade) foram unilateralmente injetados nos núcleos cerebelares profundos (A-P: -5,75 de bregma, M-L: -1,8 de bregma, D-V: -2,6 de dura,

barra incisiva: 0,0) com um dos vetores de sorotipo de AAV a seguir (n=8/vetor): AAV1-CMV- β gal, AAV1-CMV-ASM, AAV2-CMV-ASM, AAV5-CMV-ASM, AAV7-CMV-ASM, e AAV8-CMV-ASM. Os vetores foram liberados com uma seringa de 10 μ l de Hamilton montada em uma bomba de seringa a uma taxa de 0,5 μ l/minuto em um total de $1,86 \times 10^{10}$ partículas de genoma por cérebro. O volume de injeção final para cada vetor foi 4 μ l. Uma hora antes e vinte e quatro horas após a cirurgia, os camundongos foram dados cetoprofeno (5 mg/kg; SC) para analgesia.

Camundongos foram mortos 7 semanas pós-injeção (14 semanas de idade). Na hora do sacrifício, os camundongos foram sobre-dosados com eutasol (150 mg/kg; IP) e rapidamente decapitados (n=5/grupo) ou transcárdialmente perfurados (n=3/grupo). Cérebros dos camundongos decapitados foram rapidamente removidos, congelados em nitrogênio líquido, dissecados em 3 seções (hemisfério cerebral direito, hemisfério cerebral esquerdo & cerebelo) homogeneizados, e analisados para hASM por ELISA. Cérebros e espinhas dorsais dos camundongos perfundidos foram processadas para expressão de proteína de ASM humana, acumulação de colesterol como detectado por tingimento de filipina e sobrevivência de célula de Purkinje com tingimento de calbindina em seções de vibratona de 50 μ m. Camundongos de ASMKO que receberam injeções bilaterais (~7 semanas de idade) de AAV2/1- β gal (n=8), AAV2/1-ASM (n=5), e AAV2/2-ASM (n=5) foram sacrificados em 20 semanas de idade após sofrer testagem de rotarod. Camundongos foram testados de rotarod de aceleração e de oscilação para função motora no Smartrod (AccuScan) usando métodos conhecidos na técnica. Métodos exemplares são reproduzidos em Sleat et al. (2004) *J. Neurosci.* 24:9117-9126. As figuras 10 e 11 mostram graficamente os resultados dos testes de rotarod como uma medição de restabelecimento da função motora.

O cDNA de ASM humana de comprimento total sob o controle do promotor de citomegalovírus humano precocemente imediato (CMV), com uma seqüência de poliadenilação de SV40, e um íntron híbrido, foi clonado em um plasmídeo contendo ITRs de sorotipo de AAV2 (ITR de AAV2). Jin et

al. (2002) *J Clin Invest.* 109:1183-1191. Vetores híbridos foram produzidos através de transfecção tripla usando uma série de plasmídeos auxiliares contendo domínios de codificação de capsídeo sorotipo-específicos além dos genes de replicação do tipo de AAV2. Esta estratégia permite a embalagem de vetores de ITR de AAV2 em cada virion sorotipo-específico Rabinowitz, et al. (2002) *J Virol.* 76:791-801. Com este método o genoma recombinante de hASM foi usado para gerar uma série de vetores de rAAV-hASM de vários sorotipos incluindo AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 e AAV2/8. Vetores de AAV recombinantes foram purificados através de cromatografia de permuta iônica (Sorotipos 2/1, 2/2 e 2/5). O'Riordan et al. (2000) *J Gene Med* 2: 444-54 ou centrifugação de CsCl (sorotipos 2/8 e 2/7) Rabinowitz et al. (2002) *J. Urrol.* 76:791-801. A titulação final de partículas de virion de AAV-ASM (partículas resistentes à DNase), foi determinada por PCR de TaqMan da seqüência de CMV. Clark et al. (1999) *Hum. Gene Therapy* 10:1031-1039.

15 Anticorpos de ASM humano são humanos específico e não reagem cruzado com ASM de camundongo. Placas de Coster (Corning, NY) 9018 revestidas (100 µl/poço) com anticorpo de ASM humana monoclonal recombinante (rhASM) (2 µg/ml) diluído em 50 mM de tampão de carbonato de sódio (pH 9,6) foram incubadas durante a noite @ 2-8°C. Anticorpo de revestimento de excesso foi removido e diluente de bloqueio (KPL, Inc., MD) foi adicionado por 1 h @ 37°C. As placas foram lavadas com uma lavadora de microplaca (Molecular Devices, CA) durante dois ciclos. Padrões, controles e amostras diluídos em tampão de diluição padrão (PBS, 0,05 % Tween, 1 % HP-BSA) foram pipetados em duplicata e deixados incubar por 1 h @

20 37°C. As placas foram lavadas como descrito acima. Cem microlitros de anticorpo de ASM humana biotinilado recombinante (rhASM) (diluído 1:20K em tampão de diluição padrão) foram adicionados a cada poço, deixados incubar por 1 h @ 37°C, e depois removidos com uma lavadora de microplaca. Estreptavidina - HRP (Pierce Biotechnology, Inc., IL) diluído 1:10K foi depois

25 adicionada (100 µl/poço) e deixada incubar por 30 min em temperatura ambiente. As placas foram lavadas como descrito acima e depois incubadas com SureBlue TMB (KPL, Inc., MD) durante 15 minutos @ 36-38°C. A rea-

30

ção foi parada com solução de interrupção (KPL1 Inc., MD) e valores de absorvância foram depois lidos a 450 nm com uma leitora de placa Spectra Max 340 (Molecular Devices, CA). Análise dos dados foi completada usando software de Softmax Pro 4.3 (Molecular Devices, CA).

5 A concentração de proteína para cada amostra foi determinada com um kit de ensaio de proteína de BCA (Pierce Biotechnology, Inc., IL) usando albumina de soro bovino como padrão.

 Camundongos foram transcardialmente perfurados com fixador contendo 2 % paraformaldeído, 0,03 % glutaraldeído, 0,002 % CaCl₂ em 0,1
10 M tampão de acetato de sódio em pH 6,5, seguido por perfusão com o mesmo fixador em pH 8,5. Cérebros e espinhas dorsais dos camundongos foram dissecados e pós-fixados durante a noite a 4°C em pH 8,5 fixados sem glutaraldeído. Os tecidos foram lavados em 0,1 M tampão de fosfato de potássio, pH 7,4, embebidos em 3,5 % ágar e cortados em seções sagitais
15 de 50 µm com um vibratome.

 Cérebros e espinhas dorsais foram sagitalmente seccionados em vibratome em intervalos de 50 µm. As seções foram processadas para imunofluorescência com anticorpos primários contra ASM humana (1:200). As seções foram incubadas em 10 % de soro de jumento, 0,3% Triton X-100
20 em PBS durante 1 hora, seguido por incubação com ASM anti-humana de camundongo biotinilado em 2 % soro de jumento, 0,2 % Triton X-100 em PBS durante 72 horas. Após lavar, o sinal foi amplificado usando um kit de Amplificação de Sinal Tyramide (PerkinElmer, Boston MA). Proteína de ASM humana foi visualizada com um microscópio fluorescente de Nikon, e imagens
25 foram capturadas com uma câmera SPOT e software Adobe Photoshop.

 Complexo de Filipin (Sigma, St., Louis, MO) foi diluído primeiro em 100 % de metanol para uma concentração de matéria-prima de 1 mg/ml. Solução de matéria-prima fica estável durante 4 semanas a -20°C. Após lavar com PBS1 as seções foram incubadas na escuridão por três horas em
30 uma solução de filipin recentemente feita de 10 µg/ml em PBS. Seções foram depois lavadas três vezes com PBS. Depósitos de colesterol foram visualizados sob um filtro ultravioleta em um microscópio de fluorescência.

Cérebros foram processados para imunofluorescência usando anticorpos primários direcionados contra a proteína ligadora de cálcio, calbindina. As seções foram lavadas com tampão de fosfato de potássio (KPBS) e depois enxaguadas com solução salina tamponada de fosfato de potássio (KPBS). Seções foram depois bloqueadas em 5 % soro de jumento, 0,25 % Triton X-100 em KPBS para até 3 horas e depois incubadas em 5 % soro de jumento, 0,2 % Triton X-100 e anti-calbindina de camundongo (1:2500, Sigma, St., Louis, MO) em KPBS. As seções foram enxaguadas com KPBS com 0,1 % Triton X-100 três vezes após 72 horas a 4°C. Anticorpo secundário, CY3 de camundongo de anti-jumento (1:333, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) foi adicionado em KPBS + 0,1 % Triton X-100 durante 90 minutos em temperatura ambiente. As seções foram lavadas com KPBS e depois montadas sobre lâminas revestidas com gel. As células calbindina-positivas foram visualizadas sob epifluorescência. Para quantificar células de Purkinje do cerebelo, quatro seções cerebelares de rosto cheio, medianas foram selecionadas de cada animal. Células de Purkinje calbindina-imunopositivas foram vistas sob um microscópio fluorescente e os corpos celulares foram contados em uma ampliação de 20X. Cada lóbulo foi contado separadamente. Dois planos focais separados foram contados por lóbulo. Apenas células no foco foram contadas para assegurar que nenhuma célula foi contada duas vezes.

Seções de vibratome de cinquenta (50) μm foram processadas primeiro para imunofluorescência com anticorpos direcionados contra ASM humana, como descrito acima. As seções foram depois lavadas em PBS e tingidas para colina acetiltransferase (ChAT; coelho policlonal, 1:500, Chemicon International, Temecula, CA) com o protocolo esboçado acima para calbindina. Ao invés de usar um anticorpo secundário de CY3, porém, FITC de jumento-anticoelho (1:200, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) foi usado. O tingimento foi visualizado primeiro sob epifluorescência e imagens posteriores foram adquiridas com um microscópio confocal.

Tingimento de filipin foi quantificado como segue. Imagens emparelhadas de exposição foram capturadas - usando um microscópio de epi-

fluorescência vertical de campo amplo Nikon E600 equipado com uma câ-
 mera digital SPOT. O grupo de AAV2/1 - β -gal foi primeiro imageado, e a-
 quella exposição foi usada para adquirir todas as imagens adicionais. Cada
 imagem analisada representa um plano sagital mediano através do compri-
 5 mento de cada meio-cérebro. Análise morfométrica foi executada com soft-
 ware Metamorph (Universal Imaging Corporation). As imagens de AAV2/1 -
 β -gal foram submetidas a limiares; uma vez estabelecido, o mesmo limiar foi
 usado em todas as imagens. As regiões a seguir foram selecionadas manu-
 10 almente pelo usuário e analisadas separadamente: cerebelo, pons, medula,
 cérebro médio, córtex cerebral, hipocampo, tálamo, hipotálamo e estrato.
 Intensidade integrada foi medida em cada região, e todas as medições ($n =$
 $3/\text{grupo}$) de um grupo dado de animais foram usados para gerar médias. A re-
 dução em colesterol nos animais tratados foi depois calculada como o por cento
 15 de diminuição da intensidade integrada comparada aos camundongos injeta-
 dos sedados de β -gal. Imunomanchação de hASM positiva foi observada ao
 longo do cerebelo (Tabela 1), pons, medula e espinha dorsal seguindo inje-
 ção unilateral de AAV-ASM dentro dos núcleos cerebelares profundos.

Tabela 1

20 Áreas com tingimento de hASM positiva como função de sorotipo
 de AAV. * indica hASM positiva estava limite abaixo da detecção, mas corre-
 ção de patologia de colesterol ainda ocorreu.

Estrutura	AAV1	AAV2	AAV5	AAV7	AAV8
núcleos cerebelares profundos	++++	++	+++	+++	++++
lóbulos cerebelares	++++	++	+++	+++	++++
pontes	++	++	++	++	+
medula	+	++	++	+++	+
espinha dorsal		+++	+++	++	+
tálamo	*	*	*	*	*
hipotálamo	*	*	*	*	*
hipocampo	*	*	*	*	*
estrato	*	*	*	*	*
córtex cerebral	*	*	*	*	*

Dentro do cerebelo camundongos tratados com AAV2/1-ASM tiveram o nível mais difundido (isto é, propagação entre lóbulos dentro da mesma seção sagital) de expressão de hASM, enquanto que os camundongos tratados com AAV2/2-ASM tiveram o nível mais restringido de expressão de proteína de ASM humana. Expressão de proteína de ASM humana em camundongos tratados com AAV2/5-ASM, AAV2/7-ASM, e AAV2/8-ASM foi intermediária entre estes dois grupos. Expansão mediana - lateral entre as seções sagitais foram máximas em camundongos tratados com sorotipos 1 & 8 e mínimas são camundongos injetados com sorotipo 2. Sorotipos 5 & 7 iniciaram padrões de propagação mediana - intermediária entre os sorotipos 1 e 2. Cada camada do cerebelo (isto é, molecular, Purkinje e granular) foi transduzida para cada sorotipo de AAV; porém, uma afinidade aumentada para a camada molecular foi evidente para todos os sorotipos. Transdução de célula de Purkinje foi máxima em camundongos tratados com sorotipos 1 e 5. Camundongos injetados com sorotipo 7 tiveram o menor número de células de Purkinje transduzidas. Camundongos tratados com sorotipo 8 também tiveram poucas células de Purkinje transduzidas, mas tiveram menos expressão de ASM dentro da camada granular quando comparada aos sorotipos 1, 2, 5 & 7. Células de Purkinje transduzidas com ASM pareciam ter uma citoestrutura saudável. Análise quantitativa de Expressão mediada por AAV de proteína de hASM por ELISA em homogeneizados de tecido cerebelar que suporta estes achados imunistoquímicos. Camundongos injetados com sorotipos 1 e 8 demonstraram significativamente ($p < 0,0001$) níveis de proteína de hASM de cerebelo mais altos quando comparados a todos os outros camundongos. Níveis de hASM cerebelar de camundongos injetados com sorotipos 2, 5, & 7 não estavam acima dos níveis de WT (isto é base). Como ASM humana esperada não foi detectada em camundongos do tipo selvagem - o anticorpo de hASM usado no ELISA é humano específico.

Uma ausência de proteína de ASM funcional resulta em acumulação lisossomal de esfingomielina, e defeitos metabólicos secundários subsequentes como tráfico de colesterol anormal. Sarna et al. *Eur. J. Neurosci.* 13:1873-1880 e Leventhal et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:44976-4498. A-

cúmulo de colesterol livre no cérebro de camundongo de ASMKO é visualizado processando filipin, uma molécula autofluorescente isolada de *Streptomyces filipinensis*. Cérebros de camundongo do tipo selvagem não tingem positivamente para filipin. Em todos camundongos tratados com AAV (com exceção para AAV2/1- β gal) liberação de tingimento de filipin (Tabela 2) sobreposta com áreas que foram positivas para imunomanchação de hASM indicando que cada vetor de sorotipo é capaz de gerar um produto de transgene funcional.

Tabela 2

10 Por cento de Redução em liberação de Filipin (isto é, colesterol) quando comparado aos camundongos de ASMKO tratados com AAV- β gal em regiões do cérebro selecionadas seguindo injeção intracerebelar de sorotipos de AAV diferentes (n=3/sorotipo; 2/1, 2/2, 2/5, 2/7, e 2/8) codificando para ASM humana nos núcleos cerebelares profundos de camundongos de ASMKO.

	2/1	2/2	2/5	2/7	2/8
Cerebelo	96,54 \pm 2,14	93,85 \pm 1,257	86,75 \pm 9,58	96,47 \pm 1,93	99,12 \pm 0,66
Cérebro intermediário	96,72 \pm 1,73	53,08 \pm 22,89	65,88 \pm 24,53	73,39 \pm 22,39	91,10 \pm 0,105
Pontes	91,31 \pm 5,80	50,07 \pm 21,26	70,96 \pm 25,60	93,15 \pm 31,20	96,72 \pm 1,20
Medula	93,29 \pm 6,22	88,46 \pm 3,04	81,55 \pm 17,31	80,73 \pm 14,99	97,40 \pm 1,60
Tálamo	48,88 \pm 25,25	41,21 \pm 27,35	34,86 \pm 16,67	48,44 \pm 28,65	77,03 \pm 12,08
Hipotálamo	82,81 \pm 10,14	86,96 \pm 12,93	88,46 \pm 5,90	82,95 \pm 11,46	99,68 \pm 0,31
Córtex	27,60 \pm 24,75	73,62 \pm 14,9	55,65 \pm 28,89	76,97 \pm 14,27	98,30 \pm 0,34

Como previamente demonstrado por (Passini et al. (2003) em "Society for Neuroscience" New Orleans, LA), liberação de filipin também ocorreu em áreas anatomicamente conectadas com o sítio de injeção, mas esta não tinha positivamente para hASM. Análise de MetaMorph indicou que
5 uma redução de tingimento de filipin ocorreu ao longo do eixo geométrico caudal rostral inteiro. No cerebelo e tronco cerebral e filipin foi maximamente reduzida em camundongos tratados com AAV2/1-ASM e AAV2/8-ASM, enquanto que nos camundongos de diencéfalo e de córtex cerebral injetados com AAV2/8-ASM teve o melhor nível geral de liberação de filipin (Tabela 2).
10 Não obstante, estes resultados indicam que o nível de hASM requerido para corrigir patologia de armazenamento de colesterol é o camundongo de ASMKO CNS é mínimo (isto é, abaixo do limite de detecção de imunofluorescência de hASM).

Estudos histológicos indicam que o cerebelo de camundongo de
15 ASMKO sofre deterioração rápida. Mais especificamente, células de Purkinje progressivamente morrem entre 8 e 20 semanas de idade (Sarna et al. (2001) Eur. J. Neurosci. 13:1813-1880 e Stewart et al. (2002) em "Society for Neuroscience", Orland, FL). Calbindina é um fabricante de célula de Purkinje amplamente aceito. Tingimento positivo de calbindina em camundongos tra-
20 tados com AAV-ASM sugeriu que expressão medida por AAV de hASM é terapêutica. No geral, nossos resultados indicam que expressão mediada por AAV de hASM no cerebelo impede morte de células de Purkinje no camundongo de ASMKO (Tabela 3). Como sobrevivência de célula de Purkinje esperada não ocorreu nos lóbulos IV/V; camundongos foram injetados em 7
25 semanas de idade e antes de 8 semanas a maior parte destas células já tinham morrido. Sobrevivência de célula de Purkinje nos lóbulos IV/V foi máxima em camundongos tratados com sorotipo 1. No lóbulo VI nenhuma sobrevivência de célula de Purkinje significativa foi observada em camundongos tratados com AAV. No lóbulo VII apenas camundongos tratados com
30 sorotipo 5 mostraram sobrevivência de célula de Purkinje significativa. No lóbulo VIII novamente camundongos tratados com sorotipo 5 como também sorotipo 2 mostraram sobrevivência de célula de Purkinje significativa. Nos

lóbulo IX e X não houve nenhuma diferença significativa entre os camundongos de WT e de KO (ou entre camundongos tratados com AAV) em contagens de célula de Purkinje. Isto foi esperado, porque em 14 semanas de idade (isto é, idade de sacrifício) células de Purkinje nestes lóbulos ainda são viáveis em camundongos de ASMKO. Ao longo de todos os lóbulos, sobrevivência de célula de Purkinje foi máxima em camundongos tratados com sorotipos 1, 2, & 5 e mínima em camundongos tratados com sorotipos 7 & 8.

Tabela 3

Contagem de célula de Purkinje nos lóbulos cerebelares I-X em camundongos WT e de ASMKO seguindo injeção intracerebelar de sorotipos de AAV diferentes (n=3/sorotipo; 2/1, 2/2, 2/5, 2/7, e 2/8) codificando para ASM humana nos núcleos cerebelares profundos de camundongos de ASMKO. Números que aparecem em itálico são significativamente diferentes dos camundongos de KO (isto é, camundongos tratados com AAV2/1-βgal) $p < 0,01$.

	2/1	2/2	2/5	2/7	2/8	KO	WT
I/II	7,42 ± 9,80	4,5 ± 10,58	9,40 ± 11,59	12,33 ± 10,58	1 ± 9,16	5,8 ± 11,59	113 ± 10,58
III	12,42 ± 10,32	11,33 ± 11,14	26,80 ± 12,21	15,33 ± 11,14	9,8 ± 12,21	2 ± 9,65	147,50 ± 11,14
IV/V	60,57 ± 17,28	36,5 ± 18,67	27,80 ± 20,45	29,66 ± 18,67	6,8 ± 20,45	8 ± 16,16	220,66 ± 18,67
VI	61,14 ± 11,21	27,5 ± 12,11	72,20 ± 13,26	31,16 ± 12,11	3,8 ± 13,26	68,5 ± 10,48	121,16 ± 12,11
VII	17,42 ± 4,15	37,66 ± 4,49	40,60 ± 4,91	5,33 ± 4,49	0,2 ± 4,95	17,37 ± 3,88	37,16 ± 4,49
VIII	44,14 ± 10,75	48,66 ± 11,62	82,80 ± 12,73	11,33 ± 11,62	18,40 ± 12,73	35,12 ± 10,06	103,33 ± 11,62
IX	126,28 ± 19,17	102,66 ± 20,71	136,40 ± 22,68	60,16 ± 20,71	84,40 ± 22,68	108,0 ± 17,93	144 ± 20,71
X	89,85 ± 12,54	76,83 ± 13,55	93,80 ± 14,84	48,16 ± 13,55	64,80 ± 14,84	87 ± 11,73	86,66 ± 13,55

No teste de rotarod de aceleração camundongos unilateralmente injetados com AAV2/1-ASM e AAV2/8-ASM demonstraram uma latência significativamente mais longa ($p < 0,0009$) para cair que os camundongos de ASMKO injetados com AAV2/1- β gal. Camundongos injetados com sorotipo 5 AA2/1-ASM não foram significativamente diferentes dos camundongos do tipo selvagem. Camundongos injetados com AAV2/2-ASM e AAV2/5-ASM mostraram uma tendência para uma latência mais longa de cair que os camundongos de ASMKO injetados com AAV2/1- β gal; enquanto que, camundongos injetados com AAV2/7-ASM não. Para o teste de rotarod de oscilação, apenas camundongos injetados com AA2/1-ASM demonstraram uma 10 latência significativamente mais longa ($p < 0,0001$) para cair que os camundongos injetados com M2/1- β gal. Neste caso aqueles camundongos do tipo selvagem desempenharam-se significativamente melhores que os camundongos injetados com AA2/1-ASM. Camundongos de ASMKO que receberam injeção bilateral ou AAV2/1-ASM ou AAV2/2-ASM desempenharam-se 15 significativamente melhores ($p < 0,001$) que os camundongos de ASMKO tratados com AAV2/1- β gal pelos testes de aceleração e oscilação. Camundongos bilateralmente injetados de AAV2/1-ASM desempenharam-se comparavelmente aos camundongos do tipo selvagem para ambos os testes.

20 Um modo para determinar se hASM gerado por AAV é funcionalmente ativo dentro do ASMKO CNS é para avaliar sua influência em patologia de armazenamento de colesterol - um defeito metabólico secundário de doença de NPA. Em todos os camundongos tratados com AAV (com exceção para AAV2/1- β gal) correção de patologia de armazenamento de colesterol 25 sobreposta com áreas que foram positivas para imunotintagem de hASM indicando que cada vetor de sorotipo é capaz de gerar um produto de transgene funcional. Como previamente demonstrado, correção de correção de metabolismo de colesterol anormal também ocorreu em áreas anatomicamente conectadas com o sítio de injeção, mas também em regiões que 30 não tingiram positivamente para hASM, sugerindo que o nível de hASM requerido para correção de patologia de armazenamento de colesterol é mínimo. Consistente com estes resultados histoquímicos e bioquímicos de hASM,

os camundongos tratados com sorotipos 1 e 8 demonstraram uma redução notável em patologia de armazenamento de colesterol. Camundongos tratados com sorotipos 2, 5, & 7 também mostraram uma redução em patologia de armazenamento de colesterol, mas não na mesma proporção que os camundongos tratados com sorotipos 1 & 8.

Modelo Terapeuticamente Relevante de Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS).

Esclerose lateral amiotrófica (ALS) é uma doença neurodegenerativa fatal que é caracterizada por uma perda seletiva dos neurônios motores no córtex, tronco cerebral e espinha dorsal. Progressão da doença pode conduzir à atrofia de membros, músculos axiais e respiratórios. Morte celular dos neurônios motores é acompanhada por gliose reativa, anormalidades de neurofilamento, e uma perda significativa de fibras mielinadas grandes nos tratos corticoespinhais e raízes ventrais ¹⁻⁶. Embora a etiologia de ALS seja muito pouco entendida, evidências cumulativas indicam que ALS esporádico (SALS) e familiar (FALS) compartilham muitas características patológicas similares; desse modo, fornecendo uma esperança que o estudo de qualquer forma conduzirá a um tratamento comum ⁷. FALS responde por aproximadamente 10 % dos casos diagnosticados destes 20 % são predominantemente associados às mutações herdadas em Cu/Zn superóxido dismutase (SOD1) ⁸. Camundongos transgênicos que expressam proteína de SOD1 humana mutante (por exemplo, camundongos de SOD1^{G93A}) recapitulam muitas características patológicas de ALS e são um modelo animal disponível para estudo ALS ⁹. Para SALS, uma miríade de mecanismos patológicos foi implicada como a causa subjacente, incluindo excitotoxicidade induzida por glutamato, exposição a toxinas, disfunção de proteassoma, dano mitocondrial, desorganização neurofilamentar e perda de suporte neurotrófico ^{10,11}.

Até agora não há nenhuma terapia eficaz para o tratamento de ALS. Fatores neurotróficos como fator-1 de crescimento de insulina (IGF-1) foi investigado extensivamente por sua utilidade potencial no tratamento de ALS. Liberação intracraniana de vetores virais (que são capazes de transporte axonal) às regiões do CNS, que é interconectada com o tronco cerebral e neurônios motores espinhais, fornece um meio de administrar terapêu-

ticas potenciais, como IGF-1, às áreas que seriam do contrário difíceis de alvejar através de meios da técnica anterior.

Sem estar limitado pela teoria, pode ser que estas regiões alvejadas não necessariamente necessitarão ter conexões diretas com neurônios motores; ou seja, pode ser suficiente para estas regiões alvejadas ter conexões diretas com as células (por exemplo, interneurônios e astrócitos) que meramente compõem o ambiente celular do neurônio motor. Esta suposição é suportada por estudos em camundongos quiméricos que são misturas de células normais e expressando mutante de SOD1. Estes experimentos mostraram que as células não-neuronais que não expressaram SOD1 mutante tardaram a degeneração e significativamente estendem a sobrevivência dos neurônios motores de expressão de mutante ¹³. Além disso, experimentos adicionais demonstraram que as células que compõem o ambiente celular de um neurônio motor (por exemplo, astrócitos e micróglia) são fontes importantes de fatores neurotróficos, e dano a estas células (como ocorre patologicamente em ALS) foi sugerido ser um dos fatores subjacentes que contribuem para a degeneração dos neurônios motores ¹¹.

Uma região do CNS que é provável suportar o transporte de um vetor viral terapêutico e/ou proteína expressa para o ambiente celular dos neurônios motores são os núcleos cerebelares profundos (DCN) do cerebelo. O DCN tem conexões aferentes e eferentes extensivas tanto com o tronco cerebral como com a espinha dorsal (vide figura 1) ¹⁴⁻¹⁹. Alvejamento do DCN em um modelo de camundongo de doença neurometabólica com vetores virais capazes de transporte axonal resultou na detecção da proteína de transgene no tronco cerebral e espinha dorsal ²⁰. De forma interessante a proteína de transgene foi detectada em células que foram tanto positivas como negativas para colina acetiltransferase (ChaT), um marcador de neurônio motor.

Sobre-expressão das mutações de gene de superóxido dismutase-1 (SOD1) em camundongos e ratos recapitulam as características clínicas e patológicas de ALS em humanos. Compostos ativos em retardar os sintomas neste modelo foram mostrados ser predicativos para eficácia clíni-

ca em pacientes com ALS, e são portanto um modelo terapeuticamente relevante desta doença. Tais modelos de camundongo foram previamente descritos em Tu et al. (1996) P.N.A.S. 93:3155-3160; Kaspar et al. (2003) Science 301 :839-842; Roaul et al. (2005) Nat. Med. 11(4):423-428 e Ralph et al. (2005) Nat. Med. 11(4):429-433.

Portanto, os experimentos atuais buscaram investigar a influência de liberação de DCN bilateral de AAV-IGF-1 na progressão de doença em camundongos de SOD1G93A sintomáticos (isto é, 90 dias de idade). Especificamente, as metas primárias foram determinar se a liberação de AAV-IGF-1 resultou em (1) liberação de vetor e/ou proteína para o tronco cerebral e espinha dorsal; (2) uma redução em neuropatologia no tronco cerebral e espinha dorsal; (3) melhoria na função de comportamento motor; e (4) uma extensão significativa de período de vida. Os resultados indicam que a injeção de vetores virais para regiões do CNS que são interconectadas com o tronco cerebral e espinha dorsal é um método viável para liberar transgenes terapêuticos potenciais ao tronco cerebral e à espinha dorsal. Além disso, nossos resultados suportam o desenvolvimento de terapias que são projetadas para tratar degeneração de neurônio motor através de modificação de seu ambiente celular.

Dois estudos foram executados no SOD1 de G93A (camundongo de SOD1G93A mutante, referido aqui ao camundongo de SOD1). Este modelo mimetiza exatamente ALS humana. Há degeneração de neurônio motor progressiva com déficits motores dos membros traseiros que aparecem por volta de 90 dias de idade no camundongo. Morte ocorre por volta de 120 - 122 dias. Cada estudo teve quatro grupos de tratamento: 1) camundongos receberam sorotipo de AAV 1 codificando para IGF-1 (AAV1-IGF-1); 2) camundongos receberam sorotipo de AAV 1 codificando para proteína fluorescente verde (AAV1-GFP); 3) camundongos receberam sorotipo de AAV 2 codificando para IGF-1 (AAV2-IGF-1); e 4) camundongos receberam sorotipo de AAV 2 codificando para proteína fluorescente verde (AAV2-GFP).

Sem estar limitado pela teoria, IGF-1 é uma proteína terapêutica para o tratamento de ALS devido a suas muitas ações em níveis diferentes

de neuraxia (vide Dire et al., *Tends Neurosci*, 1997, 20:326-331). No cérebro: é suposto reduzir apoptose neuronal e glial, proteger neurônios contra toxicidade induzida por ferro, colquicina, desestabilizantes de cálcio, peróxidos e citocinas. Isto é também suposto modular a liberação de acetilcolina de neurotransmissores e glutamato. É também suposto induzir a expressão de neurofilamento, tubulina e proteína básica de mielina. Na espinha dorsal: IGF-1 é suposto modular atividade de ChaT e atenuar perda de fenótipo colinérgico, intensificar brotamento de neurônios motores, aumentar mielinização, inibir desmielinização, estimular proliferação de neurônios motores e diferenciação de células precursoras, e promover divisão, maturação, e crescimento de células de Schwann. No músculo: IGF-1 é suposto induzir formação de agrupamento de receptor de acetilcolina na junção neuromuscular e aumentar função neuromuscular e resistência muscular. Neste experimento, a forma de IGF-1Ea da proteína foi utilizada.

Proteína fluorescente verde foi utilizada como uma proteína de controle que também permitiu a visualização de expressão mediada pela injeção dos vetores de AAV.

Noventa dias após nascimento, camundongos de SOD1 foram bilateralmente injetados no DCN com os vetores de AAV recombinantes. Em um estudo, a dose foi aproximadamente 2,0 e 10 gc/ml injetados por sítio. Certos camundongos foram sacrificados aproximadamente 110 dias após nascimento e seus cérebro e espinha dorsal foram analisados por tingimento de GFP, expressão de IGF-1 por meio de imunistoquímica, expressão de IGF-1 por meio de ELISA, expressão de IGF-1 por meio de TA-PCR, localização de ChaT por meio de imunistoquímica, expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), contagem de neurônios motores, testagem funcional (oscilação e aceleração) no rotarod como descrito acima, resistência ao aperto dos membros dianteiros e membros traseiros usando um medidor de resistência ao aperto, e sobrevivência.

Um "evento de morte" foi entrado quando os animais não puderam mais "endireita-se" dentro de 30 segundos após o animal ter sido deitado de costas, ou os animais foram encontrados mortos pelos técnicos de

cuidado do animal. Classificação de "evento de morte" foi executada por 2 indivíduos com o grupo do animal (GFP vs. IGF-1 que é cego) no tempo de avaliação.

5 GFP foi detectado no tronco cerebral e ao longo de cada divisão da espinha dorsal seguindo liberação bilateral de um vetor de expressão de GFP de AAV para os núcleos cerebelares profundos (DCN) (vide figuras 13 e 14). A figura 22 mostra distribuição de GFP dentro do cérebro do camundongo. Além do DCN, tingimento positivo de GFP foi também observado nos bolbos olfatórios, córtex cerebral, tálamo, tronco cerebral, córtex cerebelares e espinha dorsal. Todas estas áreas ou recebem projeções e/ou enviaram
10 projeções ao DCN. Além disso, fibras e/ou células positivas de GFP foram observadas em proximidade às células positivas de ChaT.

MRNA de IGF-1 foi detectado no tronco cerebral e em cada divisão da espinha dorsal em camundongos tratados com AAV1-IGF-1 ou A-
15 AV2-IGF-1 que demonstram que o vetor sofreu transporte retrógrado (vide figura 18). Proteína de IGF-1 foi detectada no tronco cerebral e na espinha dorsal em camundongos tratados com AAV1-IGF-1 ou AAV2-IGF-1. Uma redução no tingimento de GFAP nos núcleos oromotores (por exemplo, o núcleo motor trigeminal, núcleo facial e núcleo hipoglossal) e em cada divisão da espinha dorsal foi observada em camundongos tratados com AAV1-
20 IGF-1 ou AAV2-IGF-1 (vide figuras 15-17). GFAP é um marcador de gliose que é uma marca patológica de ALS. Liberação de AAV1-IGF-1 ou AAV2-IGF1 conduziram à melhoria funcional significativa nas tarefas de rotarod e de resistência ao aperto (vide figura 20). Liberação de AAV-IGF-1 AAV2-
25 IGF1 também significativamente estenderam o período de vida do camundongo de SOD1 (vide figura 21 onde sobrevivência mediana aumentou para 133,5 ou 134 dias em camundongos tratados com AAV-IGF-1 quando comparado a 121 ou 120 dias em camundongos tratados com AAV-GFP). Figura 19 ilustra que liberação de DCN de AAV-IGF-1 promoveu a sobrevivência de
30 neurônios motores. A diferença entre os camundongos tratados com AAV que codifica para IGF-1 quando comparada à liberação de DCN de AAV que codifica para GFP é estatisticamente significativa para um valor $p = 0,01$

como indicado pelo asterisco.

Independente do sorotipo, tratamento de AAV-IGF-1 significativamente promoveu sobrevivência de neurônio motor, desempenho motor melhorado em testes de rotarod e resistência ao aperto, e período de vida
5 significativamente estendido. Expressão de IGF-1 foi detectada ao longo do tronco cerebral e da espinha dorsal usando PCR e ELISA.

O relatório descritivo é completamente entendido levando em conta os ensinamentos das referências citadas dentro do relatório descritivo. As modalidades dentro do relatório descritivo fornecem uma ilustração das
10 modalidades da invenção e não deveriam ser interpretadas para limitar o escopo da invenção. O artesão versado reconhece facilmente que muitas outras modalidades são abrangidas pela invenção. Todas as publicações, patentes, e seqüências biológicas citadas nesta descrição são incorporadas por referência em sua totalidade. À medida que o material incorporado por
15 referência contradiz ou é incompatível com o presente relatório descritivo, o presente relatório descritivo substituirá qualquer tal material. A citação de qualquer referência aqui não é uma admissão que tais referências sejam técnica anterior à presente invenção.

A menos que do contrário indicado, todos os números que expressam quantidades de ingredientes, cultura de células, condições de tratamento, e assim sucessivamente usados no relatório descritivo, incluindo reivindicações, são para ser entendidos como sendo modificados em todas as circunstâncias pelo termo "cerca de". Conseqüentemente, a menos que
20 diferentemente indicado ao contrário, os parâmetros numéricos são aproximações e podem muito dependendo das propriedades desejadas buscadas ser obtidos pela presente invenção. A menos que do contrário indicado, o termo "pelo menos" precedendo uma série de elementos é para ser entendido para referir a cada elemento na série. Aqueles versados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de averiguar usando experimentação mais que
25 rotineiras, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção descritas aqui. Tais equivalentes são intencionados ser abrangidos pelas reivindicações a seguir.
30

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
5 *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,
10 471-80 (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).
15
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
20 (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
25 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-
30 19 (2001).
13. Lindsay, R. M. Neurotrophic growth factors and neurodegenerative di-

- seases: 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).
- 5
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).
- 10
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).
- 15
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
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); 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).

REIVINDICAÇÕES

1. Método compreendendo administrar um vetor viral neurotrópico recombinante compreendendo um transgene a pelo menos uma região da região dos núcleos cerebelares profundos do cérebro, em que a dita administração está sob condições que favorecem a liberação do produto de transgene à espinha dorsal e/ou tronco cerebral.

2. Método compreendendo administrar um vetor viral neurotrópico recombinante compreendendo um transgene à região do córtex motor do cérebro, em que a dita administração está sob condições que favorecem a liberação do produto de transgene à espinha dorsal.

3. Método para liberar um transgene a um neurônio motor em um indivíduo, compreendendo administrar um vetor viral neurotrópico recombinante compreendendo o dito transgene a pelo menos uma região da região dos núcleos cerebelares profundos do cérebro, em que o dito transgene é expressado ou liberado em um neurônio motor distal ao dito sítio de administração.

4. Método para liberar um transgene a um neurônio motor em um indivíduo, compreendendo administrar um vetor viral neurotrópico compreendendo o dito transgene à região do córtex motor do cérebro, em que o dito transgene é expressado ou liberado a um neurônio motor distal ao dito sítio de administração.

5. Método para tratar um distúrbio de neurônio motor em um indivíduo, compreendendo administrar um vetor viral neurotrópico recombinante compreendendo um transgene terapêutico a pelo menos uma região da região dos núcleos cerebelares profundos do cérebro, em que o produto de transgene é liberado em uma quantidade terapêuticamente eficaz a pelo menos uma subdivisão da espinha dorsal e/ou pelo menos uma divisão do tronco cerebral.

6. Método para melhorar os sintomas de um distúrbio de neurônio motor em um indivíduo, compreendendo administrar um vetor viral neurotrópico recombinante compreendendo um transgene terapêutico à região do córtex motor do cérebro, em que o produto de transgene é liberado em uma

quantidade terapeuticamente eficaz a pelo menos uma subdivisão da espinha dorsal.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o dito vetor viral neurotrópico é um vetor viral adeno-associado (AAV).

5 8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o dito vetor viral neurotrópico é um vetor viral adeno-associado, selecionado de um grupo que consiste em AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, e AAV8.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3 ou 5, em que a dita região da região dos núcleos cerebelares profundos do cérebro é selecionada do grupo que consiste na região mediana, região interposta e na região lateral.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a dita liberação é bilateral.

15 11. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, em que a dita subdivisão de espinha dorsal é selecionada do grupo que consiste na subdivisão cervical, na subdivisão torácica, na subdivisão lombar, e na subdivisão sacra.

12. Método de acordo com a reivindicação 5 ou 6, em que o dito transgene é liberado a todas as subdivisões da espinha dorsal.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, em que pelo menos uma das ditas múltiplas administrações é bilateral.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o dito transgene é selecionado do grupo que consiste em fator-1 de crescimento de insulina (IGF-1), calbindina D28, paralbumina, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2 e CNTF (Fator neurotrópico ciliar).

15. Método de acordo com a reivindicação 6, em que a expressão do dito transgene alivia os sintomas de um distúrbio neuronal motor selecionado do grupo que consiste em esclerose lateral amiotrófica (ALS), esclerose lateral primária (PLS), atrofia muscular bulbar espinhal, ataxia cerebelar espinhal, atrofia muscular espinhal, e lesão traumática de espinha dorsal.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o dito indivíduo é um paciente humano.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o dito transgene expressa uma quantidade terapêutica de uma proteína selecionada do grupo que consiste em fator-1 de crescimento de insulina (IGF-1), EPO (eritropoietina), CBP (proteína de ligação de proteína ligadora de elemento de resposta de cAMP [CREB]), calbindina D28, paralbumina, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2 e CNTF (fator neurotrófico Ciliar).

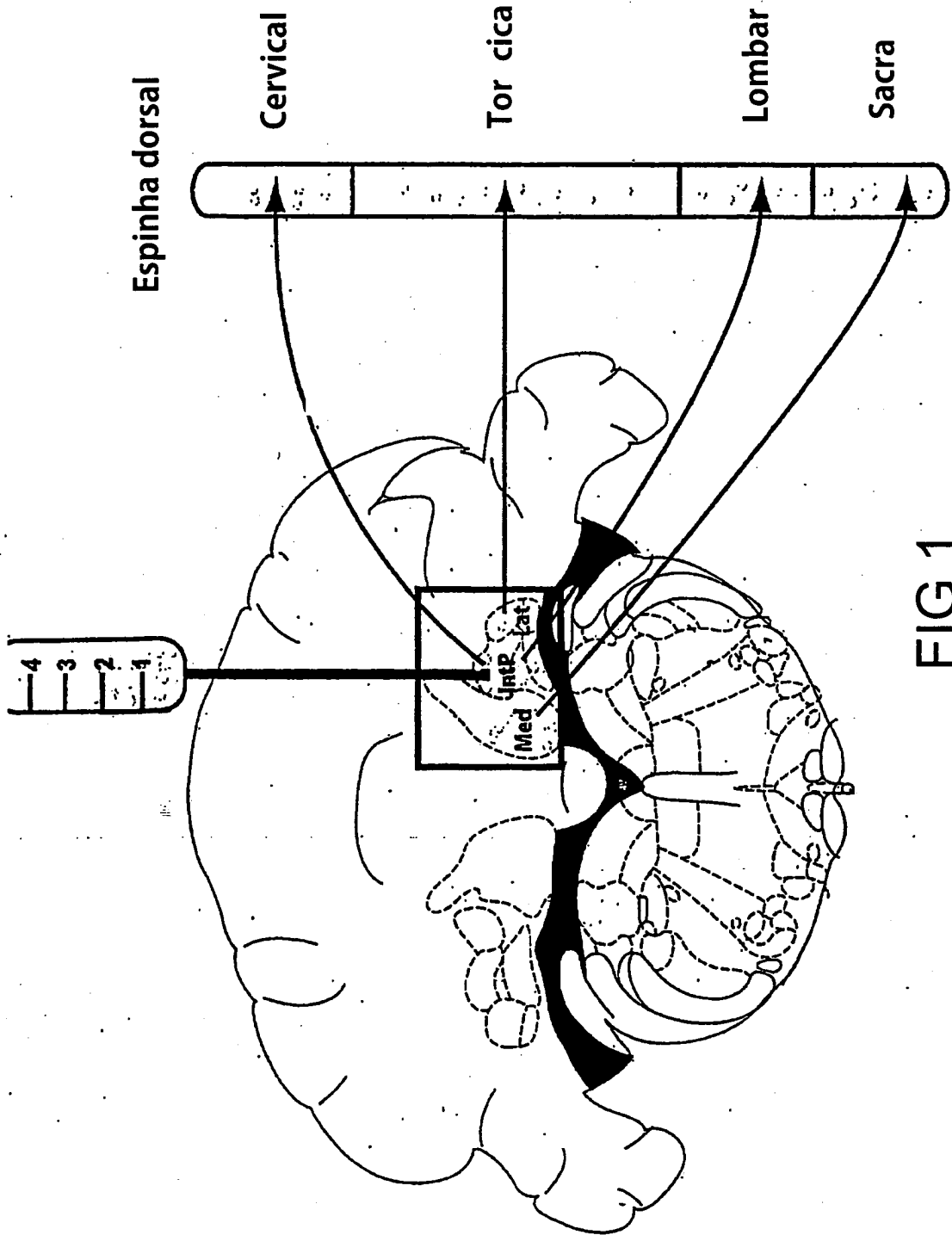


FIG 1

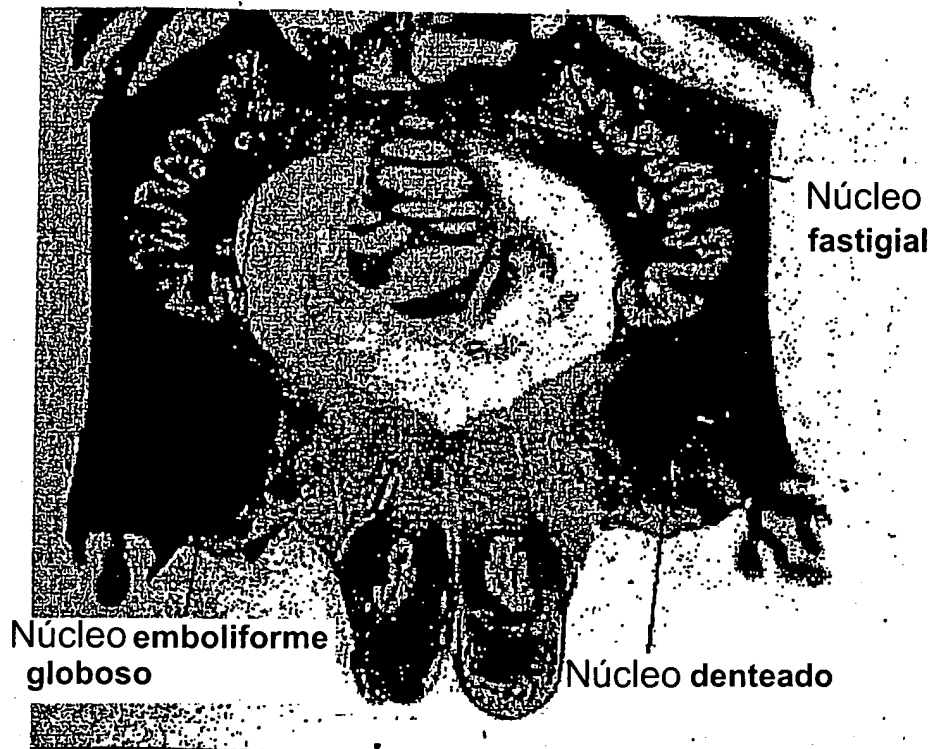


FIG 2

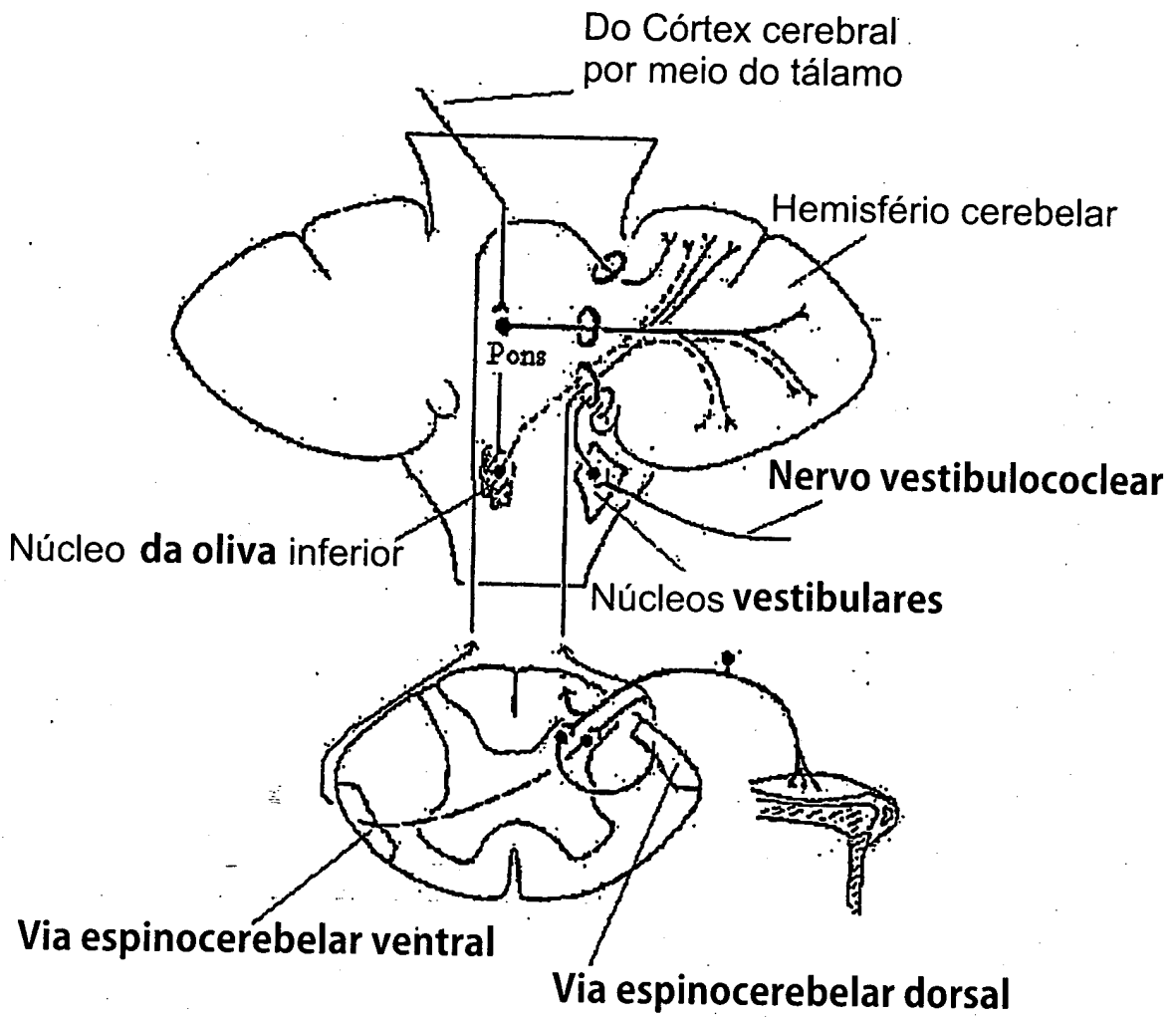


FIG 3

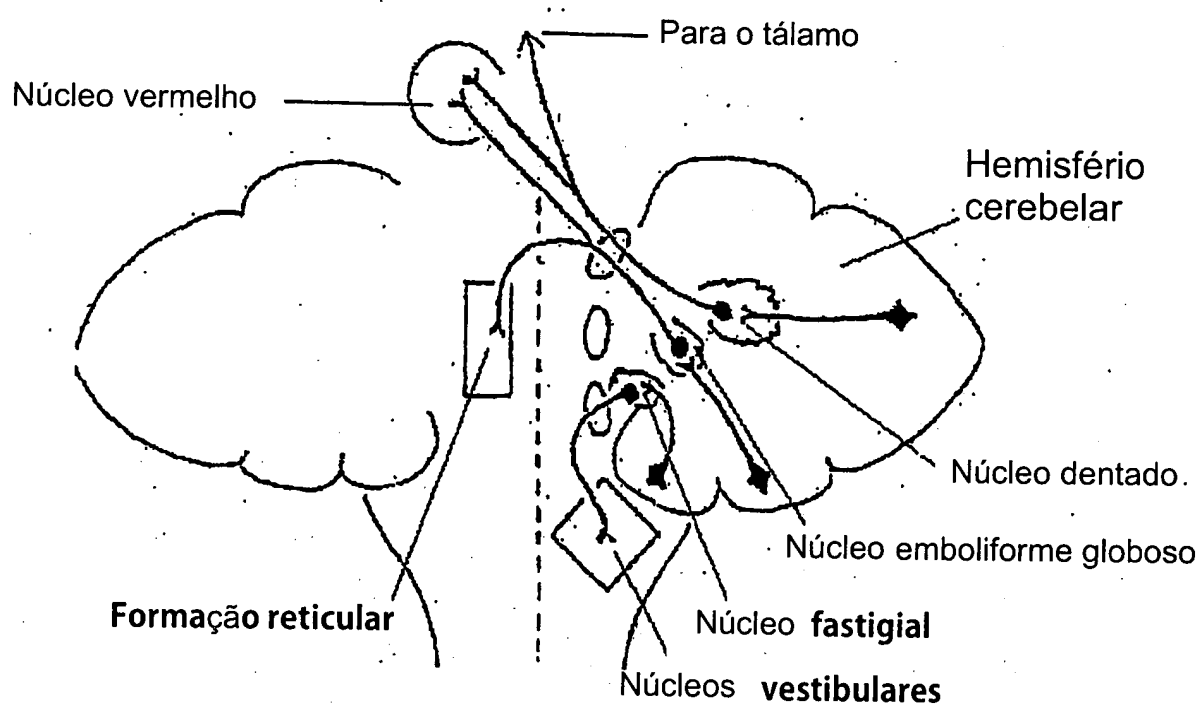


FIG 4

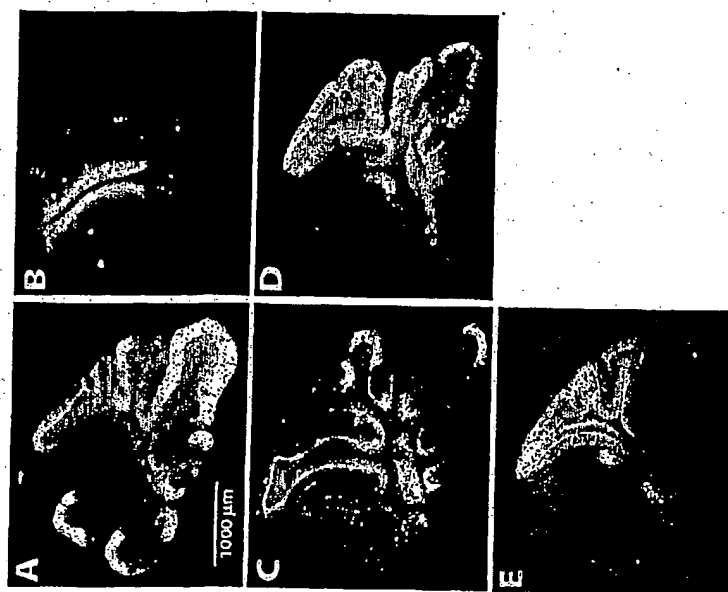


FIG 6

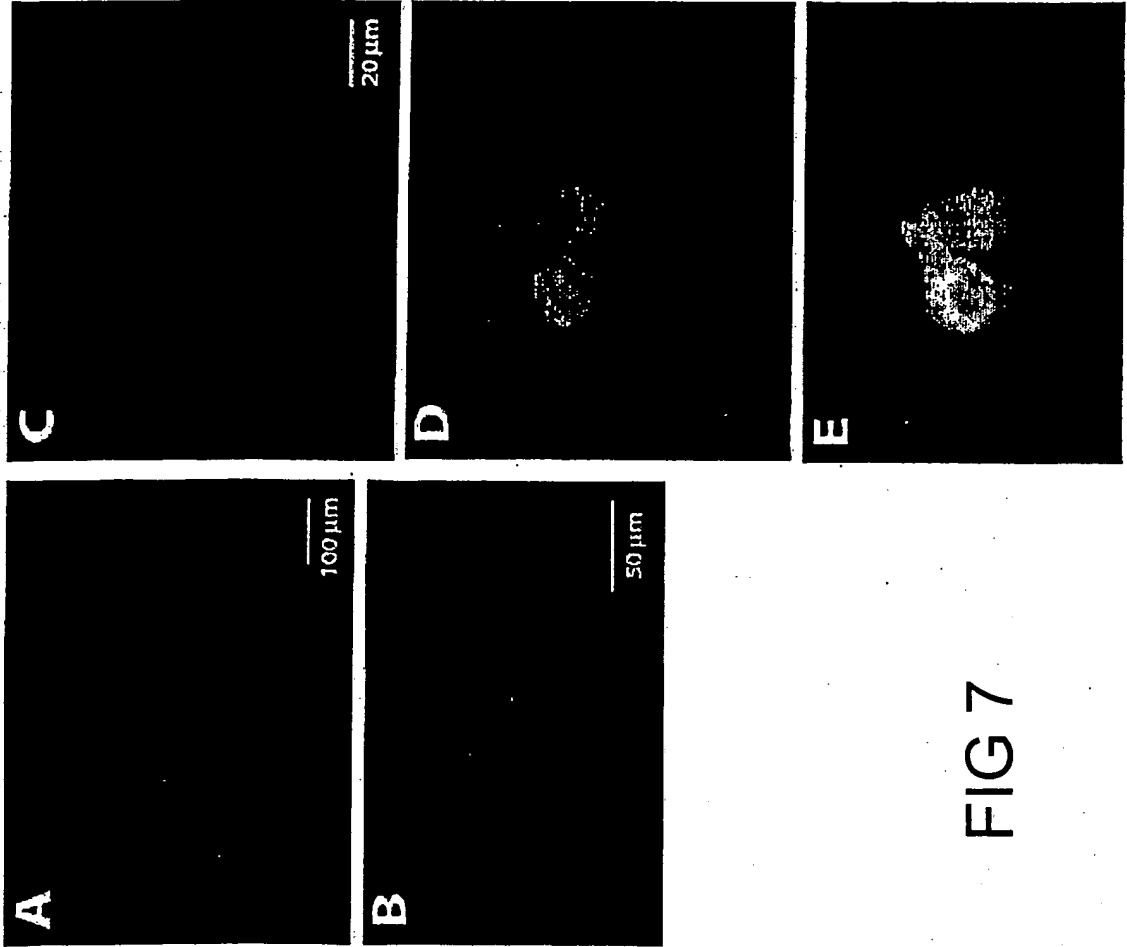


FIG 7

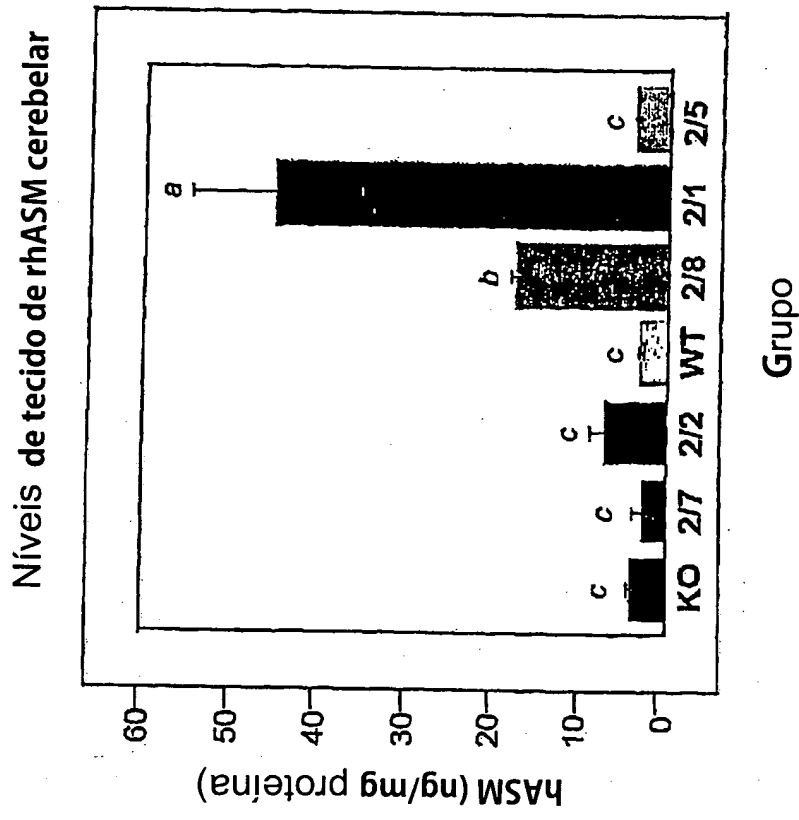
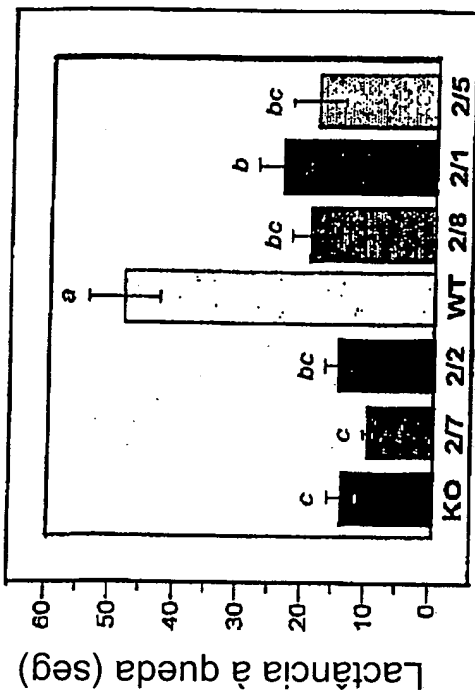


FIG 8



FIG 9

Rotarod de oscilação



Rotarod de aceleração

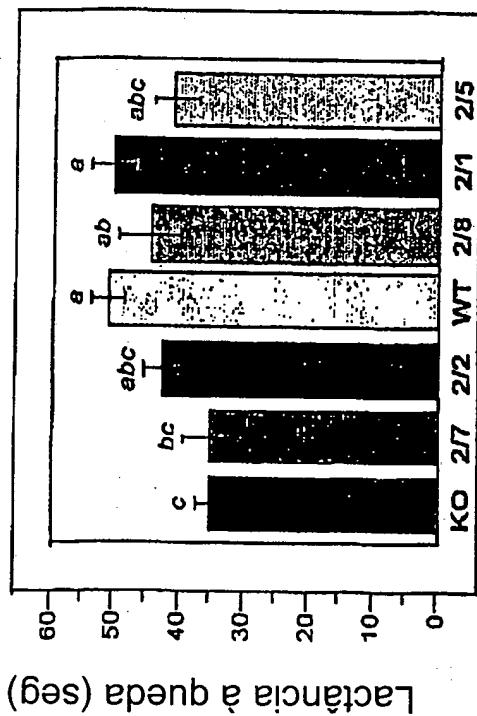


FIG 10

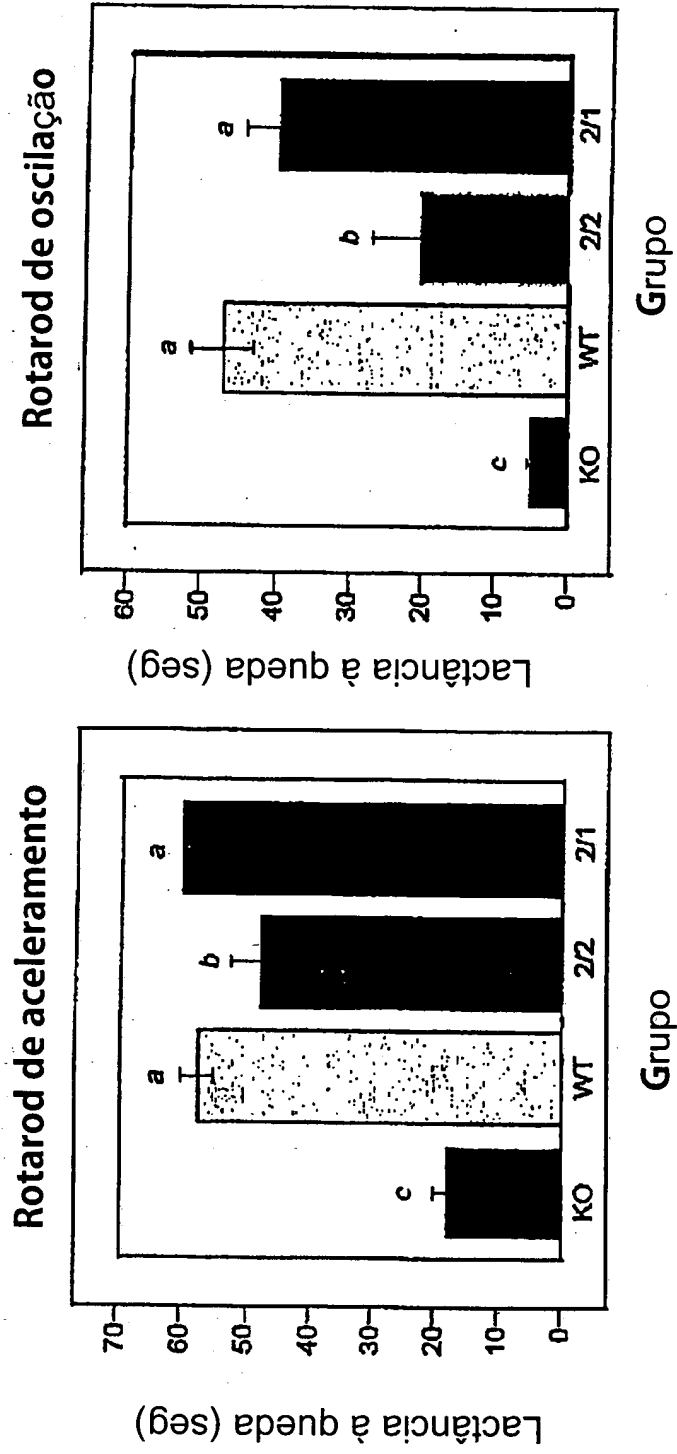


FIG 11

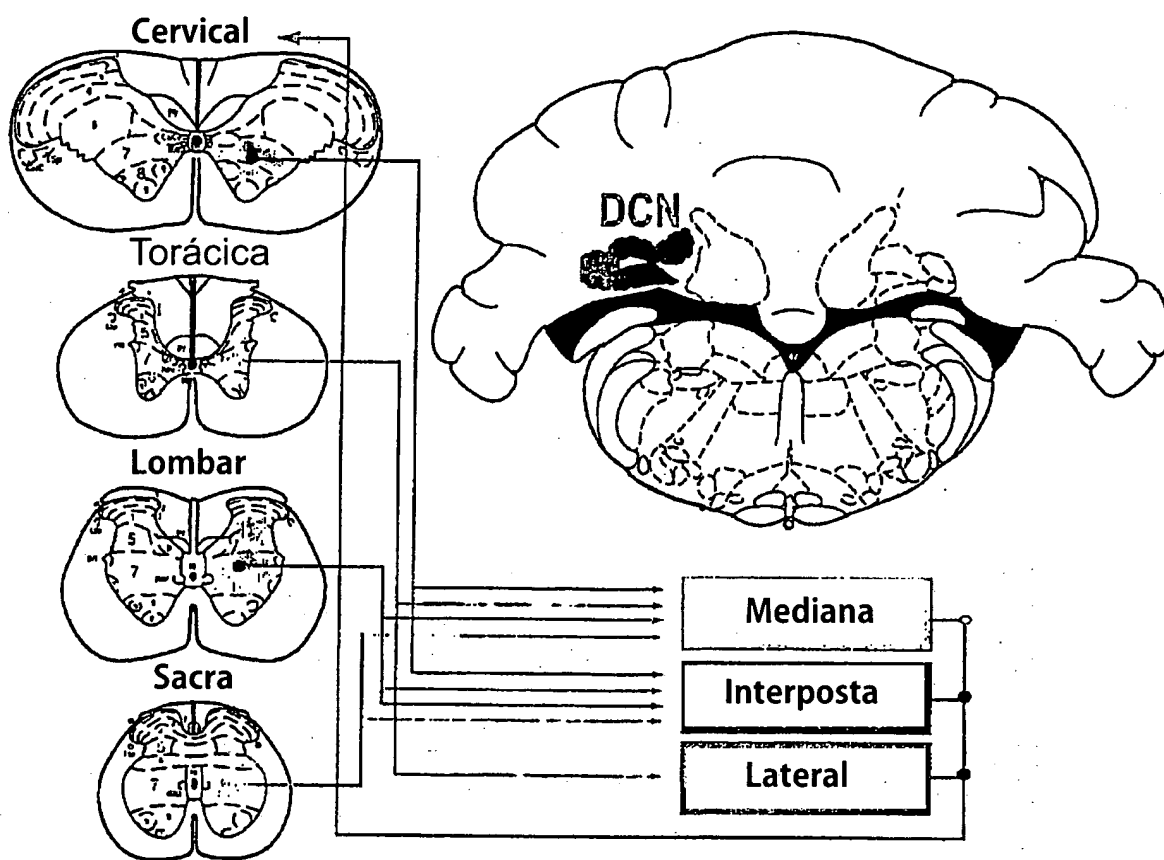


FIG 12A

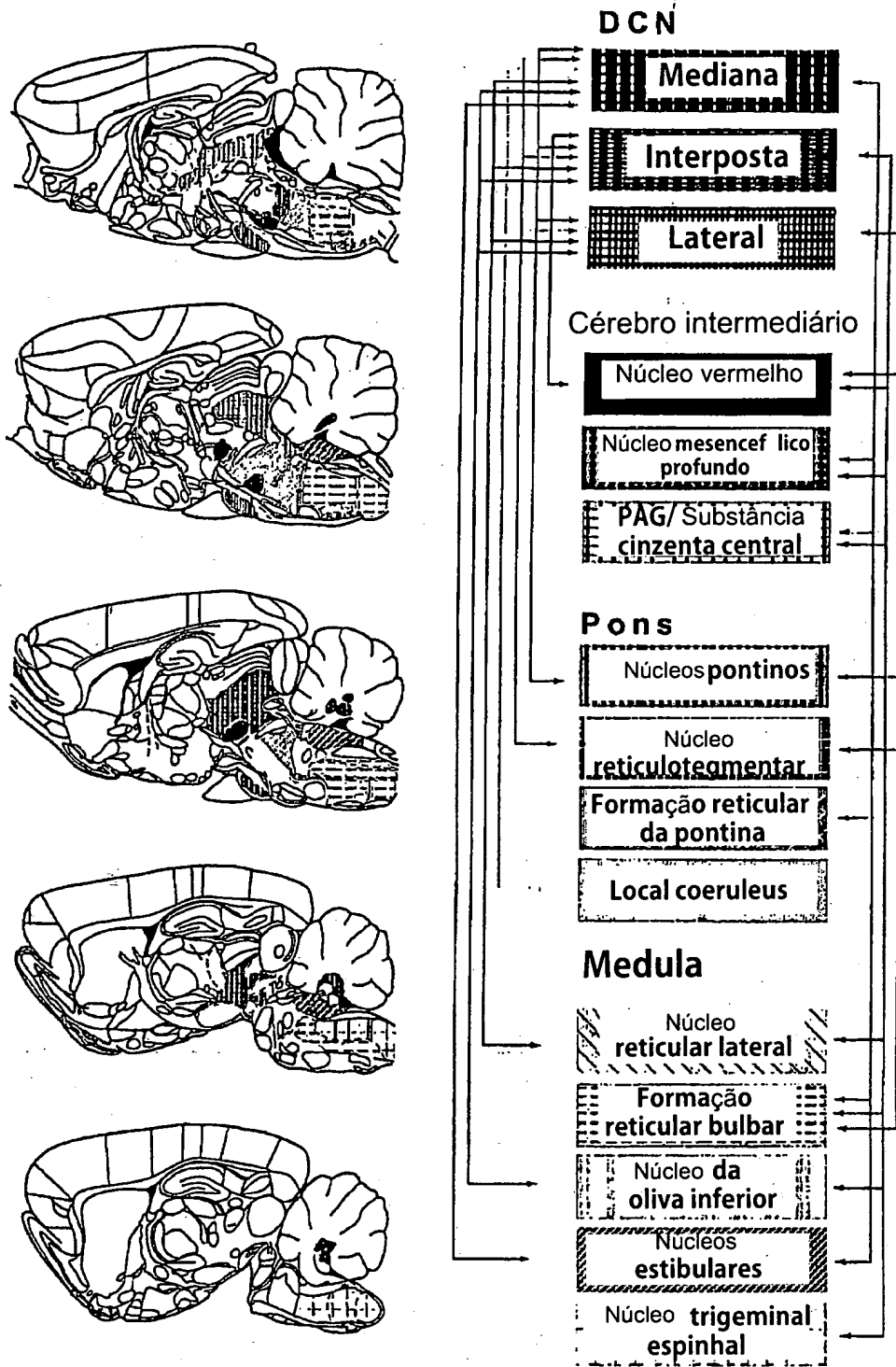


FIG 12B

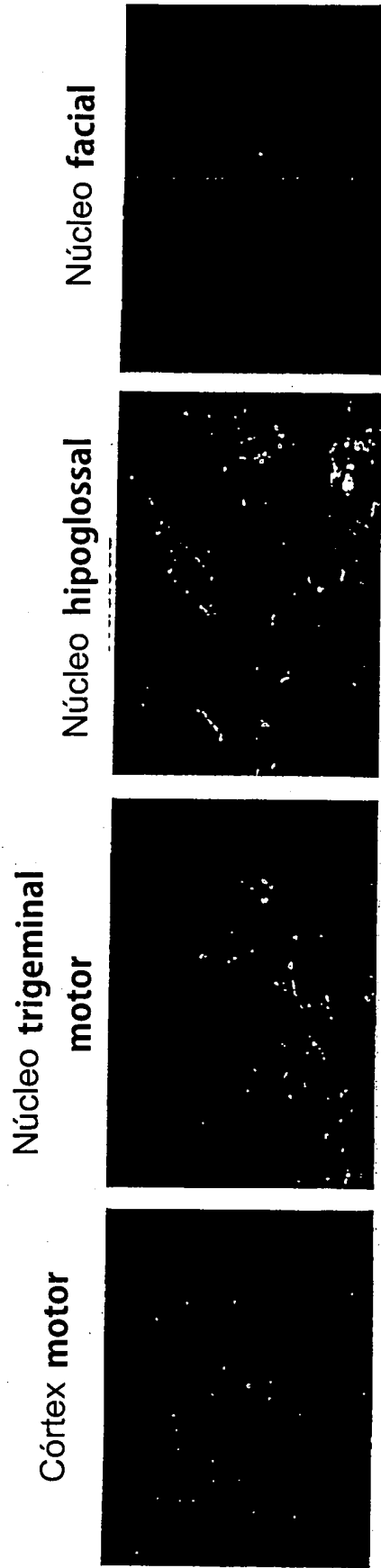


FIG 13

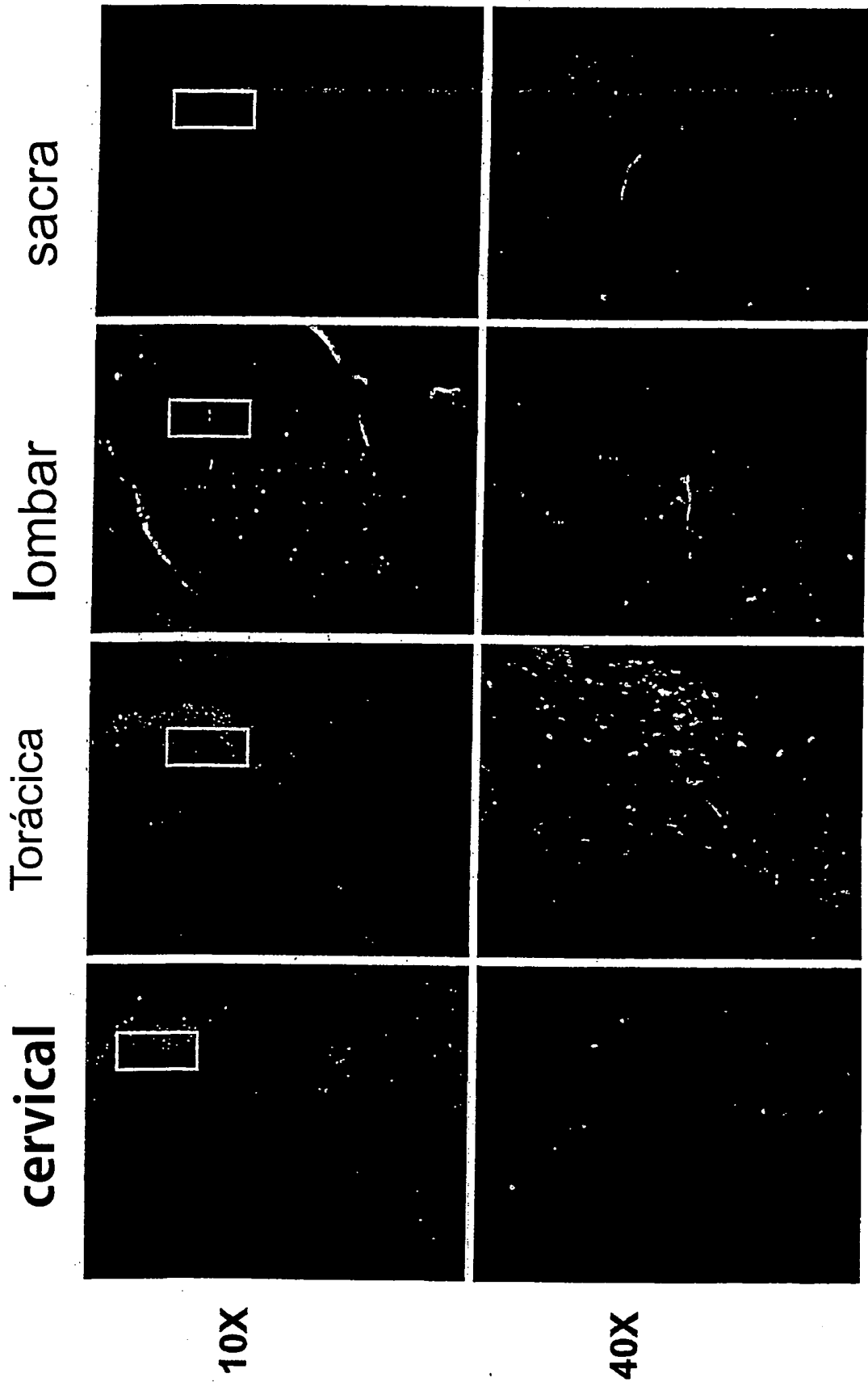


FIG 14

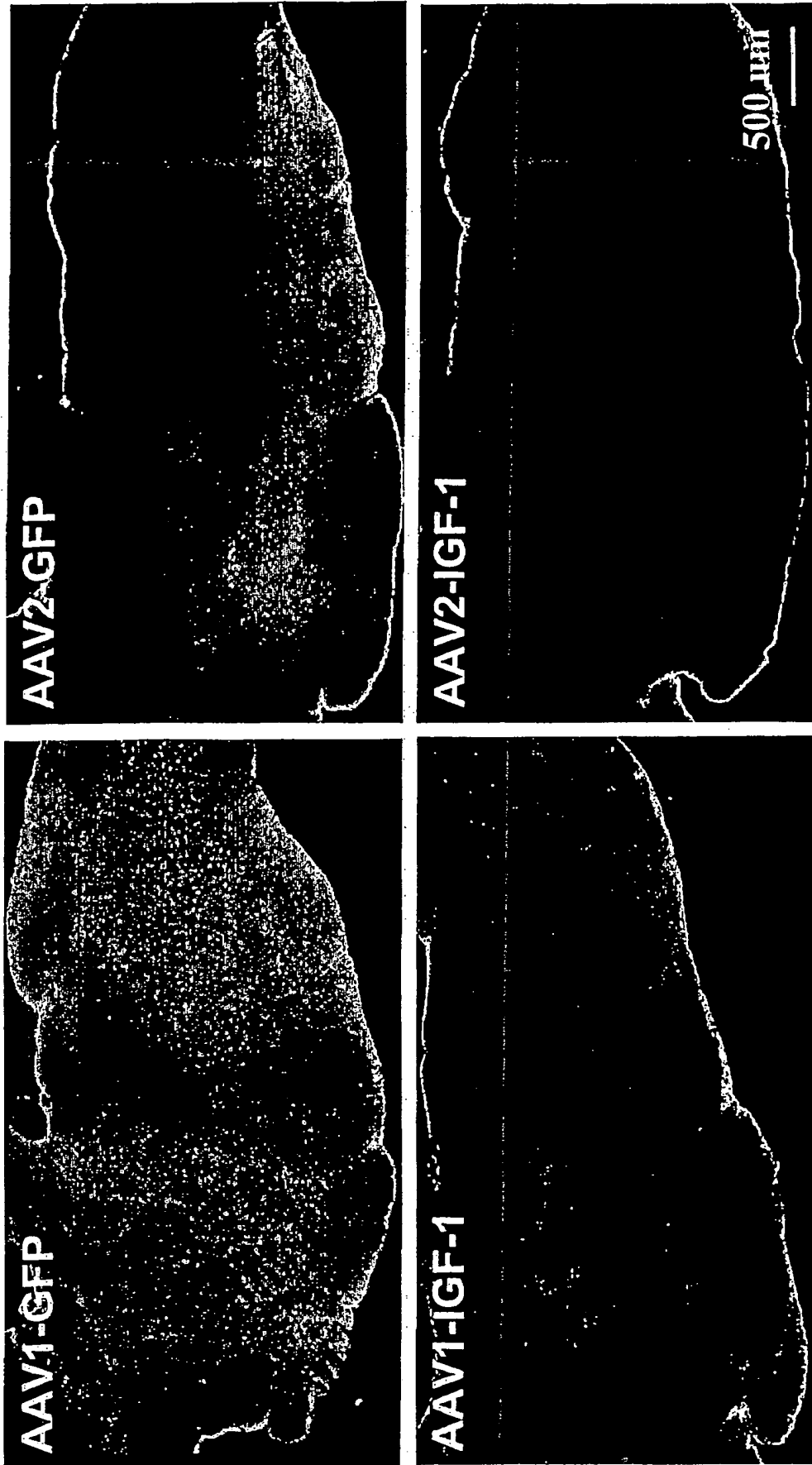


FIG 15

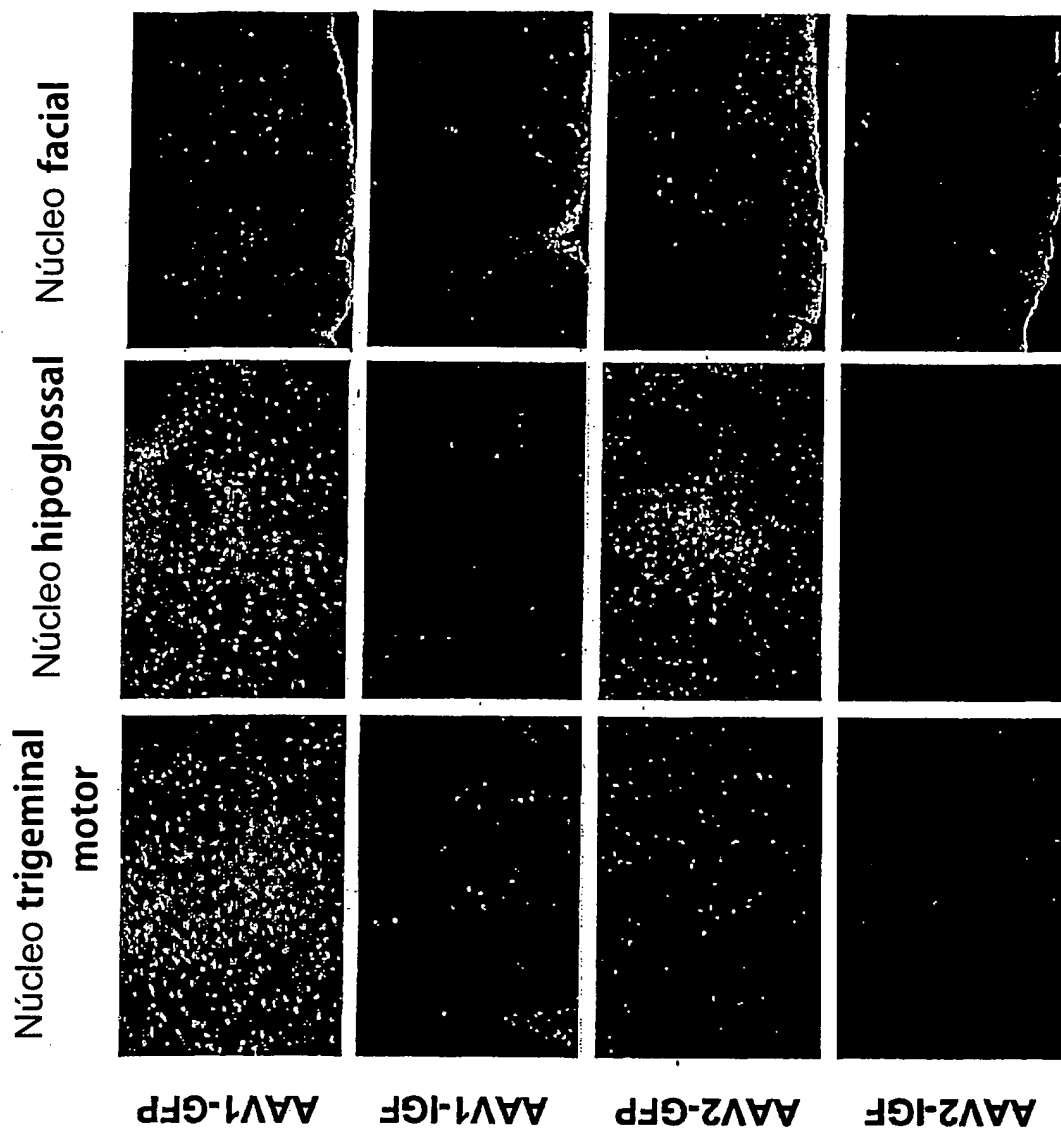


FIG 16

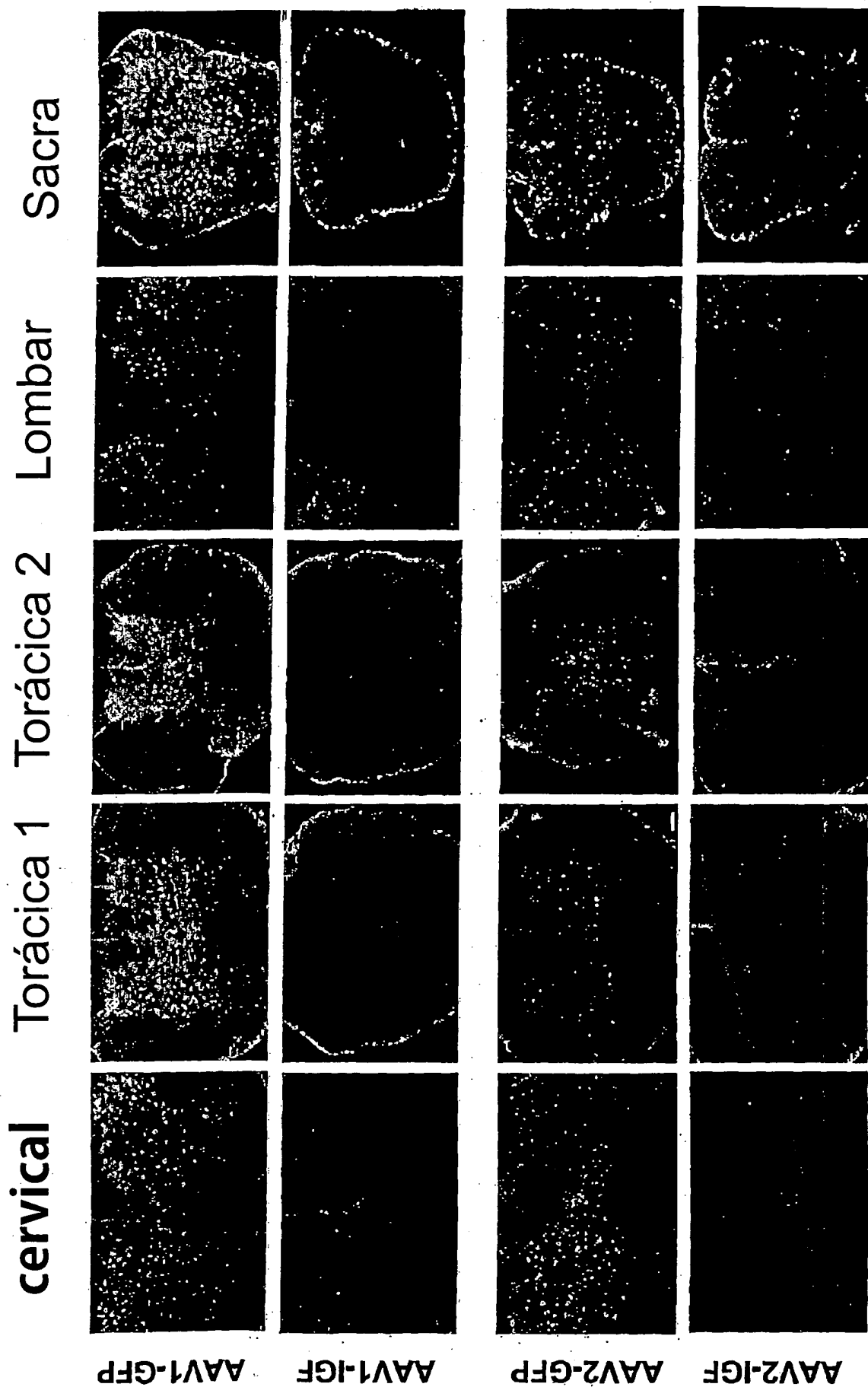


FIG 17

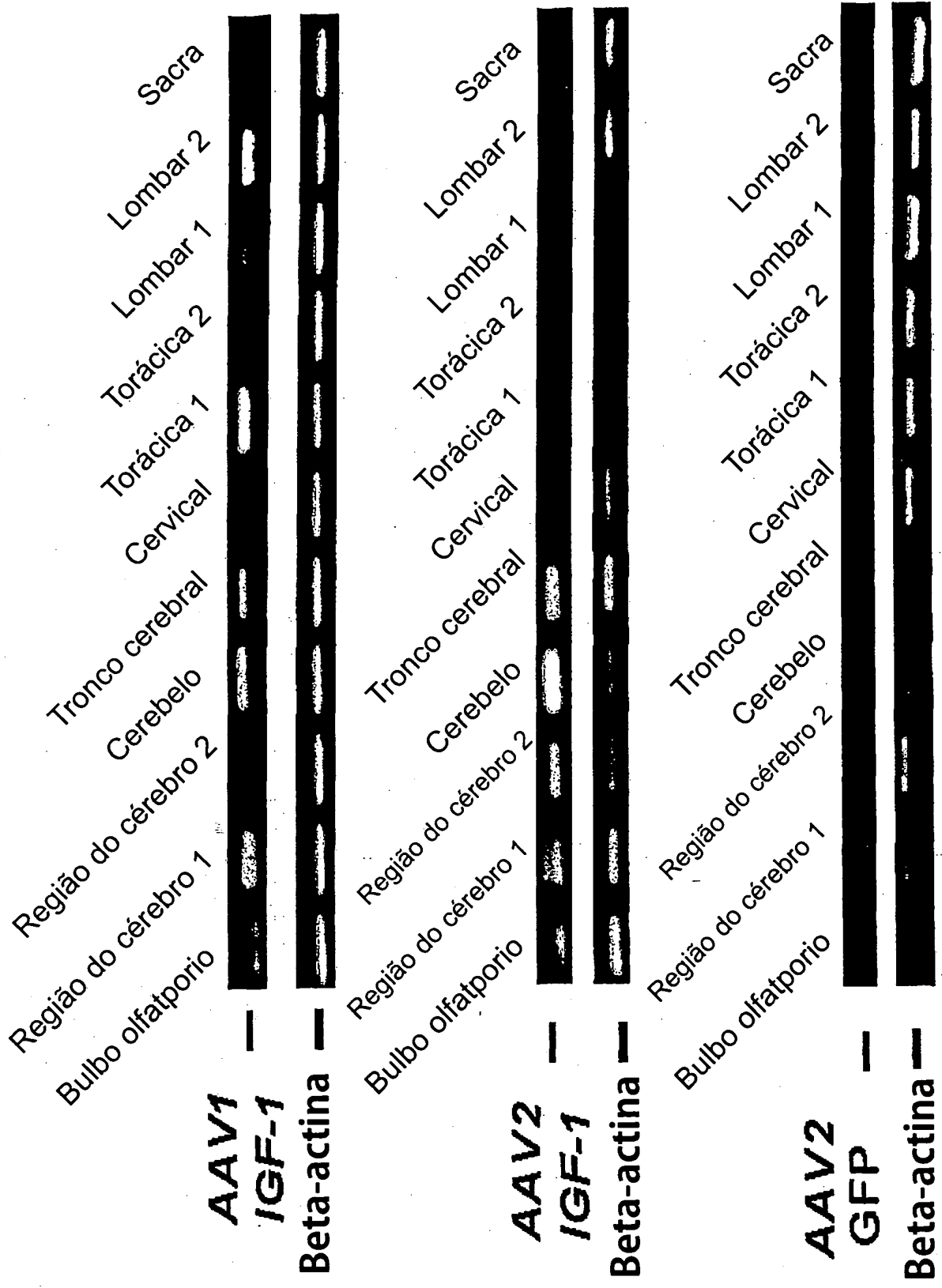


FIG 18

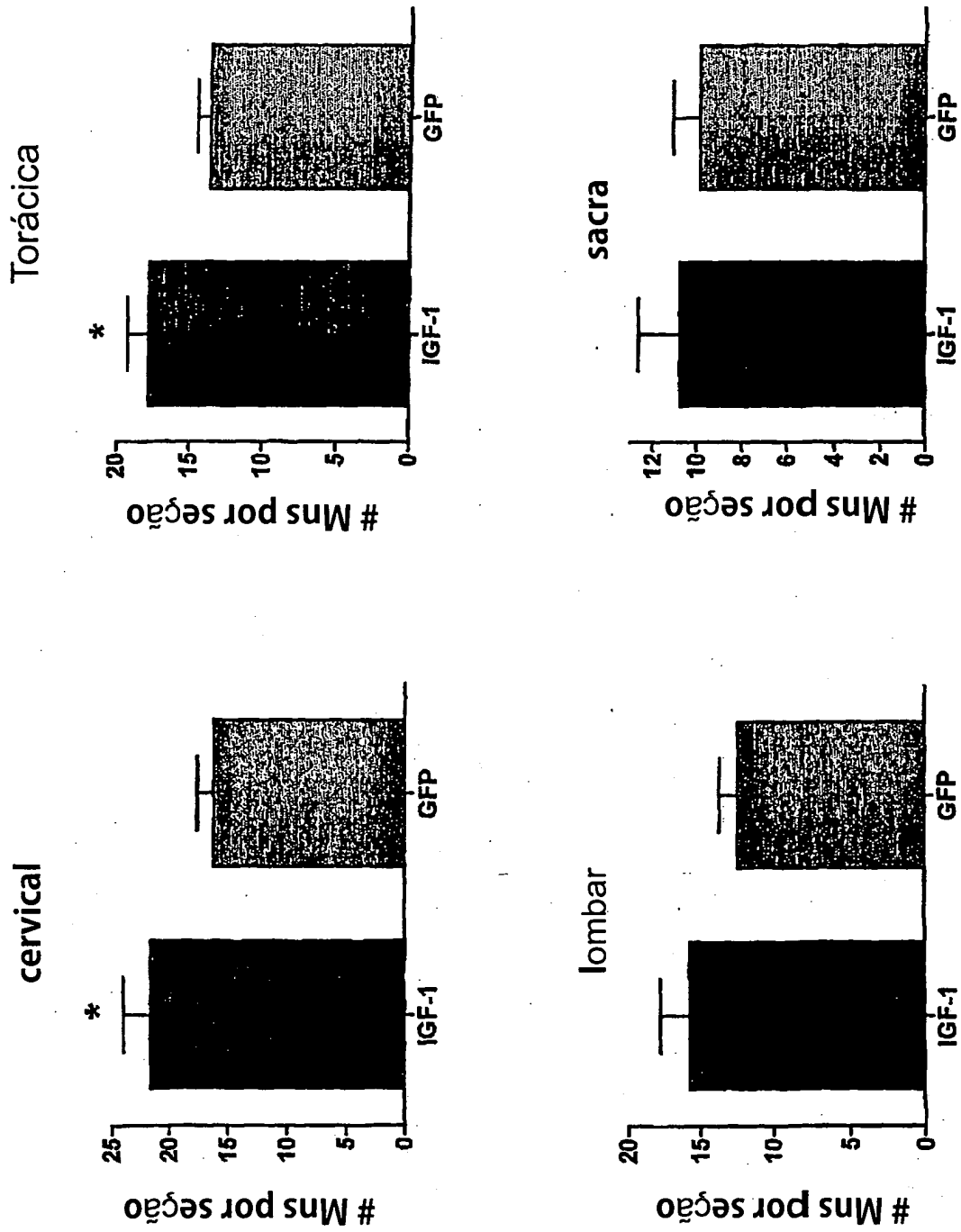


FIG 19

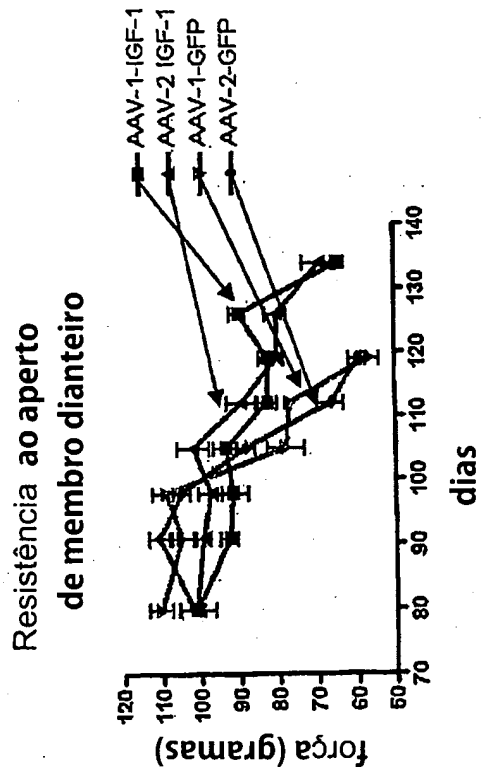
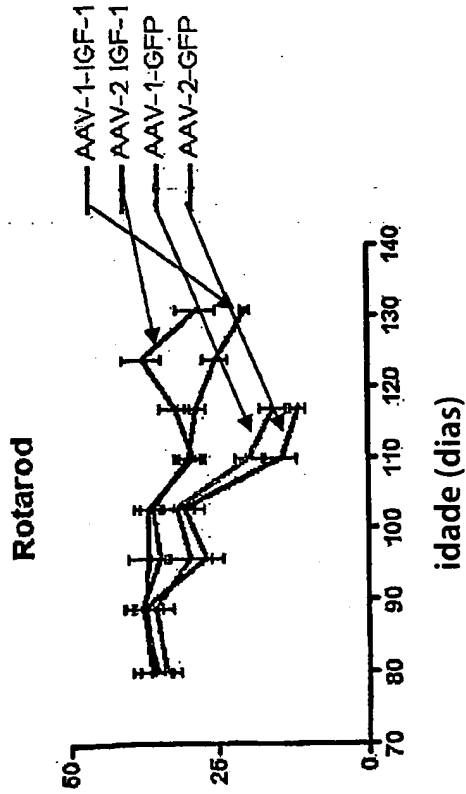
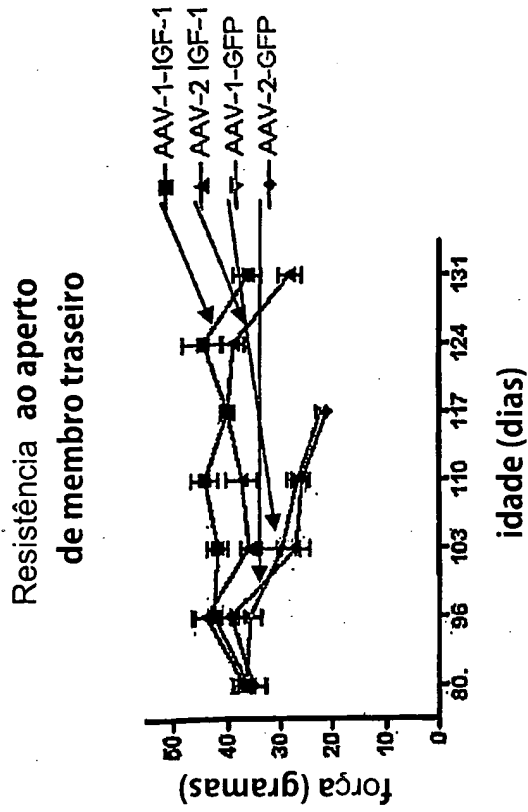
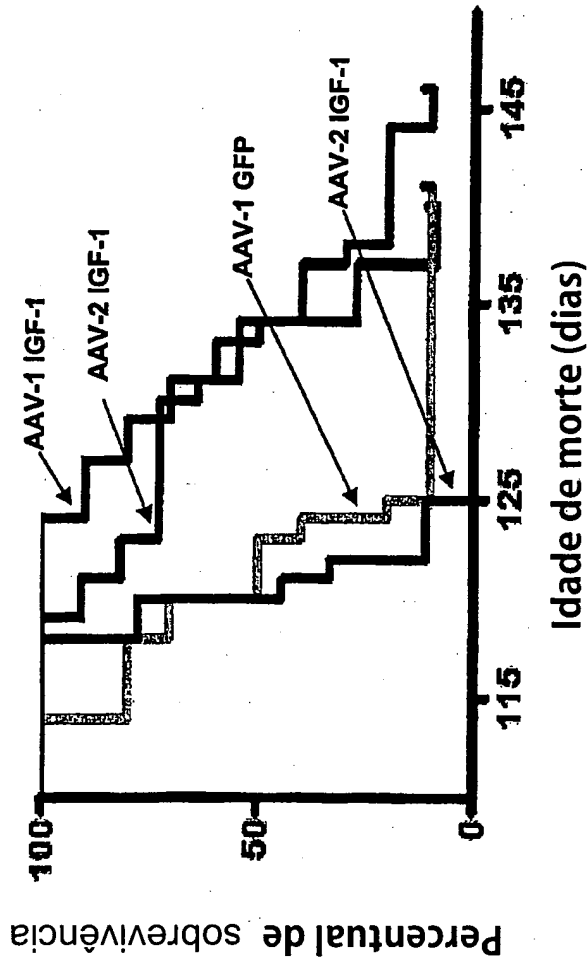


FIG 20



Sobrevivência em dia

AAV1-GFP: 121 Dias

AAV1-IGF-1: 133.5 Dias

AAV2-GFP: 120 Dias

AAV2-IGF-1: 134 Dias

FIG 21

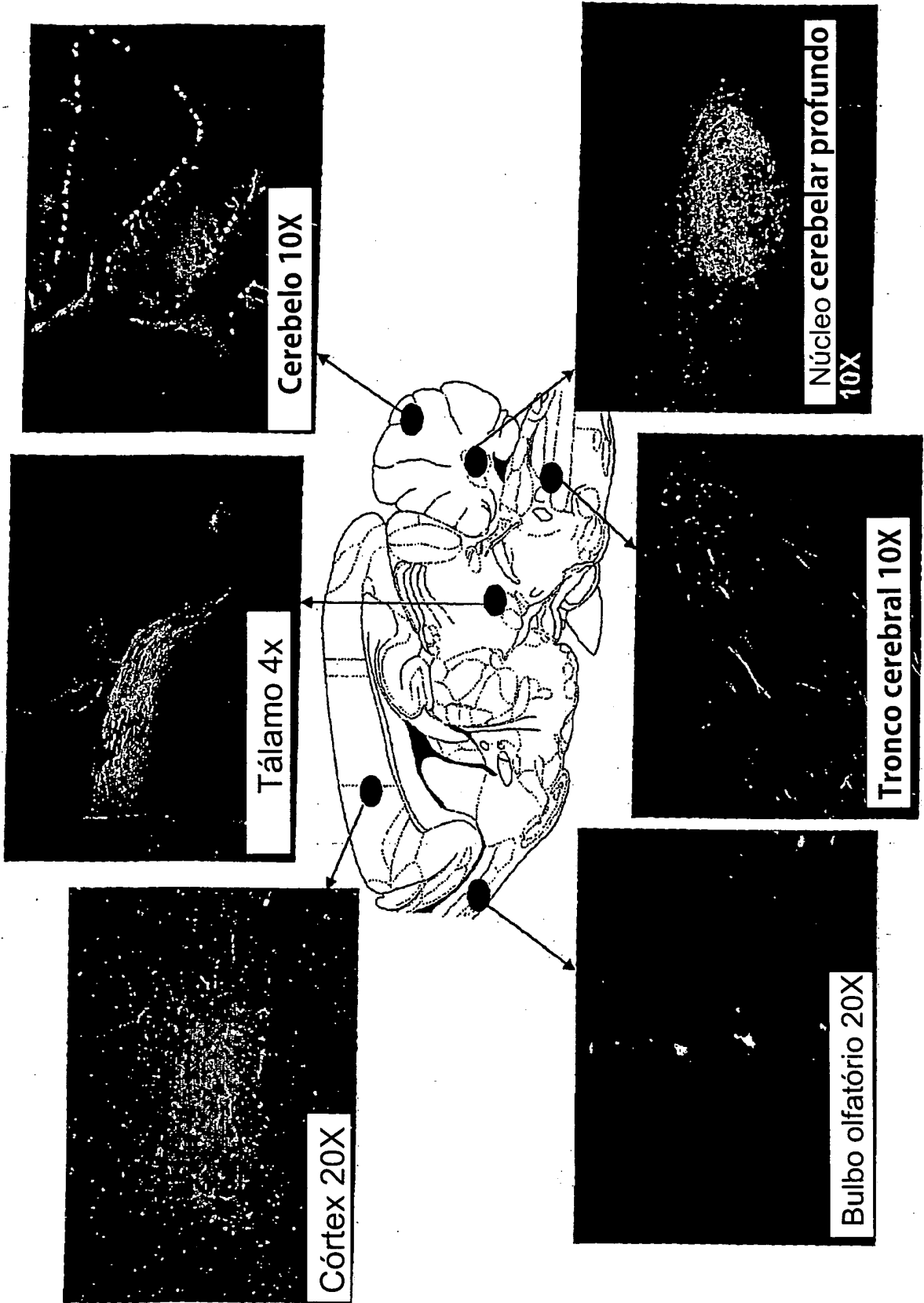


FIG 22

7/05/2013

RESUMO

Patente de Invenção: **"TERAPIA DE GENE PARA DISTÚRBIOS DE ESPINHA DORSAL"**.

5 A presente invenção refere-se a métodos e composições para tratar distúrbios ou lesões que afetam a função motora e controle em um indivíduo. Em um aspecto, a invenção fornece um método para liberar um transgene à espinha dorsal de um indivíduo administrando um vetor viral neurotrópico recombinante contendo o transgene. O vetor viral libera o transgene a uma região da região dos núcleos cerebelares profundos do

10 cérebro. Também fornecidos são composições e métodos para liberar um transgene à espinha dorsal de um indivíduo administrando um vetor viral neurotrópico recombinante contendo o transgene à região do córtex motor do cérebro do indivíduo.