

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 698 203**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2011 E 14181861 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2826860**

(54) Título: **Vectores de AAV que se dirigen al SNC y métodos de uso de los mismos**

(30) Prioridad:

23.04.2010 US 327627 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.02.2019

(73) Titular/es:

**UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS (100.0%)
225 Franklin Street
Boston, MA 02110, US**

(72) Inventor/es:

**GAO, GUANGPING;
ZHANG, HONGWEI;
WANG, HONGYAN y
XU, ZUOSHANG**

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 698 203 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vectores de AAV que se dirigen al SNC y métodos de uso de los mismos

- 5 La invención en algunos aspectos se refiere a virus adeno-asociados recombinantes útiles para dirigir transgenes a tejido del SNC, y a composiciones que comprenden los mismos, y métodos de uso de los mismos.

Antecedentes de la invención

- 10 Se ha investigado la terapia génica para la administración de genes terapéuticos a las células del SNC para el tratamiento de diversas enfermedades del SNC, por ejemplo, enfermedad de Canavan, ELA, enfermedad de Parkinson (EP), etc. En algunos casos limitados, se han observado beneficios terapéuticos usando determinados virus, por ejemplo, adenovirus recombinante (rAd), lentivirus (LV) y virus adeno-asociado (AAV, forma siglada de *adeno-associated virus*) para expresar diversos genes terapéuticos. Se ha usado AAV2 en ensayos clínicos para el 15 tratamiento de la EP y la amaurosis congénita de Leber (una enfermedad ocular) y hallazgos preliminares sugieren mejoras sintomáticas sin toxicidad perceptible [2-4].

Sin embargo, la terapia génica basada en AAV para tratar las enfermedades del SNC todavía se enfrenta a un obstáculo importante. Muchas enfermedades del SNC, que incluyen, por ejemplo, la ELA, afectan tanto a las 20 neuronas motoras corticales como espinales que están distribuidas en un área muy amplia en el SNC. Ha sido frecuente el caso de que vectores víricos inyectados en tejido del SNC transducen células solo en la proximidad del sitio de inyección, tienen una propagación muy limitada y generalmente no han afectado la esperanza de vida en modelos animales de enfermedad del SNC [véase, por ejemplo, la Ref. 5]. Aun así, se han probado otros diversos 25 métodos de administración de virus. Un ejemplo implica inyectar las partículas víricas en músculo esquelético y dejar que las terminaciones nerviosas internalicen el genoma vírico, que entonces se transporta de nuevo de forma retrógrada a las neuronas motoras espinales. Este enfoque ha mostrado algunos resultados positivos en determinados modelos de ratón [68]. Sin embargo, aplicar este método en mamíferos más grandes, como seres 30 humanos adultos, sería poco práctico. En general, la eficiencia de transducción observada con la inyección en músculo es relativamente baja. Algunos investigadores han intentado mejorar esta eficiencia modificando proteínas de la cápside vírica con los dominios de unión a nervio de la toxina tetánica o toxina botulínica. Estos esfuerzos no 35 han sido fructíferos debido a diversas dificultades técnicas. Otro problema con la inyección en músculo en mamíferos más grandes es una necesidad de dosis grandes, lo que es técnicamente problemático, caro y conlleva un alto riesgo de efectos adversos, que varían de una reacción inmunitaria a la transducción de células no intencionadas (por ejemplo, células germinativas).

35 Otro método que se ha evaluado para administrar transgenes en neuronas motoras es inyectar el virus en nervios grandes, lo que maximiza la exposición del virus a los axones motores, permitiendo que las neuronas motoras internalicen el genoma vírico y lo transporten de nuevo de forma retrógrada al soma. Se ha demostrado que este 40 método es más eficiente en la transducción de neuronas motoras que la inyección en músculo [9]. Aun así, implementar un método tal como este en mamíferos más grandes sería problemático.

Passini *et al.* (2010) J. Clinical Investigation 120(4) 1253-1264 describen una terapia génica dirigida al SNC que mejora la supervivencia y la función motora en un modelo de ratón de atrofia muscular espinal; el documento WO 2010/129021 describe una terapia génica para trastornos neurodegenerativos; Sondhi (2006) Molec Ther. 15 45 pág. 481-491 utilizaron un AAV derivado del rh.10 de macaco para suministrar genes a un ratón transgénico que presentaba lipofuscinosis neuronal ceroidea infantil tardía (LNCIT). Beutler (2009) Gene Ther. 16 pág. 461-469 revisaron el uso de AAV para el tratamiento del dolor y, en particular, del dolor neuropático crónico. Vulchanova *et al.* (2010) Molecular Pain 6(1) 31 describen la transferencia génica diferencial mediada por virus adeno-asociados a 50 neuronas sensitivas después del suministro intratecal por punción lumbar directa; Cearley y Wolfe (2006) Molecular Therapy (13)3 528-537 describen las características de transducción de los vectores de virus adeno-asociados que expresan los serotipos de cap 7, 8, 9 y Rh10 en el cerebro del ratón; Cearley *et al.* (2008) Molecular Therapy 16(10) 1710-1718 describen un repertorio ampliado de serotipos de AAV que median patrones singulares de transducción en cerebro de ratón; Iwamoto *et al.* J. Gene Medicine 11 498-505 describen la distribución difusa global en el cerebro y el suministro eficaz de genes a los ganglios de la raíz posterior mediante inyección intratecal de un vector de virus 55 adeno-asociado de serotipo 1; Meijer *et al.* Cancer Gene Therapy (2009) 16 664-671 describe el control del crecimiento de un tumor cerebral mediante la administración intraventricular de un vector de AAV que codifica al IFN- β ; Tenenbaum (2004) J. Gene Medicine 6 pág. S212-S222 revisa el uso del suministro de genes mediado por AAV en el SNC; Ralph *et al.* (2005) Nature Medicine 11(4) 429-433 describen el silenciamiento de SOD1 mutante utilizando ARNi que protege frente a la neurodegeneración y extiende la supervivencia en un modelo de ELA; el 60 documento WO 2007/127264 describe la producción y recogida de AAV sin la necesidad de lisis celular.

Sumario

La presente invención se refiere a la materia objeto como se define en la reivindicación 1 y abarca las realizaciones 65 como se define en las reivindicaciones 2-12.

Los aspectos de la divulgación proporcionada en el presente documento se basan en el descubrimiento de AAV recombinantes que logran una distribución generalizada en todo el tejido del SNC de un sujeto. En algunos casos, los rAAV (virus adeno-asociados recombinantes) se propagan en todo el tejido del SNC tras la administración directa en el líquido cefalorraquídeo (LCR), por ejemplo, a través de inyección intratecal y/o intracerebral. En otros casos, 5 después de la administración intravenosa los rAAV cruzan la barrera hematoencefálica y logran una distribución generalizada en todo el tejido del SNC de un sujeto. En algunos aspectos, la divulgación se refiere a rAAV que tienen distintas capacidades de direccionamiento a tejido del sistema nervioso central (por ejemplo, tropismos de tejido del SNC), que logran una transferencia génica estable y no tóxica a altas eficiencias. En algunos aspectos se proporcionan métodos que implican la coadministración a través de inyección intratecal e intracerebral (por ejemplo, 10 intraventricular) de los rAAV. Por ejemplo, se ha descubierto que los rAAV que tienen una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 9 logran una distribución generalizada después de la inyección intratecal en todo el SNC, y así, son particularmente útiles tratar trastornos asociados al SNC tales como, por ejemplo, la ELA. En aún otros aspectos de la divulgación se proporcionan métodos para tratar la enfermedad de 15 Canavan.

15 De acuerdo con algunos aspectos de la divulgación en el presente documento, se proporcionan métodos de suministro de un transgén a tejido del SNC en un sujeto. En algunos casos, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV por administración intratecal, en donde el rAAV comprende (i) una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 9 y (ii) un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con un transgén. En algunos casos, los métodos comprenden además administrar una cantidad eficaz del rAAV por administración intracerebral. En algunos casos, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV por administración intratecal y por administración intracerebral, en donde el rAAV infecta células de tejido del SNC en el sujeto y comprende un ácido nucleico que comprende un promotor 20 operativamente unido con un transgén. En determinados casos, la administración intracerebral es una administración intraventricular. En un caso, la administración intraventricular es una administración en una región ventricular del prosencéfalo del sujeto. En determinados casos, la administración intratecal es en la región lumbar del sujeto. En algunos casos, la dosis de rAAV para administración intratecal está en un intervalo de 10^{10} copias de genoma/sujeto a 10^{11} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intratecal está en un intervalo de 10^{11} copias de genoma/sujeto a 10^{12} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para 25 administración intratecal está en un intervalo de 10^{12} copias de genoma/sujeto a 10^{13} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intratecal está en un intervalo de 10^{13} copias de genoma/sujeto a 10^{14} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intracerebral está en un intervalo de 10^{10} copias de genoma/sujeto a 10^{11} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intracerebral 30 está en un intervalo de 10^{11} copias de genoma/sujeto a 10^{12} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intracerebral está en un intervalo de 10^{12} copias de genoma/sujeto a 10^{13} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intracerebral está en un intervalo de 10^{13} copias de genoma/sujeto a 10^{14} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intracerebral está en un intervalo de 10^{10} copias de genoma/sujeto a 10^{11} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intracerebral 35 está en un intervalo de 10^{11} copias de genoma/sujeto a 10^{12} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intracerebral está en un intervalo de 10^{12} copias de genoma/sujeto a 10^{13} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intracerebral o intratecal se formula para la inyección de un volumen en un intervalo de 1 μ l a 10 μ l. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intracerebral o intratecal se 40 formula para la inyección de un volumen en un intervalo de 10 μ l a 100 μ l. En algunos casos, el rAAV para la administración intracerebral o intratecal se formula para la inyección de un volumen en un intervalo de 100 μ l a 1 ml. En algunos casos, el rAAV para la administración intracerebral o intratecal se formula para inyección de un volumen de 1 ml o más. En algunos casos, el transgén codifica una proteína indicadora. En determinados casos, la proteína indicadora es una proteína fluorescente, una enzima que cataliza una reacción que produce un producto detectable, 45 o un antígeno de superficie celular. En determinados casos, la enzima es una luciferasa, una beta-glucuronidasa, una cloranfenicol acetiltransferasa, una aminoglucósido fosfotransferasa, una aminociclitol fosfotransferasa o una puromicina N-acetil-transferasa. En algunos casos, el transgén es un gen asociado al SNC. En algunos casos, el gen asociado al SNC es la proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor 50 neurotrófico ciliar (CNTF), tirosina hidroxilasa (TH), GTP-ciclohidrolasa (GTPCH), aminoácido descarboxilasa (AACD) o aspartoacilasa (ASPA). En algunos casos, el transgén codifica un ARN inhibidor que se une específicamente a ARNm de SOD1 e inhibe la expresión de SOD1 en el sujeto. En algunos casos, el ARN inhibidor es un ARN antisentido, un ARNhpo o un miARN. En algunos casos, el ARN inhibidor tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26. Por lo tanto, de acuerdo con algunos aspectos de la divulgación se proporciona un ácido 55 nucleico que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26. En algunos casos, se proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26. En algunos casos, se proporciona un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26.

60 En otros aspectos de la divulgación se proporciona un AAV recombinante que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26. En algunos aspectos de la divulgación se proporciona un AAV recombinante que comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26. En algunos casos, el AAV recombinante comprende además una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 9.

65 De acuerdo con algunos aspectos de la divulgación, se proporcionan métodos para el tratamiento de la esclerosis

- lateral amiotrófica (ELA) en un sujeto que lo necesita. En algunos casos, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV a tejido del SNC del sujeto, en donde el rAAV comprende (i) una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 9 y (ii) un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica un ARN inhibidor que se une específicamente a ARNm de SOD1 e inhibe la expresión de SOD1 en el sujeto. En algunos casos, el ARN inhibidor es un ARN antisentido, un ARNh o un miARN. En algunos casos, el ARN inhibidor tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26. En algunos casos, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV al sujeto, en donde el rAAV comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26 y en donde el rAAV infecta células de tejido del SNC en el sujeto.
- De acuerdo con algunos aspectos de la divulgación en el presente documento, se proporcionan métodos de suministro de un transgén a un tejido del SNC en un sujeto que comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV por administración intravenosa, en donde el rAAV infecta células de tejido del SNC en el sujeto y comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con un transgén. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{10} copias de genoma/sujeto a 10^{11} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{11} copias de genoma/sujeto a 10^{12} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{12} copias de genoma/sujeto a 10^{13} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{13} copias de genoma/sujeto a 10^{14} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{14} copias de genoma/sujeto a 10^{15} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{10} copias de genoma/kg a 10^{11} copias de genoma/kg. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{11} copias de genoma/kg a 10^{12} copias de genoma/kg. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{12} copias/kg a 10^{13} copias de genoma/kg. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{13} copias de genoma/kg a 10^{14} copias de genoma/kg.
- De acuerdo con algunos aspectos de la divulgación en el presente documento, se proporcionan métodos de suministro de un transgén a un tejido del SNC en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un rAAV que comprende (i) una proteína de la cápside que tiene una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 10 a 12 y (ii) un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con un transgén. En algunos casos, los métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un rAAV que comprende un transgén a un sujeto, en donde el rAAV comprende una proteína de la cápside de un serotipo de AAV, o variante de serotipo, seleccionada del grupo que consiste en: AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, rh.10, rh.39, rh.43 y CSp3, y en donde: (a) si el serotipo de AAV es AAV1, la vía de administración no es intracerebral, intramuscular, intranerviosa o intraventricular y/o el sujeto no es un ratón, rata o felino; (b) si el serotipo de AAV es AAV2, la vía de administración no es administración intracerebral o intraventricular y/o el sujeto no es una rata, ratón, felino, tití o macaco; (c) si el serotipo de AAV es AAV5, la vía de administración no es administración intracerebral o intraventricular y/o el sujeto no es una rata, ratón o tití; (d) si el serotipo de AAV es AAV6, el sujeto no es un ratón; (e) si el serotipo de AAV es AAV7, la vía de administración no es administración intracerebral y/o el sujeto no es un ratón o macaco; (f) si el serotipo de AAV es AAV8, la vía de administración no es administración intracerebral, intraperitoneal o intravascular y/o el sujeto no es un ratón o macaco; (g) si el serotipo de AAV es AAV9, la vía de administración no es administración intracerebral o intravascular y/o el sujeto no es una rata o ratón; y (h) si el serotipo de AAV es AAVrh.10, la vía de administración no es administración intracerebral o intravascular y/o el sujeto no es una rata o ratón. En algunos casos, el serotipo de AAV, o variante de serotipo, se selecciona de AAV1, AAV6, AAV7, rh.39, rh.43 y CSp3, y la vía de administración es administración intravascular. En algunos casos, el serotipo de AAV es AAV7 y la vía de administración es administración intravascular. En algunos casos, el tejido del SNC se selecciona de corteza, hipocampo, tálamo, hipotálamo, cerebelo, tronco encefálico, médula espinal cervical, médula espinal torácica y médula espinal lumbar. En algunos casos, el transgén codifica una proteína indicadora. En determinados casos, la proteína indicadora es una proteína fluorescente, una enzima que cataliza una reacción que produce un producto detectable, o un antígeno de superficie celular. En determinados casos, la enzima es una luciferasa, una beta-glucuronidasa, una cloranfenicol acetiltransferasa, una aminoglucósido fosfotransferasa, una aminociclitol fosfotransferasa o una puromicina N-acetil-transferasa. En algunos casos, el transgén es un gen asociado al SNC. En determinados casos, el gen asociado al SNC es la proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), tirosina hidroxilasa (TH), GTP-ciclohidrolasa (GTPCH), aminoácido descarboxilasa (AADC) o aspartoacilasa (ASPA). En algunos casos, el rAAV se administra por inyección intravenosa.
- De acuerdo con algunos aspectos de la divulgación en el presente documento, se proporciona un rAAV que comprende (i) una proteína de la cápside que tiene una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 10 a 12 y (ii) un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con un gen asociado al SNC. En determinados casos, el gen asociado al SNC es la proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), tirosina hidroxilasa (TH), GTP-ciclohidrolasa (GTPCH), aminoácido descarboxilasa (AADC) o aspartoacilasa (ASPA). En algunos casos, el ARNm expresado a partir del gen

asociado al SNC comprende un sitio de unión de miARN de un miARN que se expresa preferentemente en tejido que no es del SNC. En determinados casos, el sitio de unión de miARN es un sitio de unión para miR-122. En determinados casos, el sitio de unión de miARN es un sitio de unión para miR-1. En algunos casos, el ARNm expresado a partir del gen asociado al SNC no comprende un sitio de unión de miARN de un miARN que se expresa preferentemente en tejido del SNC. En algunos casos, el promotor es un promotor específico de tejido del SNC. En determinados casos, el promotor es un promotor de un gen seleccionado de: núcleos neuronales (NeuN), proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), adenomatous polyposis coli (APC) y molécula 1 adaptadora de unión a calcio ionizado (Iba-1).

- 5 10 De acuerdo con algunos aspectos de la divulgación en el presente documento, se proporciona una composición que comprende un rAAV que comprende (i) una proteína de la cápside que tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 10 a 12 y (ii) un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con un gen asociado al SNC. En determinados casos, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con algunos aspectos de la divulgación se proporciona un kit que comprende un recipiente que contiene la composición. En algunos casos, el recipiente es un vial o ampolla sellado. En algunos casos, el recipiente es una jeringa.

15 De acuerdo con algunos aspectos de la divulgación en el presente documento, se proporciona una célula de mamífero aislada que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside que tiene una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 10 a 12 y un vector de rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un gen asociado a una enfermedad del SNC. En algunos casos, la célula de mamífero aislada comprende además un vector de función auxiliar del AAV. En algunos casos, la célula de mamífero aislada comprende además un vector de función accesoria. En determinados casos, el gen asociado al SNC es la proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), tirosina hidroxilasa (TH), GTP-ciclohidrolasa (GTPCH), aminoácido descarboxilasa (AADC) o aspartoacilasa (ASPA).

20 25 30 35 De acuerdo con otros aspectos de la divulgación, se proporciona un método para tratar la enfermedad de Canavan en un sujeto que lo necesite. En algunos casos, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV a tejido del SNC del sujeto, en donde el rAAV comprende (i) una proteína de la cápside distinta de una proteína de la cápside de AAV serotipo 2 y (ii) un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica aspartoacilasa (ASPA). Cualquier de los serotipos de rAAV divulgados en el presente documento puede usarse en los métodos de tratamiento de la enfermedad de Canavan. En algunos casos, el rAAV tiene una proteína de la cápside que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 8 o 9 o una variante de la misma. En algunos casos, la administración se realiza por vía intratecal o por vía intracerebral. En algunos casos, la administración se realiza por vía intravascular.

40 45 50 En algunos casos, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV a tejido del SNC del sujeto por una vía distinta de administración intracerebral, en donde el rAAV comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica aspartoacilasa (ASPA). En algunos casos, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV a tejido del SNC del sujeto, en donde el rAAV comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica aspartoacilasa (ASPA); y evaluar la función renal en el sujeto al menos una vez después de la administración. Puede usarse cualquier método adecuado conocido en la técnica para evaluar la función renal de un sujeto. La evaluación puede implicar, por ejemplo, un examen de sangre o de los niveles de nitrógeno ureico en orina, un examen de sangre o de los niveles de creatinina en orina, un examen de la tasa de depuración de creatinina, un examen de la tasa de filtración glomerular, un examen de la fracción de filtración, un examen del flujo plasmático renal, un examen por ecografía, un examen microscópico de una biopsia de tejido de riñón o cualquier otra prueba adecuada de la función renal. Debe apreciarse que en algunos casos una mejora en la función renal de un sujeto tras el tratamiento con una terapia génica mediada por rAAV es indicativa de eficacia de la terapia génica para tratar la enfermedad de Canavan.

55 60 65 En algunos casos, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV a tejido del SNC del sujeto, en donde el rAAV comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica aspartoacilasa (ASPA); y evaluar la visión del sujeto al menos una vez después de la administración. Puede usarse cualquier método adecuado conocido en la técnica para evaluar la visión de un sujeto. La evaluación puede implicar, por ejemplo, un examen externo del ojo, un examen de la agudeza visual, un examen de la función de la pupila, un examen de la retina, un examen de la movilidad ocular, un examen de la tensión intraocular o un examen oftalmoscópico. La evaluación puede implicar una determinación referente a la capacidad de un sujeto para discriminar colores, objetos o formas, o la capacidad de un sujeto para discernir colores, objetos o formas desde una distancia particular. Debe apreciarse que en algunos casos una mejora en la visión de un sujeto después del tratamiento con una terapia génica mediada por rAAV es indicativa de la eficacia de la terapia génica para tratar la enfermedad de Canavan.

65 En algunos casos, el ácido nucleico expresa un ARNm de aspartoacilasa (ASPA) que comprende uno o más sitio de unión de miARN para uno o más miARN que son más abundantes en uno o más tejidos que no son del SNC en

comparación con tejido del SNC. Por consiguiente, en algunos casos, el ARNm es elegido como diana para la degradación por un miARN en uno o más tejidos que no son del SNC. En algunos casos, el uno o más tejidos que no son del SNC no es tejido de riñón o tejido de retina. En algunos casos, el uno o más miARN que son más abundantes en tejidos que no son del SNC en comparación con tejido del SNC son al menos dos veces, al menos 5 tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces o al menos diez veces más abundantes. Se conocen en la técnica miARN que son más abundantes en tejido que no es del SNC frente a tejido del SNC. Por ejemplo, un estudio divulga niveles de expresión de más de trescientos miARN humanos diferentes en 40 tejidos diferentes, que incluyen tejido del SNC, tejido de riñón. (Véase Liang Y, et al., *Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues*. BMC Genomics. 12 de junio de 2007;8:166). Por lo tanto, en algunos casos, el experto podría 10 seleccionar fácilmente (por ejemplo, basándose en datos tales como se divultan en Liang et al.) un miARN adecuado que es más abundante en tejido que no es del SNC e incorporar un sitio de unión para el miARN en el 15 ARNm codificado.

Cada una de las limitaciones descritas anteriormente puede abarcar diversas realizaciones descritas anteriormente. 15 Se espera, por lo tanto, que cada una de las limitaciones que implican un elemento cualquiera o combinaciones de elementos pueda incluirse en cada aspecto de la divulgación. La presente divulgación no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La divulgación tiene la capacidad de otras realizaciones y de ponerse en práctica o llevarse 20 a cabo de diversas formas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa resultados cuantitativos de intensidades de EGFP de imágenes microscópicos de fluorescencia de un panel de cortes de tejidos del SNC de ratones neonatales infectados con diversos rAAV que 25 albergan vectores de expresión de EGFP. Se les administraron a ratones neonatales rAAV por administración intravenosa (inyección en la vena temporal superficial).

La Figura 2 representa resultados cuantitativos de intensidades de EGFP de imágenes microscópicos de fluorescencia de un panel de cortes de tejidos del SNC de ratones adultos infectados con diversos rAAV que 30 albergan vectores de expresión de EGFP. Se les administraron a ratones adultos rAAV por administración intravenosa (inyección en la vena de la cola).

La Figura 3 representa la cuantificación de la expresión de EGFP en la médula espinal de ratones neonatales (regiones cervical, torácica y lumbar) 21 días después de la inyección IV (5 ratones por grupo). Se les administraron a ratones neonatales rAAV por administración intravenosa (inyección en la vena temporal superficial).

La Figura 4A representa resultados que muestran que la inyección directa en LCR de AAVrh.10 que alberga un 35 gen de EGFP conduce a la expresión de EGFP en amplias áreas del SNC. Se muestran cortes de tejido, preparados 60 días después de la inyección del virus, de tronco encefálico, médula espinal cervical, médula espinal torácica y médula espinal lumbar. Los píxeles grises/negros se corresponden con la expresión de EGFP.

La Figura 4B representa resultados que muestran que la inyección directa en LCR de AAVrh.10 que alberga un 40 gen de EGFP conduce a la expresión de EGFP en astrocitos. Los píxeles grises/negros se corresponden con la expresión de EGFP.

La Figura 5A representa un vector de rAAVrh.10 que expresa un microARN que se dirige a SOD1. La construcción emplea CAG (forma siglada de *chicken β-actin promoter*, promotor de β-actina de pollo) (promotor de β-actina de pollo con un potenciador del CMV) para dirigir la expresión de EGFP y miR-SOD1 que se localiza 45 en un intrón en la 3'-UTR. pA representa la señal de poliA. ITRs señala las repeticiones invertidas del AAV.

La Figura 5B representa resultados de experimentos que analizan la potencia de silenciamiento de 9 construcciones de miARN diferentes, se encontró que miR-SOD1#5 era el que silenciaba la expresión SOD1 de forma más potente.

La Figura 5C representa resultados de experimentos en los que miR-SOD1#5 se empaquetó en AAVrh.10 y se 50 usó para infectar células HEK293. Se extrajo proteína celular total 43 horas después de la infección y se transfirió para detectar SOD1. Scr representa miARN desordenado; Sod representa miR-SOD1#5; y C representa un control que expresa EGFP solo.

La Figura 5D representa un mapa de plásmido de pAAVscCB6 EGFPmir SOD5 (5243 pb) (SEQ ID NO: 21).

La Figura 6A representa resultados de estudios de transferencia génica en ratones mutantes para SOD1 (G93A) 55 que muestran que el miARN de rAAV rh.10-SOD1 atenúa los niveles de SOD1 mutante en astrocitos. También se observó tinción en neuronas motoras.

La Figura 6B representa resultados de estudios de transferencia génica en ratones mutantes para SOD1 (G93A) que muestran que el ARNhp de rAAV rh.10-SOD1 aumenta la esperanza de vida, en comparación con un miARN desordenado de rAAV rh.10.

La Figura 7A representa la cuantificación de la expresión de EGFP en tejido de médula espinal cervical, torácica 60 y lumbar en comparación con las esperanzas de vida de ratones individuales infectados con miARN de rAAV rh.10- SOD1; se administró rAAV rh.10-SOD1 directamente al LCR.

La Figura 7B representa la cuantificación de la expresión de EGFP en tejido de médula espinal cervical, torácica 65 y lumbar en comparación con las esperanzas de vida de ratones individuales infectados con miARN desordenado de rAAV rh.10; se administró miARN desordenado de rAAV rh.10 directamente al LCR.

La Figura 8 representa el análisis por microscopía de fluorescencia de ratones a los que se ha administrado

inyecciones intratecales de diversos AAV. En este experimento, tanto AAV9 como AAVrh10 transducen células a lo largo de la longitud completa de la médula espinal después de una única inyección en el LCR en el espacio subaracnideo lumbar.

5 La Figura 9 representa los efectos del tratamiento de AAV10-miR-SOD1. El tratamiento de AAV10-miR-SOD1 ralentiza la progresión de la enfermedad como se indica por la pérdida más lenta de peso corporal en ratones G93A tratados en comparación con los de control.

10 La Figura 10 representa el análisis por microscopía de fluorescencia de ratones a los que se ha administrado inyecciones intratecales de diversos AAV. En este experimento, AAV9 y AAVrh10 pueden transducir células en amplias áreas del prosencéfalo después de una única inyección en el LCR en el tercer ventrículo.

15 La Figura 11 representa el análisis por microscopía de fluorescencia de cortes de tejidos de ratones inyectados con AAV9. Una única inyección de AAV9 y AAVrh10 en el tercer ventrículo puede transducir células en amplias áreas del prosencéfalo, incluyendo corteza, hipocampo, estriado, tálamo, cerebelo y algunas células dispersas en la médula espinal. También se observa el mismo patrón general en ratones inyectados con AAV10.

20 La Figura 12 representa una validación *in vitro* de sitios de unión de miARN artificiales para el silenciamiento de indicadores. Se transfecaron plásmidos que albergan el genoma de rAAVCBnLacZ con o sin sitios de unión de miR-1 o miR-122 en células de hepatoma humano (HuH7) (a) que expresan miR-122 o se cotransfecaron en células 293, junto con un plásmido que expresaba pri-miR-122 (b) o pri-miR-1 (c) a relaciones molares de 1:3 (baja) o 1:10 (alta). 0X: ningún sitio de unión de miARN; 1X: un sitio de unión de miARN; 3X: tres sitios de unión de miARN. Las células se fijaron y se tiñeron histoquímicamente con X-gal 48 horas después de la transfección y se contaron las células azules. Se comparó el porcentaje de células positivas para nLacZ en cada transfección con la transfección del plásmido de control (prAAVCBnLacZ). BP, β-actina de pollo; miR, microARN; nLacZ, transgén indicador de β-galactosidasa; rAAV, virus adeno-asociados recombinantes.

25 La Figura 13 representa una evaluación *in vivo* del silenciamiento de transgén mediado por miARN endógeno en una transducción de rAAV9. (a-c) Se inyectaron ratones C588L/6 macho adultos por vía intravenosa con 5×10^{13} copias de genoma por kg (CG/kg) cada uno de rAAV9CBnLacZ (ningún sitio de unión), (a) rAAVCB9nLacZmiR-122BS (un sitio de unión de miR-122) y rAAV9C8nlacZ-(miR-122BS)₃ (tres sitios de unión de miR-122), (b) rAAV9CBnLacZ- miR-1 BS (forma siglada de *binding site*, sitio de unión) (un sitio de unión de miR-1) y rAAV9CBnLacZ-(miR-IBS)₃ (tres sitios de unión de miR-1), (c) rAAV9CBnLacZ-miR-1BS-miR-122BS (1X cada sitio de unión) y rAAV9CBnLacZ-(miR-1BS)₃-(miR-122BS)₃ (tres sitios de unión de miR-1 y tres de miR-122). Se sacrificaron los animales 4 semanas después de la administración del vector y se recogieron tejidos apropiados para el crioctore y tinción histoquímica con X-gal. miR, microARN; nLacZ, transgén indicador de β-galactosidasa; rAAV, virus adeno-asociados recombinantes y (d) cuantificación de las actividades de β-galactosidasa en tejido de hígado de animales que recibieron vectores rAAVnLacZ con y sin sitios de unión de miARN.

30 La Figura 14 representa un análisis de los niveles de expresión de miARN análogos, ARNm y proteína de genes diana de miARN endógeno en ratones transducidos con rAAV9CBnLacZ con o sin sitios de unión de miARN. Se preparó ARN o proteína celular total a partir de (a-c) hígado o (d) corazón. (a) Detección por transferencia de Northern de los miARN. ARN nuclear pequeño de U6 proporcionó el control de carga. (b) PCR-transcripción inversa cuantitativa que mide ARNm de ciclina G1. Los datos se presentan como niveles relativos de ARNm de ciclina G1 normalizados con respecto a β-actina. (c,d) Análisis por transferencia Western de niveles de proteína de dianas endógenas de miR-122 y miR-1. Se analizó proteína celular preparada a partir de (c) hígado o (d) corazón para ciclina G1 y calmodulina. (e) Niveles de colesterol en suero. Se recogieron muestras de suero de ratones que recibieron rAAV9 con o sin sitios de unión de miARN después de 4 semanas y se midieron el colesterol total, lipoproteína de alta densidad (HDL) y lipoproteína de baja densidad (LDL). miR, microARN; nLacZ, transgén indicador de β-galactosidasa; rAAV, virus adeno-asociados recombinantes.

35 La Figura 15 representa una caracterización molecular de los ARNm de transgén con o sin sitios de unión de miARN. (a) Se presentan las localizaciones de las sondas y cebadores, las secuencias de miR-122 maduro y su sitio de unión perfectamente complementario en el ARNm de transgén. (b) Se analizó ARN celular total de hígado por PCR por transcripción inversa convencional (RT-PCR) usando cebadores que abarcen una región entre el extremo 3' de nLacZ y el extremo 5' de la señal de poli(A) (c) o por RT-PCR cuantitativa; los datos se presentan como niveles relativos de ARNm de nLacZ normalizados con respecto a β-actina. (d) Para el análisis por transferencia de Northern del ARNm de nLacZ, sirvió de control de carga el ARN 18S, y las transferencias se hibridaron con un ADN de transgén (e) o sonda de ARN. (f) Además, se analizó por 5' RACE el ARNm portador de poli(A) del hígado de un animal que recibió rAAV que contenía tres sitios de unión de miR-1 y tres de miR-122; el producto de PCR se resolvió en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. miR, microARN; nLacZ, gen indicador de β-galactosidasa; rAAV, virus adeno-asociados recombinantes.

40 La Figura 16 representa un alineamiento de secuencias que abarcan los sitios de unión de miARN y las regiones de señal de poli(A) recuperadas por 5 RACE. Se aisló ARNm que contenía poli(A) de (a) hígado y (b) corazón de un animal inyectado con rAAV9CBnLacZ-(miR-1BS)₃-(miR-122BS)₃. Se secuenciaron veintiún clones obtenidos de hígado y veintidós obtenidos de corazón. Los supuestos sitios de escisión en cada clon se identifican por flechas; se informan las frecuencias de escisión específica de sitio dirigida por miARN para cada sitio de unión de miARN; los triángulos indican a las posiciones de los sitios de escisión dirigidos por miARN esperados (a,b). miARN, microARN, nLacZ, gen indicador de β-galactosidasa; rAAV, virus adeno-asociados recombinantes.

45 La Figura 17 representa una transferencia del gen de EGFP dirigida al SNC reprimida por miARN endógeno por rAAV9 suministrado por vía sistémica. Se les inyectó a ratones C57BL/6 macho de diez semanas de edad, por vía intravenosa, scAAV9CBEGFP o scAAV9CBnLacZ(miR-1BS)₃-(miR-122BS)₃ a una dosis de 2×10^{14} copias de genoma por kg (GC/kg) de peso corporal. Los animales se sometieron a necropsia 3 semanas después para

la fijación del cuerpo entero por perfusión transcardíaca. (a) Se recogieron cerebro, médula espinal, hígado, corazón y músculo para el criocorte, tinción inmunofluorescente para EGFP (cerebro y médula espinal cervical), y microscopía de fluorescencia para detectar EGFP. Se extrajeron ADN y ARN celular total del cerebro, hígado, corazón y músculo para medir la cantidad de genoma de vector persistente por qPCR y ARNm de EGFP por qRT- PCR. (b) Para cada tejido, se comparó la abundancia relativa del ARNm de EGFP que contenía sitios de unión de miARN con la del ARNm de EGFP que carecía de sitios de unión de miARN. Para cada muestra, se normalizó la abundancia de ARNm con respecto a la cantidad de genoma de vector detectada en el tejido. EGFP, proteína verde fluorescente potenciada; miARN, microARN; *nLacZ*, gen indicador de β-galactosidasa; qRT-PCR, PCR-transcripción inversa cuantitativa; rAAV, virus adeno-asociados recombinantes.

La Figura 18 representa un modelo molecular para la expresión de rAAV regulada por miARN endógeno. miARN, microARN; rAAV, virus adeno-asociados recombinantes.

La Figura 19 representa una cuantificación de los niveles de intensidad de GFP en el cerebro y la médula espinal de ratones neonatales transducidos con diversos vectores de AAV. Se injectaron 4×10^{11} copias de genoma (CG) de diez vectores de AAV diferentes en crías P1 neonatales a través de la vena superficial. Los ratones se sacrificaron 21 días después de la inyección. Se extrajeron los tejidos cerebrales y se prepararon criocortes de 40 μm de grosor. Los cortes se tiñeron frente al anticuerpo anti-EGFP. Se analizaron las imágenes y se calcularon los valores de intensidad/píxel de todos los serotipos de AAV en diversas regiones en el cerebro y la médula espinal (A) usando el programa informático Nikon NIS elements AR versión 3.2. Además, se presentan las intensidades promedio de regiones de cerebro y de médula espinal para los diferentes rAAV (B). Se fijó la región de interés (RDI) de cada estructura anatómica para todos los vectores para garantizar la comparación paralela.

La Figura 20 representa una expresión de EGFP fuerte y generalizada en el cerebro de ratón neonatal después de la inyección intravenosa de los rAAV. Se injectaron 4×10^{11} copias de genoma (CG) de los rAAV 7, 9, rh.10, rh.39 y rh.43 en crías P1 neonatales a través de la vena superficial. Los ratones se sacrificaron 21 días después de la inyección. Se extrajeron los tejidos cerebrales y se prepararon criocortes de 40 μm de grosor. Los cortes se tiñeron frente a anticuerpo anti-EGFP. Las barras representan 100 μm. Las regiones mostradas son: bulbo olfatorio, estriado, hipocampo, corteza, hipotálamo, cerebelo y bulbo raquídeo.

La Figura 21 representa la expresión de EGFP en médula espinal de ratón neonatal después de la inyección intravenosa de los rAAV. Se injectaron 4×10^{11} CG de los rAAV 7, 9, rh.10, rh.39 y rh.43 en crías P1 neonatales a través de la vena superficial. Los ratones se sacrificaron 21 días después de la inyección. Se extrajeron los tejidos de la médula espinal y se prepararon criocortes de 40 μm de grosor. Los cortes de las regiones cervical, torácica y lumbar se tiñeron frente a anticuerpo anti-EGFP. Las barras representan 100 μm.

La Figura 22 representa la expresión de EGFP en ganglios de la raíz posterior transducidos por los AAV 1, 2, 6, 6.2, 7, 9, rh.10 y rh.39 suministrados por vía intravascular. Las crías neonatales recibieron 4×10^{11} CG de los AAV en P1 y se sometieron a necropsia 21 días después de la inyección. Se procesaron criocortes de cuarenta μm de grosor para la tinción inmunohistoquímica doble para EGFP (verde) y neuronas (NeuN, rojo). Las barras representan 75 μm.

La Figura 23 representa el análisis por microscopio confocal de los tipos transducidos de células en el SNC de ratón después de la administración sistémica de los AAV a neonatos P1. Los cortes de cerebro y de médula espinal de 40 μm de grosor de los animales tratados con los diferentes AAV se cotiñeron frente a anticuerpo anti-EGFP y marcadores específicos de tipo celular. Se usó anti-NeuN para teñir neuronas; se usó anti-GFAP para teñir astrocitos; se usó anti-calbindina para teñir células de Purkinje; se usó anti-ChAT para teñir neuronas motoras; se usó anti-DARPP para teñir neuronas dopamínergicas en la sustancia negra. Se examinaron todos los AAV, pero para cada tipo de célula en este caso solo se mostró una imagen representativa.

La Figura 24 representa una transducción de las estructuras ventriculares del cerebro por los AAV suministrados por vía intravascular. Las crías neonatales recibieron 4×10^{11} CG de los AAV en P1 y se sometieron a necropsia 21 días después de la inyección. Los plexos coroideos de los diferentes ventrículos se preservaron todos bien durante el procedimiento tisular. Se tiñeron criocortes de cuarenta μm de grosor frente a anticuerpo anti-EGFP. Las barras representan 100 μm.

La Figura 25 representa un análisis de pureza e integridad morfológica de los vectores de rAAV. A. Se usó en este estudio análisis por de SDS-PAGE teñido con plata de vectores de rAAVCBEGFP purificados con gradiente de CsCl. Se cargaron aproximadamente 1.5×10^{10} partículas de virus de cada uno de los AAV 1, 2, 5, 6, 6.2, 7, 9, rh10, rh39 y rh43 en el carril correspondiente. B. Microscopía electrónica de transmisión de viriones de AAV recombinante teñidos negativos. Se diseminaron viriones de rAAV en una película de soporte Formvar recubierta de carbono recién preparada y se tiñeron con acetato de uranilo al 1 % para microscopía de transmisión. Se tomaron imágenes de partículas de virus de lotes de vectores representativos a 92.000X y se presentaron.

La Figura 26 representa una transducción de ganglios de la raíz posterior de ratones neonatales por los rAAV 1,6, 6.2 y rh43 suministrados por vía sistémica. Las crías neonatales que recibieron 4×10^{11} CG de los rAAV en P1 se sometieron a necropsia 21 días después de la inyección. Se tiñeron criocortes de cuarenta μm de grosor frente a anticuerpo anti-EGFP. Las barras representan 75 μm.

La Figura 27 representa una transducción de los vasos capilares del cerebro por los rAAV suministrados por vía intravascular. Las crías neonatales que recibieron 4×10^{11} CG de los rAAV en P1 se sometieron a necropsia 21 días después de la inyección. Se tiñieron criocortes de los cerebros de cuarenta μm de grosor frente a: (a) anticuerpo anti-EGFP (AAV1, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV9, AAVrh.10, AAVrh.39 y AAVrh.43); (b) anticuerpos anti-EGFP y anti-CD34 (rh.10 solo). Las barras representan 100 μm.

La Figura 28 representa una evaluación de la microgliosis en cerebro de ratón después del suministro sistémico

de los rAAV a neonatos P1. Los cortes de cerebro de 40 μ m de grosor de los animales tratados con los diferentes rAAV se cotiñeron frente a anticuerpos anti-EGFP y anti-IBa-1. Solo se muestra el resultado de la tinción de rAAVrh.10.

5 La Figura 29 representa la expresión de EGFP nativa en el SNC de ratones después del suministro sistémico de los rAAV a neonatos P1. Las crías neonatales que recibieron 4×10^{11} CG de los rAAV en P1 se sometieron a necropsia 21 días después de la inyección. Se montaron criocortes de cuarenta μ m de grosor y se observaron al microscopio sin inmunotinción. Se indicaron los tiempos de exposición para cada imagen.

10 La Figura 30 representa resultados que muestran los efectos de la terapia génica basada en rAAV en el tratamiento de la enfermedad de Canavan. La Figura 30A muestra que el tratamiento corrigió la marcha y función motora de los ratones EC. La Figura 30B muestra que el tratamiento mitigó la retinopatía y restableció la visión en ratones EC. La Figura 30C muestra que los niveles de NAA (ácido N-acetil-aspártico) en los ratones EC tratados se aproximan a los de los ratones normales. La Figura 30D indica que se detecta actividad de APSA en los cerebros de ratones EC. La Figura 30E indica que se detecta expresión de APSA en los cerebros de ratones EC.

15 La Figura 31A representa que la vacuolación tanto en cerebro como en médula espinal de los ratones tratados es más irregular y variable con vacuolas de tamaño generalmente más pequeño y que algunas áreas de la corteza cerebral casi no muestran vacuolación. La Figura 31B muestra la expresión de APSA en la corteza cerebral *in situ*.

20 La Figura 32 representa los resultados de un análisis cuantitativo de vacuolación en diversas regiones del cerebro. La Figura 32A muestra que el bulbo olfativo tuvo una espectacular mitigación en la degeneración de materia blanca después de la terapia génica y que las grandes vacuolas fueron esencialmente eliminadas en otros tejidos. La Figura 32B muestra los resultados de un análisis similar en cortes de médula espinal.

25 La Figura 33 representa los resultados de una evaluación histopatológica de riñones en los ratones EC. La Figura 33A muestra que el epitelio tubular renal del riñón se atenuó de forma difusa y presentó agrandamiento de las luces tubulares en los ratones EC no tratados. La Figura 33B muestra que el ratón EC tratado tenía glomérulos normales. Las Figuras 33C y 33D representan los resultados de un análisis de dos vectores candidatos de partida, rAAV9 y rh.10, respectivamente, en cuanto a la eficiencia de transducción de riñón después del suministro i.v.

30 Descripción detallada

El virus adeno-asociado (AAV) es un virus pequeño (26 nm) no envuelto defectuoso en la replicación que depende para su crecimiento en células de la presencia de un segundo virus, tal como un adenovirus o virus del herpes. No se conoce que el AAV produzca enfermedad e induce una respuesta inmunitaria muy leve. El AAV puede infectar tanto células en división como no en división y puede incorporar su genoma en el de la célula hospedadora. Aspectos de la divulgación en el presente documento proporcionan métodos para suministrar un transgén a un tejido del SNC en un sujeto usando transferencia génica basada en AAV recombinante. Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan métodos y composiciones para tratar trastornos relacionados con el SNC. Aspectos adicionales de la divulgación en el presente documento se basan en el descubrimiento de los rAAV que logran una distribución generalizada en todo el tejido del SNC. En algunos casos, los rAAV se diseminan en todo el tejido del SNC después de la administración directa en el líquido cefalorraquídeo (LCR), por ejemplo, a través de inyección intratecal y/o intracerebral. En otros casos, los rAAV cruzan la barrera hematoencefálica y logran una distribución generalizada en todo el tejido del SNC de un sujeto después de la administración intravenosa. Tales rAAV son útiles para el tratamiento de trastornos relacionados con el SNC, incluyendo, por ejemplo, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Canavan (EC).

Métodos y composiciones para el direccionamiento al tejido del SNC

50 En el presente documento se proporcionan métodos para suministrar un transgén a tejido del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto. Los métodos normalmente implican administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un rAAV que comprende un vector de ácido nucleico para expresar un transgén en el sujeto. Una "cantidad eficaz" de un rAAV es una cantidad suficiente para infectar un número suficiente de células de un tejido diana en un sujeto. Una cantidad eficaz de un rAAV puede ser una cantidad suficiente para tener un beneficio terapéutico en un sujeto, por ejemplo, para prolongar la esperanza de vida de un sujeto, para mejorar en el sujeto uno o más síntomas de enfermedad, por ejemplo, un síntoma de la ELA, un síntoma de la enfermedad de Canavan, etc. En algunos casos, una cantidad eficaz de un rAAV puede ser una cantidad suficiente para producir un modelo animal transgénico somático estable. La cantidad eficaz dependerá de diversos factores tales como, por ejemplo, la especie, edad, peso, salud del sujeto y el tejido del SNC que va a ser elegido como diana, y puede así variar entre sujetos y tejidos. Una cantidad eficaz también puede depender del modo de administración. Por ejemplo, el direccionamiento a un tejido del SNC por inyección intravascular puede precisar dosis diferentes (por ejemplo, más altas), en algunos casos, que el direccionamiento al SNC por inyección intratecal o intracerebral. En algunos casos, se administran múltiples dosis de un rAAV. Una cantidad eficaz puede también depender del rAAV usado. Por ejemplo, las dosificaciones para direccionarse a un tejido del SNC pueden depender del serotipo (por ejemplo, la proteína de la cápside) del rAAV. Por ejemplo, el rAAV puede tener una proteína de la cápside de un serotipo de AAV seleccionado del grupo que consiste en: AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, rh.10, rh.39, rh.43 y CSp3. En determinados casos, la cantidad eficaz de rAAV es 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} o 10^{14} copias de genoma por kg. En

determinados casos, la cantidad eficaz de rAAV es 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} o 10^{15} copias de genoma por sujeto.

Un método de suministro de un transgén a tejido del SNC en un sujeto puede comprender administrar un rAAV por una vía única o por múltiples vías. Por ejemplo, administrar un transgén a tejido del SNC en un sujeto puede

- 5 comprender administrar al sujeto, por administración intravenosa, una cantidad eficaz de un rAAV que cruza la barrera hematoencefálica. Suministrar un transgén a tejido del SNC en un sujeto puede comprender administrar al sujeto una cantidad eficaz de un rAAV por administración intratecal o administración intracerebral, por ejemplo, por inyección intraventricular. Un método de suministro de un transgén a tejido del SNC en un sujeto puede comprender coadministrar una cantidad eficaz de un rAAV por dos vías de administración diferentes, por ejemplo, por administración intratecal y por administración intracerebral. La coadministración puede realizarse en
- 10 aproximadamente el mismo momento, o en momentos diferentes.

El tejido del SNC que se elige como diana puede seleccionarse de, por ejemplo, corteza, hipocampo, tálamo, hipotálamo, cerebelo, tronco encefálico, médula espinal cervical, médula espinal torácica y médula espinal lumbar.

- 15 15 La vía de administración para el direccionamiento al tejido del SNC normalmente depende del serotipo de AAV. Por ejemplo, en determinados casos donde el serotipo de AAV se selecciona de AAV1, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, rh.10, rh.39, rh.43 y CSp3, la vía de administración puede ser inyección intravascular. En algunos casos, por ejemplo, donde el serotipo de AAV se selecciona de AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, rh.10, rh.39, rh.43 y CSp3, la vía de administración puede ser inyección intratecal y/o intracerebral.

20 *Administración intravascular*

Como se usa en el presente documento, la expresión "administración intravascular" se refiere a la administración de un agente, por ejemplo, una composición que comprende un rAAV, en la vasculatura de un sujeto, que incluye los

- 25 aparatos circulatorios venoso y arterial del sujeto. Normalmente, los rAAV que cruzan la barrera hematoencefálica pueden suministrarse por administración intravascular para el direccionamiento al tejido del SNC. En algunos casos, la administración intravascular (por ejemplo, intravenosa) facilita el uso de volúmenes más grandes que otras formas de administración (por ejemplo, intratecal, intracerebral). Así, pueden suministrarse grandes dosis de los rAAV (por ejemplo, hasta 10^{15} CG/sujeto) de una vez por administración intravascular (por ejemplo, intravenosa). Los métodos
- 30 de administración intravascular son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, uso de una aguja hipodérmica, cánula periférica, vía venosa central, etc.

Administración intratecal y/o intracerebral

- 35 Como se usa en el presente documento, la expresión "administración intratecal" se refiere a la administración de un agente, por ejemplo, una composición que comprende un rAAV, en el conducto raquídeo. Por ejemplo, la administración intratecal puede comprender la inyección en la región cervical del conducto raquídeo, en la región dorsal del conducto raquídeo o en la región lumbar del conducto raquídeo. Normalmente, la administración intratecal se realiza inyectando un agente, por ejemplo, una composición que comprende un rAAV, en la cavidad
- 40 subaracnoidea (espacio subaracnoidal) del conducto raquídeo, que es la región entre la membrana aracnoidea y piamadre del conducto raquídeo. El espacio subaracnoidal está ocupado por tejido esponjoso que consiste en trabéculas (filamentos delicados de tejido conjuntivo que se extienden desde la materia aracnoidea y se juntan en la piamadre) y canales de intercomunicación en los que está contenido el líquido cefalorraquídeo. En algunos casos, la administración intratecal no es administración en la vasculatura raquídea.

- 45 Como se usa en el presente documento, la expresión "administración intracerebral" se refiere a la administración de un agente en y/o alrededor del cerebro. La administración intracerebral incluye, pero sin limitación, administración de un agente en el cerebro, bulbo raquídeo, protuberancia, cerebelo, cavidad intracraneal y meninges que rodea el cerebro. La administración intracerebral puede incluir administración en la duramadre, materia aracnoidea y piamadre del cerebro. La administración intracerebral puede incluir, en algunos casos, administración de un agente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) del espacio subaracnoidal que rodea el cerebro. La administración intracerebral puede incluir, en algunos casos, la administración de un agente en los ventrículos del cerebro, por ejemplo, el ventrículo lateral derecho, el ventrículo lateral izquierdo, el tercer ventrículo, el cuarto ventrículo. En algunos casos, la administración intracerebral no es administración en la vasculatura del cerebro.

- 55 La administración intracerebral puede implicar la inyección directa en y/o alrededor del cerebro. En algunos casos, la administración intracerebral implica inyección usando procedimientos estereotácticos. Los procedimientos estereotácticos son muy conocidos en la técnica y normalmente implican el uso de un ordenador y un dispositivo de exploración tridimensional que se usan juntos para guiar la inyección en una región intracerebral particular, por ejemplo, una región ventricular. También puede usarse bombas de microinyección (por ejemplo, de World Precision Instruments). En algunos casos, se usa una bomba de microinyección para suministrar una composición que comprende un rAAV. En algunos casos, la velocidad de infusión de la composición está en un intervalo de 1 μ l/minuto a 100 μ l/minuto. Como apreciará el experto, las velocidades de infusión dependerán de diversos factores, que incluyen, por ejemplo, especie del sujeto, edad del sujeto, peso/tamaño del sujeto, serotipo del AAV, dosificación necesaria, región intracerebral elegida como diana, etc. Así, un experto puede considerar otras velocidades de infusión que son apropiados en determinadas circunstancias.

Métodos y composiciones para tratar trastornos relacionados con el SNC

- Además, se proporcionan en el presente documento métodos y composiciones para tratar trastornos relacionados con el SNC. Como se usa en el presente documento, un "trastorno relacionado con el SNC" es una enfermedad o afección del sistema nervioso central. Un trastorno relacionado con el SNC puede afectar a la médula espinal (por ejemplo, una mielopatía), cerebro (por ejemplo, una encefalopatía) o tejidos que rodean el cerebro y la médula espinal. Un trastorno relacionado con el SNC puede ser de un origen genético, heredado o adquirido, a través de una mutación somática. Un trastorno relacionado con el SNC puede ser una afección o trastorno psicológico, por ejemplo, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, trastorno del espectro autista, trastorno del estado de ánimo, esquizofrenia, depresión, síndrome de Rett, etc. Un trastorno relacionado con el SNC puede ser un trastorno autoinmunitario. Un trastorno relacionado con el SNC también puede ser un cáncer del SNC, por ejemplo, cáncer cerebral. Un trastorno relacionado con el SNC que es un cáncer puede ser un cáncer primario del SNC, por ejemplo, un astrocitoma, glioblastomas, etc., o puede ser un cáncer que ha metastatizado a tejido del SNC, por ejemplo, un cáncer de pulmón que ha metastatizado al cerebro. Ejemplos no limitantes adicionales de trastornos relacionados con el SNC incluyen enfermedad de Parkinson, enfermedad de almacenamiento lisosómico, isquemia, dolor neuropático, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM) y enfermedad de Canavan (EC).
- En el presente documento se proporcionan métodos de tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en un sujeto que lo necesite. Un sujeto que necesita tratamiento para ELA es un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene ELA. En algunos casos, la ELA se ha asociado a una mutación en el gen que codifica la superóxido dismutasa (SOD1). En algunos casos los niveles elevados de SOD1 parecen estar asociados con la ELA. Se ha mostrado que la expresión transgénica de ARNhp frente a SOD1 puede atenuar la expresión de SOD1 mutante, retrasar la aparición de enfermedad y prolongar la supervivencia (Xia *et al.* 2006, Neurobiol Dis 23: 578). Además, se ha encontrado que la infusión intratecal de ARNip frente a SOD1 en el momento de la aparición de la enfermedad atenúa la expresión de SOD1 mutante y prolonga la supervivencia (Wang *et al.* 2008, JBC 283: 15845). Adicionalmente, la inyección en el nervio de un adenovirus que expresa ARNhp frente a SOD1 en el momento de aparición de la enfermedad puede atenuar la expresión de SOD1 mutante y prolongar la supervivencia (Wu *et al.* 2009, Antiox Redox Sig 11: 1523).
- Aspectos de la divulgación en el presente documento están basados en el descubrimiento de que terapias basadas en AAV logran, con baja toxicidad, una inhibición a largo plazo de la expresión de SOD1 que es generalizada en todo el tejido del SNC del sujeto. Los métodos de tratamiento de ELA que se proporcionan en el presente documento normalmente implican administrar a tejido del SNC de un sujeto una cantidad eficaz de un rAAV que alberga un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica un ARN inhibidor que se une específicamente a ARNm de SOD1 (por ejemplo, que se hibrida específicamente con un ácido nucleico que tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 17 o 19) e inhibe la expresión de SOD1 en el sujeto. Se ha descubierto que los rAAV que tienen una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 9 logran una distribución generalizada en todo el SNC después de la inyección intratecal y/o inyección intracerebral y, así, son particularmente útiles para tratar la ELA. Este resultado es sorprendente en vista de determinados otros rAAV que infectan células solo dentro de la proximidad inmediata del sitio de inyección, o que logran solo una distribución limitada, después de la inyección intratecal. Así, los rAAV que logran una distribución generalizada en todo el SNC son particularmente útiles como vectores de transferencia génica para tratar la ELA.
- En algunos casos, se ha descubierto que la coadministración por inyección intratecal e inyección intracerebral, por ejemplo, inyección intraventricular, de rAAV que tienen una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 9 y un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica un ARN inhibidor que se une específicamente a ARNm de SOD1 e inhibe la expresión de SOD1, logra inhibición a largo plazo de SOD1 y mejora el resultado (por ejemplo, la esperanza de vida) en un modelo animal de ELA (véase, por ejemplo, la Figura 6A). En algunos casos, el ARN inhibidor es un ARN antisentido, un ARNhp o un miARN. El ARN inhibidor puede tener una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26. El ARN inhibidor puede tener una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 22 a 30. Así, en algunos casos, se proporciona un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con un ácido nucleico que tiene una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 22 a 30. En algunos casos, se proporciona un AAV recombinante que alberga un ácido nucleico que comprende una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 22 a 30. El AAV recombinante puede tener una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 9. El AAv recombinante puede tener una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 12.
- En el presente documento se proporcionan métodos de tratamiento de la enfermedad de Canavan (EC) en un sujeto que lo necesite. Un sujeto que necesita un tratamiento para EC es un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene EC. La enfermedad de Canavan está provocada por un gen de ASPA defectuoso que es responsable de la producción de la enzima aspartoacilasa. Esta enzima normalmente degrada la molécula cerebral concentrada N-acetyl aspartato. La disminución de la actividad de la aspartoacilasa en sujetos con EC previene la degradación normal del N-acetyl aspartato y parece que la ausencia de una degradación interfiere con el crecimiento de la vaina de mielina de las fibras nerviosas en el cerebro. Los síntomas de la enfermedad de Canavan, que pueden aparecer

en la infancia temprana y progresan rápidamente, pueden incluir retraso mental, pérdida de habilidades motoras previamente adquiridas, dificultades en la alimentación, tono muscular anormal (es decir, laxitud o rigidez), mal control de la cabeza y megalcefalia (cabeza anormalmente agrandada). También pueden producirse parálisis, ceguera o convulsiones. La divulgación en el presente documento puede mejorar uno o más síntomas de la EC en un sujeto administrando al sujeto un AAV recombinante que alberga un ácido nucleico que expresa aspartoacilasa (ASPA). Por ejemplo, un método de tratamiento de la enfermedad de Canavan en un sujeto que lo necesite puede comprender administrar una cantidad eficaz de un rAAV a tejido del SNC del sujeto por administración intravascular, en donde el rAAV comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica ASPA (por ejemplo, una región que tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 14 o 16). Un método de tratamiento de la enfermedad de Canavan en un sujeto que lo necesite puede comprender administrar una cantidad eficaz de un rAAV a tejido del SNC del sujeto por administración intratecal, en donde el rAAV comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica ASPA. En algunos casos, los métodos de tratamiento de la EC implican administrar, a tejido del SNC del sujeto, una cantidad eficaz de un rAAV que comprende una proteína de la cápside distinta de una proteína de la cápside de AAV serotipo 2 (por ejemplo, distinta de una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 2) y un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica ASPA. En otro ejemplo, un método de tratamiento de la enfermedad de Canavan en un sujeto que lo necesite comprende administrar una cantidad eficaz de un rAAV a tejido del SNC del sujeto por una vía distinta de administración intracerebral, en donde el rAAV comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica ASPA. En algunos casos, la ASPA expresada en tejido del SNC después de la administración del rAAV da como resultado una disminución en la actividad de aspartoacilasa y la degradación de N-acetil aspartato en el tejido del SNC. Así, en algunos casos, se proporciona un vector de AAV recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 14 o 16. En algunos casos, se proporciona un AAV recombinante que alberga un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 14 o 16. En algunos casos, se proporciona un AAV recombinante que alberga un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica una proteína que tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 13 o 15. El AAV recombinante puede tener una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 12. El AAV recombinante puede tener una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 1 y 3 a 12.

AAV recombinantes

Se divulan AAV aislados. Como se usa en el presente documento con respecto a los AAV, el término "aislado" se refiere a un AAV que se ha aislado de su entorno natural (por ejemplo, de una célula hospedadora, tejido, o sujeto) o se ha producido artificialmente. Los AAV aislados pueden producirse usando métodos recombinantes. Tales AAV se denominan en el presente documento "AAV recombinantes". Los AAV recombinantes (rAAV) tienen preferentemente capacidades de direccionamiento específico de tejido, de forma que un transgén del rAAV se suministrará específicamente a uno o más tejidos predeterminados. La cápside del AAV es un elemento importante en la determinación de estas capacidades de direccionamiento específico de tejido. Así, puede seleccionarse un rAAV que tiene una cápside apropiada para el tejido que se elige como diana. En algunos casos, el rAAV comprende una proteína de la cápside que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO 1 a 12, o una proteína que tiene homología sustancial con las mismas.

Son muy conocidos en la técnica los métodos de obtención de AAV recombinantes que tienen una proteína de la cápside deseada (véase, por ejemplo, el documento US 2003/0138772). Las proteínas de la cápside de los AAV que pueden usarse en los rAAV divulgados en el presente documento incluyen, por ejemplo, las divulgadas en G. Gao, et al., J. Virol., 78(12):6381-6388 (junio de 2004); G. Gao, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 100(10):6081-6086 (13 de mayo de 2003); documentos US 2003-0138772, US 2007/0036760, US 2009/0197338, y solicitud provisional de Estados Unidos número de serie 61/182.084, presentada el 28 de mayo de 2009. Normalmente, los métodos implican cultivar una célula hospedadora que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside de AAV (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una proteína que tiene una secuencia como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO 1-12) o fragmento de la misma; un gen *rep* funcional; un vector de AAV recombinante compuesto de repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV y un transgén; y funciones auxiliares suficientes para permitir el empaquetamiento del vector de AAV recombinante en las proteínas de la cápside de AAV.

Los componentes que van a cultivarse en la célula hospedadora para empaquetar un vector de rAAV en una cápside de AAV pueden proporcionarse a la célula hospedadora en *trans*. Alternativamente, uno cualquiera o más de los componentes necesarios (por ejemplo, vector de AAV recombinante, secuencias de *rep*, secuencias de *cap* y/o funciones auxiliares) pueden proporcionarse por parte de una célula hospedadora estable que se ha manipulado para contener uno o más de los componentes necesarios usando métodos conocidos para los expertos en la materia. Muy adecuadamente, tal célula hospedadora estable contendrá el (los) componente(s) necesarios(s) bajo el control de un promotor inducible. Sin embargo, el (los) componente(s) necesarios(s) puede(n) estar bajo el control de un promotor constitutivo. En el presente documento se proporcionan ejemplos de promotores inducibles y constitutivos adecuados, en la discusión de elementos reguladores adecuados para su uso con el transgén. En aún

otra alternativa, una célula hospedadora estable seleccionada puede contener componente(s) seleccionado(s) bajo el control de un promotor constitutivo y otros componente(s) seleccionado(s) bajo el control de uno o más promotores inducibles. Por ejemplo, puede generarse una célula hospedadora estable que procede de células 293 (que contienen las funciones auxiliares de E1 bajo el control de un promotor constitutivo), pero que contienen las proteínas rep y/o cap bajo el control de promotores inducibles. Un experto en la materia puede generar aún otras células hospedadoras estables.

El vector de AAV recombinante, las secuencias de rep, las secuencias de cap y las funciones auxiliares necesarias para producir los rAAV divulgados en el presente documento, pueden suministrarse a la célula hospedadora de empaquetamiento usando cualquier elemento genético (vector) apropiado. El elemento genético seleccionado puede suministrarse por cualquier método adecuado, incluyendo los descritos en el presente documento. Los métodos usados para construir cualquier ejemplo divulgado en el presente documento son conocidos para los expertos en la manipulación de ácidos nucleicos e incluyen ingeniería genética, ingeniería recombinante y técnicas de síntesis. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. De forma similar, los métodos de generación de viriones de rAAV son muy conocidos y la selección de un método adecuado no es una limitación en la presente divulgación. Véase, por ejemplo, K. Fisher *et al.*, J. Virol., 70:520-532 (1993) y la patente de Estados Unidos N.º 5.478.745.

En algunos casos, los AAV recombinantes pueden producirse usando el método de transfección triple (por ejemplo, como se describe en detalle en la patente de Estados Unidos N.º 6.001.650). Normalmente, los AAV recombinantes se producen transfectando una célula hospedadora con un vector de AAV recombinante (que comprende un transgén) a empaquetar en partículas de AAV, un vector de función auxiliar del AAV y un vector de función accesoria. Un vector de función auxiliar del AAV codifica las secuencias de "función auxiliar de AAV" (es decir, rep y cap), que actúan en *trans* para la replicación y encapsidación productivas de AAV. Preferentemente, el vector de función auxiliar del AAV sustenta la producción eficiente de vectores de AAV sin generar ningún virión de AAV de tipo silvestre detectable (es decir, viriones de AAV que contienen genes rep y cap funcionales). Los ejemplos no limitantes de vectores adecuados para su uso con la presente divulgación incluyen pHLPI9, descrito en la patente de Estados Unidos N.º 6.001.650 y el vector pRep6cap6, descrito en la patente de Estados Unidos N.º 6.156.303. El vector de función accesoria codifica secuencias de nucleótidos para funciones víricas y/o celulares no derivadas de AAV, de las que el AAV es dependiente para la replicación (es decir, "funciones accesorias"). Las funciones accesorias incluyen las funciones necesarias para la replicación de AAV, que incluyen, sin limitación, las fracciones implicadas en la activación de la transcripción génica de AAV, el corte y empalme de ARNm de AAV específico de la fase, la replicación de ADN de AAV, la síntesis de productos de expresión de cap y el ensamblaje de cápsides de AAV. Las funciones accesorias basadas en virus pueden obtenerse de cualquiera de los virus auxiliares conocidos tales como adenovirus, virus del herpes (distinto de virus del herpes simple tipo-1) y virus de la variolovacuna.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona células hospedadoras transfectadas. El término "transfección" se usa para referirse a la captación de ADN exógeno por una célula y una célula ha sido "transfектada" cuando el ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. Generalmente, se conocen en la técnica varias técnicas de transfección. Véase, por ejemplo, Graham *et al.* (1973) Virology, 52:456, Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Davis *et al.* (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier y Chu *et al.* (1981) Gene 13:197. Dichas técnicas pueden usarse para introducir uno o más ácidos nucleicos exógenos, tales como un vector de integración de nucleótido y otras moléculas de ácido nucleico en células hospedadoras adecuadas.

Una "célula hospedadora" se refiere a cualquier célula que alberge, o tenga capacidad de albergar, una sustancia de interés. Frecuentemente, una célula hospedadora es una célula de mamífero. Una célula hospedadora puede usarse como receptora de una construcción auxiliar de AAV, un plásmido de minigen de AAV, un vector de función accesoria u otro ADN de transferencia asociado a la producción de AAV recombinantes. La expresión incluye la progenie de la célula original que se ha transfectado. Así, una "célula hospedadora", como se usa en el presente documento, puede referirse a una célula que se ha transfectado con una secuencia de ADN exógeno. Se entiende que la progenie de una única célula parental puede no ser de forma necesaria completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total a la parental original, debido a una mutación natural, accidental o deliberada.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona células aisladas. Como se usa en el presente documento con respecto a la célula, el término "aislada" se refiere a una célula que ha sido aislada de su entorno natural (por ejemplo, de un tejido o sujeto). Como se usa en el presente documento, la expresión "línea celular" se refiere a una población de células que tienen capacidad de crecimiento y división continuos o prolongados *in vitro*. Frecuentemente, las líneas celulares son poblaciones clónicas procedentes de una única célula progenitora. Se conoce además en la técnica que pueden producirse cambios espontáneos o inducidos en el cariotipo durante el almacenamiento o la transferencia de tales poblaciones clónicas. Por lo tanto, las células procedentes de la línea celular a la que se hace referencia pueden no ser precisamente idénticas a las células o cultivos ancestrales, y la línea celular a la que se hace referencia incluye tales variantes. Como se usa en el presente documento, la expresión "célula recombinante" se refiere a una célula en la que se ha introducido un segmento de ADN exógeno, tal como segmento de ADN que conduce a la transcripción de un polipéptido biológicamente activo o la producción

de un ácido nucleico biológicamente activo tal como un ARN.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" incluye cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, cromosoma artificial, virus, virión, etc., que tenga capacidad de replicación cuando se asocia a los elementos de control apropiados y que puede transferir secuencias génicas entre células. Así, el término incluye vehículos de clonación y de expresión, así como vectores víricos. En algunos casos, se contemplan que son vectores útiles los vectores en los que el segmento de ácido nucleico que va a transcribirse está situado bajo el control transcripcional de un promotor. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de un gen. Las frases "operativamente situado", "bajo el control" o "bajo el control transcripcional" significan que el promotor está en la localización y orientación correctas en relación con el ácido nucleico, para controlar el inicio de la ARN polimerasa y la expresión del gen. La expresión "vector o construcción de expresión" significa cualquier tipo de construcción genética que contiene un ácido nucleico en el que parte o toda la secuencia codificante de ácido nucleico tiene capacidad de transcribirse. En algunos casos, la expresión incluye la transcripción del ácido nucleico, por ejemplo, para generar un producto de polipéptido biológicamente activo o ARN inhibidor (por ejemplo, ARNhp, miARN) a partir de un gen transcripto.

Los anteriores métodos para empaquetar vectores recombinantes en cápsides de AAV deseadas para producir los rAAV de la divulgación no pretenden ser limitantes y otros métodos adecuados serán evidentes para el experto.

20 Vectores de AAV recombinante

Los "vectores de AAV recombinante (rAAV)" normalmente están compuestos de, como mínimo, un transgén y sus secuencias reguladoras, y repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV 5' y 3'. Es este vector de AAV recombinante el que se empaqueta en una proteína de la cápside y se suministra a una célula diana seleccionada. En algunos casos, el transgén es una secuencia de ácido nucleico, heteróloga para las secuencias del vector, que codifica un polipéptido, proteína, molécula de ARN funcional (por ejemplo, miARN, inhibidor de miARN) u otro producto genético de interés. La secuencia codificante de ácido nucleico está operativamente unida a componentes reguladores de un modo que permite la transcripción, traducción y/o expresión del transgén en una célula de un tejido diana.

Las secuencias de AAV del vector normalmente comprenden las secuencias de la repetición terminal invertida de 5' y 3' que actúan en *trans* (véase, por ejemplo, B. J. Carter, en "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pág. 155 168 (1990)). Las secuencias de ITR son de aproximadamente 145 pb de longitud. Preferentemente, se usan en la molécula las secuencias que codifican las ITRs sustancialmente completas, aunque es aceptable algún grado de modificación menor de estas secuencias. La capacidad para modificar estas secuencias de ITR está dentro de la experiencia en la técnica (véanse, por ejemplo, textos tales como Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1989) y K. Fisher *et al.*, J Virol., 70:520 532 (1996)). Un ejemplo de tal molécula empleada en el presente documento es un plásmido "que actúa en *cis*" que contiene el transgén, en el que la secuencia transgénica seleccionada y los elementos reguladores asociados están flanqueados por las secuencias ITR 5' y 3' de AAV. Las secuencias ITR de AAV pueden obtenerse de cualquier AAV conocido, que incluyen los tipos de AAV de mamífero actualmente identificados.

Además de los principales elementos identificados anteriormente para el vector de AAV recombinante, el vector también incluye elementos de control convencionales que están operativamente unidos al transgén de un modo que permite su transcripción, traducción y/o expresión en una célula transfecada con el vector plasmídico o infectada con el virus producido en el presente documento. Como se usa en el presente documento, las secuencias "operativamente unidas" incluyen tanto secuencias de control de la expresión que son contiguas al gen de interés como secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias apropiadas de iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción; señales de procesamiento de ARN eficaces tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación (poliA); secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficiencia de traducción (es decir, secuencia consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de proteínas y, cuando se deseé, secuencias que potencian la secreción del producto codificado. Se conocen en la técnica y pueden utilizarse un gran número de secuencias de control de la expresión, que incluyen promotores que son nativos, constitutivos, inducibles y/o específicos de tejido.

Como se usa en el presente documento, se dice que una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia codificante) y las secuencias reguladoras están operativamente unidas cuando están covalentemente unidas de tal forma que pongan la expresión o transcripción de la secuencia de ácido nucleico bajo la influencia o el control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias de ácidos nucleicos se traduzcan en una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN están operativamente unidas si la inducción de un promotor en las secuencias reguladoras de 5' da como resultado la transcripción de la secuencia codificante y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no (1) da como resultado la introducción de una mutación por desplazamiento de fase, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora para dirigir la transcripción de las secuencias codificantes o (3) interfiere con la capacidad del transcripto de ARN correspondiente que va a traducirse en una proteína. Así, una

- región promotora estará unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico si la región promotora tiene la capacidad de efectuar la transcripción de la secuencia de ADN de forma que el transcripto resultante pueda traducirse en la proteína o polipéptido deseado. De forma similar, dos o más regiones codificantes están operativamente unidas cuando están unidas de tal forma que su transcripción a partir de un promotor común da como resultado la expresión de dos o más proteínas que han sido traducidas en fase. En algunos casos, las secuencias codificantes operativamente unidas producen una proteína de fusión. En algunos casos, las secuencias codificantes operativamente unidas producen un ARN funcional (por ejemplo, ARNhP, miARN).
- Para ácidos nucleicos que codifican proteínas, una secuencia de poliadenilación generalmente se inserta después de las secuencias transgénicas y antes de la secuencia ITR 3' de AAV. Una construcción de rAAV útil en el presente documento también puede contener un intrón, localizado a ser posible entre la secuencia promotora/potenciadora y el transgén. Una posible secuencia de intrón procede del SV-40 y se denomina la secuencia de intrón T de SV-40. Otro elemento de vector que puede usarse es un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Se usa una secuencia IRES para producir más de un polipéptido a partir de un único transcripto génico. Se usaría una secuencia IRES para producir una proteína que contiene más de una cadena de polipéptido. La selección de estos y otros elementos de vector comunes es convencional y muchas de tales secuencias están disponibles [véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, y referencias citadas en su interior en, por ejemplo, las páginas 3.18 3.26 y 16.17 16.27 y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1989]. En algunos casos, se incluye en la poliproteína la secuencia de 2A del virus de la fiebre aftosa; éste es un péptido pequeño (aproximadamente 18 aminoácidos de longitud) que se ha demostrado que media en la escisión de poliproteínas (Ryan, M D *et al.*, EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M *et al.*, J Virology, noviembre de 1996; pág. 8124-8127; Furler, S *et al.*, Gene Therapy, 2001; 8: 864-873 y Halpin, C *et al.*, The Plant Journal, 1999; 4: 453-459). La actividad de escisión de la secuencia de 2A se ha demostrado en sistemas artificiales que incluyen plásmidos y vectores de terapia génica (AAV y retrovirus) (Ryan, M D *et al.*, EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M *et al.*, J Virology, Noviembre de 1996; pág. 8124-8127; Furler, S *et al.*, Gene Therapy, 2001; 8: 864-873 y Halpin, C *et al.*, The Plant Journal, 1999; 4: 453-459; de Felipe, P *et al.*, Gene Therapy, 1999; 6: 198-208; de Felipe, P *et al.*, Human Gene Therapy, 2000; 11: 1921-1931 y Klump, H *et al.*, Gene Therapy, 2001; 8: 811-817).
- La naturaleza precisa de las secuencias reguladoras necesarias para la expresión génica en células hospedadoras puede variar entre especies, tejidos o tipos de células, pero debe en general incluir, según sea necesario, secuencias no transcritas 5' y no traducidas 5' implicadas con el inicio de la transcripción y la traducción, respectivamente, tales como una caja TATA, secuencia de protección con capuchón, secuencia CAAT, elementos potenciadores y similares. Especialmente, tales secuencias reguladoras no transcritas 5' incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del gen operativamente unido. Las secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias potenciadoras o secuencias activadoras cadena arriba según se desee. Los vectores en el presente documento pueden incluir opcionalmente secuencias líder 5' o señal. La elección y el diseño de un vector apropiado están dentro de la capacidad y discreción de un experto en la materia.
- Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen, sin limitación, el promotor del LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) retrovírico (opcionalmente con el potenciador de RSV), el promotor del citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el potenciador del CMV) [véase, por ejemplo, Boshart *et al.*, Cell, 41:521-530 (1985)], el promotor del SV40, el promotor de la dihidrofolato reductasa, el promotor de β-actina, el promotor de fosfoglicerol quinasa (PGK) y el promotor de EF1α [Invitrogen].
- Los promotores inducibles permiten la regulación de la expresión génica y pueden regularse por compuestos suministrados de forma exógena, factores ambientales tales como temperatura o la presencia de un estado fisiológico específico, por ejemplo, fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula o en células en replicación solo. Los promotores inducibles y sistemas inducibles están disponibles de diversas fuentes comerciales, que incluyen, sin limitación, Invitrogen, Clontech y Ariad. Se han descrito muchos otros sistemas y un experto en la materia puede seleccionarlos fácilmente. Los ejemplos de promotores inducibles regulados por promotores suministrados de forma exógena incluyen el promotor de la metalotioneína (MT) de oveja inducible por zinc, el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el sistema del promotor de polimerasa T7 (documento WO 98/10088); el promotor de insecto de ecdisona (No *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)), el sistema represible por tetraciclina (Gossen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)), el sistema inducible por tetraciclina (Gossen *et al.*, Science, 268:1766-1769 (1995), véase también Harvey *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)), el sistema inducible por RU486 (Wang *et al.*, Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) y Wang *et al.*, Gene Ther., 4:432-441 (1997)) y el sistema inducible por rapamicina (Magari *et al.*, J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)). Aún otros tipos de promotores inducibles que pueden ser útiles en este contexto son los que están regulados por un estado fisiológico específico, por ejemplo, temperatura, fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula o en células en replicación solo.
- En otro caso, se usará el promotor nativo, o fragmento del mismo, para el transgén. El promotor nativo puede preferirse cuando se desee que la expresión del transgén deba imitar la expresión nativa. El promotor nativo puede usarse cuando la expresión del transgén deba regularse de forma temporal o por el desarrollo, o de una manera específica de tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. En otro caso, también pueden usarse

otros elementos de control de la expresión nativos, tales como elementos potenciadores, sitios de poliadenilación o secuencias consenso de Kozak, para imitar la expresión nativa.

En algunos casos, las secuencias reguladoras confieren capacidades de expresión génica específica de tejido. En 5 algunos casos, las secuencias reguladoras específicas de tejido se unen a factores de transcripción específicos de tejido que inducen la transcripción en una manera específica de tejido. Dichas secuencias reguladoras específicas de tejido (por ejemplo, promotores, potenciadores, etc.) son muy conocidas en la técnica. Las secuencias reguladoras específicas de tejido a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, los siguientes promotores específicos de tejido: neuronales tal como el promotor de enolasa específica de neurona (NSE) (Andersen *et al.*, Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)), promotor del gen de la cadena ligera del neurofilamento (Piccioli *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)) y el promotor del gen vgf específico de neuronas (Piccioli *et al.*, Neuron, 15:373-84 (1995)). En algunos casos, el promotor específico de tejido es un promotor de un gen seleccionado de: 10 núcleos neuronales (NeuN), proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), adenomatous polyposis coli (APC) y molécula 1 adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba-1). Otros promotores específicos de tejido apropiados serán evidentes 15 para el experto. En algunos casos, el promotor es un promotor de beta-actina de pollo.

En algunos casos, uno o más sitios de unión para uno o más de los miARN se incorporan en un transgén de un vector rAAV, para inhibir la expresión del transgén en uno o más tejidos de un sujeto que albergan los transgenes, por ejemplo, tejidos que no son del SNC. El experto apreciará que los sitios de unión pueden seleccionarse para 20 controlar la expresión de un transgén en una manera específica de tejido. Por ejemplo, la expresión de un transgén en el hígado puede inhibirse incorporando un sitio de unión para miR-122 de forma que el ARNm expresado del transgén se une a y se inhiba por miR-122 en el hígado. La expresión de un transgén en el corazón puede inhibirse incorporando un sitio de unión para miR-133a o miR-1, de forma que el ARNm expresado del transgén se une a y se inhiba por miR-133a o miR-1 en el corazón. Los sitios diana de miARN en el ARNm pueden estar en la 5' UTR, la 3' 25 UTR o en la región codificante. Normalmente, el sitio diana está en la 3' UTR del ARNm. Adicionalmente, el transgén puede diseñarse de forma que múltiples miARN regulen el ARNm reconociendo los mismos sitios o múltiples sitios. La presencia de múltiples sitios de unión de miARN puede dar como resultado la acción cooperativa de múltiples RISCs y proporcionar una inhibición altamente eficiente de la expresión. La secuencia del sitio diana puede comprender un total de 5-100, 10-60 o más nucleótidos. La secuencia del sitio diana puede comprender al menos 5 30 nucleótidos de la secuencia de un sitio de unión del gen diana.

Secuencias codificantes de transgén: genes relacionados con el SNC

La composición de la secuencia de transgén de un vector de rAAV dependerá del uso que se le dé al vector 35 resultante. Por ejemplo, un tipo de secuencia de transgén incluye una secuencia indicadora, la que tras la expresión produce una señal detectable. En otro ejemplo, el transgén codifica una proteína terapéutica o ARN funcional terapéutico. En otro ejemplo, el transgén codifica una proteína o ARN funcional que está destinado a usarse para fines de investigación, por ejemplo, para crear un modelo animal transgénico somático que alberga el transgén, por ejemplo, para estudiar la función del producto transgénico. En otro ejemplo, el transgén codifica una proteína o ARN 40 funcional que está destinado a usarse para crear un modelo animal de enfermedad. Las secuencias codificantes de transgén apropiadas serán evidentes para el experto.

Se divulan vectores de rAAV para su uso en métodos de prevención o tratamiento de uno o más defectos génicos (por ejemplo, defectos génicos hereditarios, alteraciones génicas somáticas) en un mamífero, tales como, por 45 ejemplo, un defecto genético que da como resultado una deficiencia de polipéptido o exceso de polipéptido en un sujeto, y particularmente para tratar o reducir la gravedad o el grado de deficiencia en un sujeto que manifiesta un trastorno asociado al SNC unido a una deficiencia en tales polipéptidos en células y tejidos. En algunos casos, los métodos implican la administración de un vector de rAAV que codifica uno o más péptidos, polipéptidos, ARNh, 50 microARN, nucleótidos antisentido, etc. terapéuticos en un vehículo farmacéuticamente aceptable para el sujeto, en una cantidad y durante un periodo de tiempo suficiente para tratar el trastorno asociado al SNC en el sujeto que tiene o que se sospecha que tiene tal trastorno.

Un vector de rAAV puede comprender como transgén un ácido nucleico que codifica una proteína o ARN funcional que modula o trata un trastorno asociado al SNC. El siguiente es un listado no limitante de genes asociados a 55 trastornos asociados al SNC: la proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), tirosina hidroxilasa (TH), GTP-ciclohidrolasa (GTPCH), aspartoacilasa (ASPA), superóxido dismutasa (SOD1) y aminoácido descarboxilasa (AADC). Por ejemplo, un transgén útil en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson codifica TH, que es una enzima limitante de la velocidad en la síntesis de dopamina. 60 Un transgén que codifica GTPCH, que genera el cofactor de TH tetrahidrobiopterina, también puede usarse en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Un transgén que codifica GDNF o BDNF, o AADC, que facilita la conversión de L-Dopa en DA, también puede usarse para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Para el tratamiento de la ELA, un transgén útil puede codificar: GDNF, BDNF o CNTF. Además, para el tratamiento de la ELA, un transgén útil puede codificar un ARN funcional, por ejemplo, ARNh, miARN, que inhibe la expresión de SOD1. Para el tratamiento de isquemia, un transgén útil puede codificar NAIP o NGF. Un transgén que codifica beta-glucuronidasa (GUS) puede ser útil para el tratamiento de determinadas enfermedades de almacenamiento 65

lisosómico (por ejemplo, mucopolisacaridosis tipo VII (MPS VII)). Un transgén que codifica un gen de activación de profármaco, por ejemplo, timidina quinasa del VHS que convierte ganciclovir en un nucleótido tóxico que altera la síntesis de ADN y conduce a muerte celular, puede ser útil para tratar determinados cánceres, por ejemplo, cuando se administra en combinación con el profármaco. Un transgén que codifica un opioide endógeno, tal como una β -endorfina, puede ser útil para tratar dolor. Otros ejemplos de transgenes que pueden usarse en los rAAV serán evidentes para el experto (véase, por ejemplo, Costantini LC, et al., Gene Therapy (2000) 7, 93-109).

En algunos casos, la capacidad de clonación del vector de ARN recombinante puede ser limitada y una secuencia codificante deseada puede implicar la sustitución completa del genoma de 4,8 kilobases del virus. Por lo tanto, en algunos casos los genes grandes pueden no ser adecuados para su uso en un vector de AAV recombinante convencional. El experto apreciará qué en la técnica están disponibles opciones para superar una capacidad codificante limitada. Por ejemplo, pueden aparecer las ITRs de AAV de dos genomas para formar concatámeros de cabeza a cola, casi duplicando la capacidad del vector. La inserción de sitios de corte y empalme permite la eliminación de las ITRs del transcripto. Serán evidentes para el experto otras opciones para superar una capacidad de clonación limitada.

Administración de AAV recombinantes

Los rAAV se administran en cantidades suficientes para transfecutar las células de un tejido deseado y para proporcionar niveles suficientes de transferencia y expresión génica sin excesivos efectos adversos. Las vías de administración convencionales y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, el suministro directo al tejido seleccionado (por ejemplo, administración intracerebral, administración intratecal), intravenoso, oral, inhalación (incluyendo suministro intranasal e intratraqueal), intraocular, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intradérmico, intratumoral y otras vías de administración parenterales. Las vías de administración pueden combinarse, si se desea.

La administración de determinados rAAV a un sujeto puede ser, por ejemplo, por administración en el torrente circulatorio del sujeto. La administración en el torrente circulatorio puede ser por inyección en una vena, una arteria, o cualquier otro conducto vascular. Además, en determinados casos, puede ser deseable suministrar los rAAV a tejido cerebral, meninges, células neuronales, células de la glía, astrocitos, oligodendrocitos, líquido cefalorraquídeo (LCR), espacios intersticiales y similares. En algunos casos, los AAV recombinantes pueden administrarse directamente a la médula espinal o al cerebro por inyección en la región ventricular, así como al estriado (por ejemplo, el núcleo caudado o putamen del estriado) e intersección neuromuscular, o lóbulo cerebeloso, con una aguja, catéter o dispositivo relacionado, usando técnicas neuroquirúrgicas conocidas en la técnica, tales como por inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Stein et al., J Virol 73:3424-3429, 1999; Davidson et al., PNAS 97:3428-3432, 2000; Davidson et al., Nat. Genet. 3:219-223, 1993, y Alisky y Davidson, Hum. Gene Ther. 11:2315-2329, 2000). En determinadas circunstancias será conveniente administrar las construcciones terapéuticas basadas en rAAV en composiciones farmacéuticas adecuadamente formuladas divulgadas en el presente documento, por vía subcutánea, intrapancreática, intranasal, parenteral, intravenosa, intramuscular, intracerebral, intratecal, intracerebral, oral, intraperitoneal o por inhalación. En algunos casos, para administrar los rAAV pueden usarse las modalidades de administración como se describen en las patentes de Estados Unidos N.º 5.543.158; 5.641.515 y 5.399.363.

Composiciones de AAV recombinantes

Los rAAV pueden suministrarse a un sujeto en composiciones de acuerdo con cualquiera de los métodos apropiados conocidos en la técnica. El rAAV, preferentemente suspendido en un vehículo fisiológicamente compatible (por ejemplo, en una composición), puede administrarse a un sujeto, por ejemplo, un ser humano, ratón, rata, gato, perro, oveja, conejo, caballo, vaca, cabra, cerdo, cobaya, hámster, pollo, pavo o un primate no humano (por ejemplo, macaco). Las composiciones de la divulgación pueden comprender un rAAV solo, o en combinación con uno o más de otros virus (por ejemplo, un segundo rAAV que codifica que tiene uno o más transgenes diferentes). En algunos casos, las composiciones comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más rAAV diferentes, teniendo cada uno, uno o más transgenes diferentes.

Un experto en la materia puede seleccionar fácilmente los vehículos adecuados en vista de la indicación a la que se dirige el rAAV. Por ejemplo, un vehículo adecuado incluye solución salina, que puede formularse con diversas soluciones tampón (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). Otros vehículos a modo de ejemplo incluyen solución salina estéril, lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, gelatina, dextrano, agar, pectina, aceite de cacahuete, aceite de sésamo y agua. La selección del vehículo no es una limitación de la presente divulgación.

Opcionalmente, las composiciones pueden contener, además del rAAV y vehículo(es), otros ingredientes farmacéuticos convencionales, tales como conservantes o estabilizadores químicos. Los conservantes a modo de ejemplo adecuados incluyen clorobutanol, sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, galato de propilo, los parabenos, etilvainillina, glicerina, fenol y paraclorofenol. Los estabilizadores químicos adecuados incluyen gelatina y albúmina.

La dosis de viriones de rAAV necesaria para lograr un efecto deseado o "efecto terapéutico", por ejemplo, las

unidades de la dosis en genomas de vector/por kilogramo de peso corporal (vg/kg), variarán basándose en varios factores que incluyen, pero sin limitación: la vía de administración de rAAV, el nivel de expresión génica o de ARN necesaria para lograr un efecto terapéutico, la enfermedad o trastorno específico que está tratándose, y la estabilidad del producto génico o del ARN. Un experto en la materia puede determinar fácilmente un intervalo de 5 dosis de viriones de rAAV para tratar un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno particular, basándose en los factores anteriormente mencionados, así como de otros factores que son muy conocidos en la técnica. Una cantidad eficaz del rAAV está generalmente en el intervalo de aproximadamente 10 µl a aproximadamente 100 ml de solución que contiene de aproximadamente 10^9 a 10^{16} copias de genoma por sujeto. Pueden usarse otros volúmenes de 10 solución. El volumen usado normalmente dependerá, entre otras cosas, del tamaño del sujeto, la dosis de rAAV y la vía de administración. Por ejemplo, para administración intratecal o intracerebral puede usarse un volumen en el intervalo de 1 µl a 10 µl, o de 10 µl a 100 µl. Para administración intravenosa, puede usarse un volumen en el intervalo de 10 µl a 100 µl, 100 µl a 1 ml, 1 ml a 10 ml, o más. En algunos casos, es apropiada una dosificación entre 15 aproximadamente 10^{10} y 10^{12} copias de genoma de rAAV por sujeto. En determinados casos, 10^{12} copias de genoma de rAAV por sujeto son eficaces para el direccionamiento a tejidos del SNC. En algunos casos, el rAAV se administra a una dosis de 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} o 10^{15} copias de genoma por sujeto. En algunos casos, el rAAV se administra a una dosis de 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} o 10^{14} copias de genoma por kg.

En algunos casos, las composiciones de rAAV se formulan para reducir la agregación de partículas de AAV en la 20 composición, particularmente donde están presentes concentraciones de rAAV altas (por ejemplo, $\sim 10^{13}$ CG/ml o más). Los métodos de reducción de la agregación de los rAAV son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la adición de tensioactivos, ajuste del pH, ajuste de la concentración de sales, etc. (véase, por ejemplo, Wright FR, et al., Molecular Therapy (2005) 12, 171-178).

25 La formulación de excipientes farmacéuticamente aceptables y soluciones de vehículo es muy conocida para los expertos en la materia, ya que es el desarrollo de pautas de dosificación y de tratamiento adecuadas para usar las 30 composiciones particulares descritas en el presente documento en diversas pautas de tratamiento. Normalmente, estas formulaciones pueden contener al menos aproximadamente el 0,1 % o más del principio activo, aunque el porcentaje del principio(s) activo(s) puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre 35 aproximadamente el 1 o el 2 % y aproximadamente el 70 % o el 80 % o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de principio activo en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal forma que se obtenga una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Factores tales como la solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, vía de administración, estabilidad en almacenamiento del producto, así como otras consideraciones farmacológicas, serán contempladas por un experto en la materia de 40 preparación de tales formulaciones farmacéuticas y, como tal, pueden ser convenientes diversas pautas de dosificaciones y de tratamiento.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y 45 polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos, y en aceites. En condiciones de almacenamiento y uso habituales, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. En muchos casos, la forma es estéril y fluida hasta el punto de que exista fácil 50 inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño 55 de partícula necesario en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede efectuarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede efectuarse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para la administración de una solución acuosa inyectable, por ejemplo, la solución puede tamponarse 60 adecuadamente, si fuera necesario, y el diluyente líquido hacerse primero isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, un medio acuoso estéril que puede emplearse será conocido para los expertos en la materia. Por ejemplo, puede disolverse una dosificación en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclisis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15^a Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente se producirá alguna variación en la dosificación, dependiendo de la afección del hospedador. Las personas responsables de la administración determinarán, en cualquier caso, la dosis apropiada para el hospedador individual.

65 Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando el rAAV activo en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes enumerados en el presente documento, según se precise, seguido

de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios, de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado a vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente esterilizada por filtración de la misma.

Las composiciones de rAAV divulgadas en el presente documento también pueden formularse en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de un modo compatible con la formulación de dosificación y en cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas de dosificación tal como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Como se usa en el presente documento, "vehículo" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, tampones, soluciones de vehículo, suspensiones, coloides y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es muy conocido en la técnica. También pueden incorporarse principios activos suplementarios en las composiciones. La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o colateral similar cuando se administran a un huésped.

Para la introducción de las composiciones en células hospedadoras adecuadas pueden usarse vehículos de suministro tales como liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares. En particular, los *transgenes* suministrados por el vector de rAAV pueden formularse para el suministro encapsulado en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera o una nanopartícula o similares.

Tales formulaciones pueden preferirse para la introducción de formulaciones farmacéuticamente aceptables de los ácidos nucleicos o las construcciones de rAAV divulgadas en el presente documento. La formación y uso de los liposomas es generalmente conocida para los expertos en la materia. Recientemente, se desarrollaron liposomas con estabilidad en suero y semividados en circulación mejoradas (patente de Estados Unidos N.º 5.741.516). Adicionalmente, se han descrito diversos métodos de preparaciones de liposoma y de tipo liposoma como posibles vehículos de fármaco (patentes de Estados Unidos. N.º 5.567.434; 5.552.157; 5.565.213; 5.738.868 y 5.795.587).

Se han usado satisfactoriamente liposomas con varios tipos celulares que normalmente son resistentes a la transfección por otros procedimientos. Además, los liposomas no tienen limitaciones de longitud del ADN que son típicas de los sistemas de suministro basados en virus. Se han usado eficazmente liposomas para introducir genes, fármacos, agentes radioterapéuticos, virus, factores de transcripción y efectores alostéricos en diversas líneas celulares cultivadas y animales. Además, se han realizado varios ensayos clínicos satisfactorios que examinan la eficacia del suministro de fármacos mediado por liposomas.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilaminares (también llamadas vesículas multilaminares (MLVs, forma siglada de *multilamellar vesicles*). Las MLVs generalmente tienen diámetros de 25 nm a 4 µm. El tratamiento con ultrasonidos de las MLVs da como resultado la formación de vesículas unilaminares pequeñas (SUVs, forma siglada de *small unilamellar vesicles*) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 .ANG., que contienen una solución acuosa en el núcleo.

Alternativamente, pueden usarse formulaciones en nanocápsula del rAAV. Generalmente, las nanocápsulas pueden atrapar sustancias en una forma estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (de tamaño de alrededor de 0,1 µm) deben diseñarse usando polímeros que puedan degradarse *in vivo*. Se contemplan para su uso nanopartículas biodegradables de polí(cianoacrilato de alquilo), que cumplen estos requisitos.

Además de los métodos de suministro descritos anteriormente, las siguientes técnicas también se contemplan como métodos alternativos de suministro de las composiciones de rAAV a un hospedador. Se ha usado y descrito la sonoforesis (es decir, ultrasonido) en la patente de Estados Unidos N.º 5.656.016 como un dispositivo para potenciar la velocidad y eficacia de permeación del fármaco en y a través del aparato circulatorio. Otras alternativas de suministro de fármacos contempladas son la inyección intraósea (patente de Estados Unidos N.º 5.779.708), dispositivos de microchip (patente de Estados Unidos N.º 5.797.898), formulaciones oftálmicas (Bourlais *et al.*, 1998), matrices transdérmicas (patentes de Estados Unidos N.º 5.770.219 y 5.783.208) y liberación controlada por autorregulación (patente de Estados Unidos N.º 5.697.899).

Kits y composiciones relacionadas

Los agentes descritos en el presente documento pueden, en algunos casos, ensamblarse en kits farmacéuticos o de diagnóstico, o de investigación, para facilitar su uso en aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico o de investigación.

- 5 Un kit puede incluir uno o más recipientes que contienen los componentes divulgados anteriormente e instrucciones para su uso. Específicamente, tales kits pueden incluir uno o más agentes descritos en el presente documento, junto con instrucciones que describen la aplicación prevista y el uso apropiado de estos agentes. En determinados casos, los agentes de un kit pueden estar en una formulación farmacéutica y dosificación adecuadas para una aplicación particular y para un método de administración de los agentes. Los kits para fines de investigación pueden contener 10 los componentes en concentraciones o cantidades apropiadas para ejecutar diversos experimentos.

El kit puede diseñarse para facilitar el uso por parte de investigadores de los métodos descritos en el presente documento y puede tomar muchas formas. Cada una de las composiciones del kit, si procede, puede proporcionarse 15 en forma líquida (por ejemplo, en disolución), o en forma sólida (por ejemplo, un polvo seco). En determinados casos, algunas de las composiciones pueden ser constituyentes o de otro modo procesables (por ejemplo, a una forma activa), por ejemplo, mediante la adición de un disolvente adecuado u otra especie (por ejemplo, agua o un medio de cultivo celular), que puede o puede no proporcionarse con el kit. Como se usa en el presente documento, "instrucciones" 20 puede definir un componente de instrucción y/o ayuda, y normalmente implican instrucciones por escrito en o asociadas a un envase divulgado en el presente documento. Las instrucciones también pueden incluir cualquier instrucción oral o electrónica proporcionada de cualquier manera, de forma que un usuario reconozca claramente que las instrucciones han de estar asociadas con el kit, por ejemplo, audiovisual (por ejemplo, cinta de video, DVD, etc.), internet y/o comunicaciones basadas en internet, etc. Las instrucciones por escrito pueden estar 25 en una forma prescrita por un organismo público que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, instrucciones que también pueden reflejar la autorización del organismo para la fabricación, uso o venta para administración a animales.

El kit puede contener uno cualquiera o más de los componentes descritos en el presente documento en uno o más 30 recipientes. Como un ejemplo, en un caso, el kit puede incluir instrucciones para mezclar uno o más componentes del kit y/o aislar y mezclar una muestra y aplicarla a un sujeto. El kit puede incluir un recipiente que contiene los agentes descritos en el presente documento. Los agentes pueden estar en forma de un líquido, gel o sólida (polvo). Los agentes pueden prepararse de forma estéril, envasarse en jeringa y transportarse refrigerados. Alternativamente, pueden estar contenidos en un vial u otro recipiente para almacenamiento. Un segundo recipiente 35 puede tener otros agentes preparados de forma estéril. Alternativamente, el kit puede incluir los agentes activos premezclados y transportados en una jeringa, vial, tubo u otro recipiente. El kit puede tener uno o más de, o todos, los componentes necesarios para administrar los agentes a un sujeto, tales como una jeringa, dispositivos de aplicación tópica, o tubo para aguja de catéter i. v. y bolsa.

Ejemplos**40 EJEMPLO 1: Caracterización de 12 vectores de AAV para suministro intravascular para tener como diana al SNC y no tener como diana tejidos que no son del SNC por regulación por miARN**

Se evaluaron las propiedades de transferencia génica al SNC de 12 vectores scAAVEGFP de diferentes serotipos, o 45 variantes naturales. Se descubrieron rAAV que cruzan la barrera hematoencefálica (BHE) y se dirigen a los oligodendrocitos. Los experimentos se realizaron en ratones neonatales (1 día de edad) y en ratones adultos (10 semanas de edad) (C57BL/6). Se probaron los siguientes serotipos de AAV: AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, rh.10 (también denominado en el presente documento as AAVrh.10), rh.39, rh.43, CSp3.

50 Los vectores de AAV recombinantes expresaron un gen indicador de GFP potenciado bajo el promotor híbrido de β-actina de pollo potenciado por CMV y se produjeron por la transfección transitoria en células 293. Se anestesiaron crías neonatales de día 1 con isoflurano. Después, se inyectaron 100 µl de vectores de rAAV (4×10^{11} CG por ratón) a las crías a través de la vena temporal superficial bajo un microscopio de disección. En ratones adultos, el rAAV se administró por inyección en la vena de la cola (se evaluaron dos dosis diferentes, 4×10^{11} CG por ratón o 4×10^{12} CG por ratón). Veintiún días después de la inyección, los animales tratados se anestesiaron y se perfundieron por 55 vía transcardíaca con PBS frío y paraformaldehído al 4 % (v/v). Se extrajeron los cerebros, se sumergieron en sacarosa al 20 % y se incluyeron en Tissue-Tek OCT. Se cortaron cortes 40 µm de grosor y se tiñeron con anticuerpos primarios en una placa de 12 pocillos, por ejemplo, anti-NeuN, anti-EGFP y anti-GFAP, durante la noche a 4 °C, luego con anticuerpos secundarios durante 2 h a temperatura ambiente. Los ratones de control recibieron inyecciones de PBS.

60 En el estudio con neonatos, se observó la distribución de células EGFP (+) en todo el cerebro a las 3 semanas después de la infusión. Fueron visibles grandes cantidades de células EGFP (+) con intensidades variables en diferentes regiones de los cerebros de los animales tratados con 10 de los 12 vectores. En muchos casos, el plexo coroideo mostró una expresión de EGFP muy fuerte y aparecieron células del parénquima cerebral transducidas predominantemente en regiones periventriculares. Esto indica que una fracción de los vectores suministrados i.v. 65 pueden entrar en el SNC mediante la interfaz plexo coroideo-sangre. En adultos, se observó tinción sustancial de la

vasculatura cerebral. Las eficiencias de direccionamiento global por los AAV a diferentes regiones del cerebro se clasificaron como hipotálamo > bulbo raquídeo > corteza > hipocampo > cerebelo > tálamo. No se detectó expresión de EGFP a altos niveles en ratones neonatales a los que se administró rAAV2 o rAAV5 que contenía el gen indicador EGFP por la inyección de 4×10^{11} CG por ratón en la vena temporal superficial (véase la Tabla 1 y las Figuras 1 y 2 para el resumen de datos).

También se tiñeron cortes de tejido de forma inmunofluorescente con anticuerpos marcadores anti-EGFP y específicos del tipo celular para clasificar los tipos celulares EGFP (+) en el SNC. Se mejoró espectacularmente la sensibilidad de detección para las células EGFP (+), particularmente neuronas y oligodendrocitos. Aunque los diferentes vectores transdijeron neuronas a eficiencias variables, los 10 vectores (incluyendo AAV9) presentaron tropismos más fuertes para las células no neuronales, especialmente astrocitos. Un vector (AAV7) se dirigió a oligodendrocitos más eficientemente que los otros 9 vectores. Varios rAAV transdijeron neuronas y/o astrocitos a eficiencias más altas en comparación con rAAV9 (AAVrh.10, rh.34 y rh.43). Se observó una extensa transducción de astrocitos en hipotálamo y bulbo raquídeo. La inyección de determinados vectores dio como resultado una transducción de neuronas sustancial en diferentes regiones del cerebro, que incluyen neocorteza, hipocampo e hipotálamo. Pareció que algunos vectores transdijeron células de Purkinje en la corteza del cerebelo (por ejemplo, CSp3), mientras que otros transdijeron de forma eficaz vasos sanguíneos en la neocorteza, tálamo e hipotálamo. Además, los plexos coroideos en el 3^{er} ventrículo, ventrículo lateral y 4^o ventrículo mostraron una fuerte expresión de EGFP. La expresión de EGFP también se evaluó en diferentes regiones de la médula espinal de ratones neonatales y adultos (los resultados para los estudios con neonatos se muestran en la Figura 3).

Se observó transducción de tejidos que no son del SNC, tales como el corazón y músculo esquelético (por ejemplo, para AAV9, AAV8 y CSp3). En algunos casos, esto puede conducir a algunos efectos secundarios no convenientes. Para tratar esta cuestión, los sitios de unión de miARN se incorporaron en 3' UTR del casete del transgén y se logró el desdirecciónamiento altamente específico y eficaz de la transducción de AAV de tejidos que no son del SNC. Para inhibir la expresión en el hígado, se usó una unión (o uniones) de miARN para mR-122. Para inhibir la expresión en músculo esquelético y corazón, se usó una unión (o uniones) de miARN para mR-1.

Tabla 1: TROPISMOS PARA SNC DE AAV

| | AAV1 | AAV2 | AAV5 | AAV6 | AAV6.2 | AAV7 | AAV8 | AAV9 | rh.10 | rh.39 | rh.43 | CSp3 | |
|----------|-------------------|------|------|------|--------|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-----|
| Adulto | Corteza | + | | | + | + | ++ | ++ | +++ | ++ | + | - | + |
| | Hipocampo | + | | | + | + | ++ | ++ | +++ | ++ | + | - | + |
| | Tálamo | + | | | + | + | ++ | ++ | ++++ | +++ | ++ | + | + |
| | Hipotálamo | + | | | ++ | + | +++ | ++ | ++ | +++ | +++ | + | ++ |
| | Cerebelo | + | | | ++ | + | ++ | +++ | +++ | ++++ | + | + | + |
| | Tronco encefálico | + | | | ++ | + | ++ | ++ | ++++ | +++ | ++ | - | + |
| | Cervical | +++ | | | + | + | +++ | +++ | ++++ | +++ | +++ | - | + |
| | Torácica | +++ | | | + | + | +++ | +++ | ++++ | +++ | ++ | - | + |
| | Lumbar | +++ | | | + | + | +++ | +++ | +++++ | +++ | ++ | - | + |
| Neonatal | Corteza | ++ | + | - | ++ | + | + | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| | Hipocampo | + | + | - | - | - | +++ | ++ | + | + | ++ | ++ | + |
| | Tálamo | + | + | - | - | + | ++ | + | + | + | ++ | + | + |
| | Hipotálamo | ++ | - | - | + | + | +++++ | +++++ | + | + | +++++ | ++ | - |
| | Cerebelo | ++ | - | - | + | - | + | + | + | + | ++ | + | + |
| | Tronco encefálico | ++ | - | - | + | - | ++ | + | + | + | +++++ | ++ | +++ |
| | Cervical | - | - | - | + | ++ | ++ | +++ | ++ | +++++ | +++ | ++ | ++ |
| | Torácica | + | - | - | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | + |
| | Lumbar | + | - | - | + | ++ | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ | + |

Grado de tropismo de tejido (- sin tropismo; +++++ alto tropismo) Basado en los datos de las Figuras 1 y 2.

Ejemplo 2: Construcción y evaluación de un vector AAVrh. 10 recombinante para tratar la EC

La enfermedad de Canavan (EC) es un trastorno neurodegenerativo hereditario producido por mutaciones en el gen de la aspartoacilasa (ASPA), que conduce a la acumulación de ácido N-acetil-aspártico (NAA) en oligodendrocitos, con degeneración esponjosa resultante de materia blanca en el cerebro. Un estudio clínico inicial sobre la terapia génica de ASPA basada en rAAV2 para la EC logró éxito muy limitado. Se cree, sin desear ceñirse a teoría alguna, que una terapia génica de la EC eficaz transducirá oligodendrocitos en todo el SNC.

Se construye un vector de rAAV que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica la proteína ASPA (SEQ ID NO: 13 o 15) como vector de terapia génica para la EC. La construcción emplea CAG (promotor de β-actina de pollo con potenciador del CMV) para dirigir la expresión de ASPA que tiene una secuencia codificante como se expone en SEQ ID NO: 14 o 16. El vector de rAAV se empaqueta en partículas de rAAV usando

el método de transfección triple. Para evaluar su eficacia, se examina rAAV-ASPA en un modelo de ratón genosuprimido para ASPA de EC en cuanto a su capacidad para eliminar o atenuar el fenotipo tipo EC de ratones genosuprimidos para ASPA homocigóticos (Matalon R et al. The Journal of Gene Medicine, Volumen 2 Número 3, Páginas 165 - 175). Los ratones genosuprimidos para ASPA homocigóticos presentan afectación neurológica,

5 macrocefalia, enfermedad generalizada de la materia blanca, actividad de ASPA deficiente y altos niveles de NAA en orina. La obtención de imágenes por resonancia magnética (RMN) y espectroscopía de resonancia magnética (ERM) del cerebro de los ratones homocigóticos muestran cambios en la materia blanca característicos de la enfermedad de Canavan y elevados niveles de NAA. Sirven de controles ratones genosuprimidos para ASPA heterocigóticos, que no tienen un fenotipo manifiesto al nacer.

10 **Ejemplo 3: Eficacia terapéutica y evaluación de la seguridad de un vector de AAV para tratar la EC**

El modelo de ratón de EC es una cepa KO (forma siglada de *knock-out*, genosuprimidos) para el gen ASPA derivada de C57BL/6. Los animales KO homocigóticos presentan defectos bioquímicos y neurológicos similares a los observados en pacientes con EC. Los ratones EC proporcionan un modelo animal para evaluar la terapia génica y otros tratamientos para el tratamiento de la EC. Los ratones EC se usan para estudiar la eficacia y seguridad de las estrategias novedosas de terapia génica para el tratamiento de la EC.

20 *Diseño del experimento*

Para examinar la eficacia terapéutica y la seguridad, se investigan vectores de scAAV (AAV autocomplementario) (por ejemplo, AAV7, AAV8, CSp3 y AAV9) que portan un casete de expresión de ASPA optimizado en un ensayo preclínico de terapia génica de EC. Los vectores incluyen sitios(s) de unión de miARN para inhibir la expresión de ASPA en tejidos que no son del SNC. Se tratan tanto animales postnatales de 1 día como adultos de 3 meses de edad con cada vector, a dos dosis, 1 y 3 x 10¹⁴ CG/kg por administración intravenosa. Para los ratones EC neonatales, dos camadas de animales reciben cada vector a cada dosis a través de inyecciones en la vena temporal, para la necropsia de una camada cada una en los momentos de tiempo de 1 y 3 meses. Para los ratones EC adultos de 3 meses de edad, se tratan 12 animales macho con cada vector a cada dosis a través de inyecciones en las venas de la cola. Seis de los animales tratados se sometieron a necropsia 1 y 3 meses más tarde. En 30 experimentos adicionales, tanto los animales postnatales de 1 día como los adultos de 3 meses de edad se tratan con vectores a una dosis en un intervalo de 10¹¹ a 10¹² CG/sujeto por administración intraventricular directa.

Mediciones funcionales y neurológicas durante la fase en vivo del estudio

35 1). Metabolismo de NAA. Se recogen muestras de orina de los animales tratados, de control no tratados y de tipo silvestre en los días 14, 30, 45, 60, 75 y 90. Las muestras se analizan por HPLC para determinar los niveles de NAA.

2). Acumulación de NAA y retención de agua inducida por NAA en el cerebro. Se realizan estudios de obtención de imágenes neurológicas basadas en RSM/ERM en los animales vivos en todos los grupos de estudio 1, 2 y 3 40 meses después del tratamiento con vector para medir integrales de los picos espectrales para creatina/fosfocreatina y NAA, así como áreas hiperintensas anormales en el cerebro.

3). Pruebas de la función hepática. Se recogen muestras de suero de los animales en todos los grupos de estudio en los días 14, 30, 60 y 90 para medir los niveles de alanina transaminasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) como indicadores de la toxicidad hepática relacionada con el vector.

45 4). Pruebas neurológicas. Temblores, caminar con las patas separadas a un ritmo lento y tembloroso, y la ataxia están entre las características neurológicas destacadas de los ratones EC. 1, 2 y 3 meses después del tratamiento de terapia génica, los animales en todos los grupos de estudio se someten a un análisis de patrones de marcha por tinción de sus patas con tinta de color y después se registran sus patrones de marcha como huellas dactilares sobre papel blanco. Los animales también se prueban y se puntuán en una prueba de barra giratoria en cuanto a su capacidad para mantener el equilibrio.

50 *Análisis enzimáticos e histopatológicos en la conclusión del estudio*

55 1). Actividades de ASPA en el cerebro y tejidos que no son del SNC. Se analizan la expresión de ASPA específica e inespecífica recogiendo tejidos de cerebro, hígado, corazón y pancreáticos en el momento de la necropsia para medir las actividades de ASPA en los homogeneizados de tejido respectivos.

2). Materia blanca del cerebro y patologías hepáticas. Para examinar la posible mejora en la patología de la materia blanca del cerebro y la toxicidad hepática relacionada con el vector resultante de la terapia génica, se 60 recogen tejidos de cerebro e hígado y se fijan, se incluyen en parafina y se cortan, y se tiñen con hematoxilina y eosina. Un patólogo realiza el examen histopatológico.

Ejemplo 4: Suministro de genes terapéuticos a las células del SNC mediante AA Vrh.10

65 Se desarrolló un cribado de diferentes serotipos de AAV para identificar candidatos para una transferencia génica terapéutica al SNC. Se construyó un vector de AAV recombinante que expresaba EGFP. El vector de rAAV se empaquetó en cuatro AAV diferentes: AAV1, 8, 9 y 10. Se inyectaron ratones adultos con los AAV en el LCR en

posición lumbar. AAV1, 8 y 9 transdijeron células solo en la proximidad del sitio de inyección en la región lumbar de la médula espinal después de la administración de $\sim 4,8 \times 10^{10}$ partículas. Sorprendentemente, AAVrh.10 transdujo células en la materia gris a lo largo de toda la médula espinal y el tronco encefálico después del mismo protocolo de inyección y dosificación que AAV1, AAV8 y AAV9 (Fig. 4A). Recientemente, se ha demostrado que AAV9 cruza la barrera hematoencefálica (BHE) y transduce células de la médula espinal después de la inyección intravenosa. Se observó una señal débil en el cerebro y señales fuertes en el tronco encefálico y la médula espinal. También se observó una señal débil (similar al cerebro) en el prosencéfalo. Sin desear ceñirse a teoría alguna, se cree que el flujo y difusión de LCR permite que el virus se disemine a lo largo de toda la médula espinal, pero que la capacidad de un virus para fluir y esparcirse depende de la estructura de la cápside vírica. Los tipos celulares transducidos incluyen neuronas y oligodendrocitos. Pero la mayoría parecen ser astrocitos (Fig. 4B), como se indica por el solapamiento de la EGFP con células positivas para GFAP. No se observó solapamiento sustancial con el marcador de la microglía, Iba-1. Se transdijeron varias neuronas motoras como se indica por el solapamiento de la expresión de EGFP y la tinción de NeuN. Fue sorprendente que entre los astrocitos, solo los situados en la materia gris se transdijeran y que los que estaban situados en la materia blanca y debajo de la piamadre no se transdijeran. Esto fue llamativo debido a que es probable que el virus esté expuesto a astrocitos en esas áreas ya que se administró en el espacio subaracnoidal.

Ejemplo 5: Construcción de un vector AAVrh. 10 recombinante para tratar la ELA

Se desarrolló un sistema de AAV recombinante como tratamiento para la ELA. Se construyó un vector rAAVrh.10 que expresaba un microARN que se dirige a SOD1 (Figura 5A). Este microARN se identificó como miR-SOD1. La construcción empleó CAG (promotor de β-actina de pollo con potenciador del CMV) para dirigir la expresión de EGFP y de miR-SOD1 que se localizó en un intrón en la 3'-UTR.

Se evaluó la potencia de silenciamiento de 9 construcciones de miARN. Las construcciones se transfecaron en células HEK293. Después de 48 horas, se aisló ARN y se llevó a cabo transferencia de Northern para detectar ARNm de SOD1 (Figura 5B). miR-SOD1#5 (SEQ ID NO: 26) silenció la expresión de SOD1 de la forma más potente. A continuación, miR-SOD1#5 se empaquetó en AAVrh.10 (Figura 5D), que se usó para infectar células HEK293. Se extrajo proteína celular total 43 horas después de la infección y se transfirió para detectar SOD1 (Figura 5C). Se observó inhibición de la expresión de SOD1 al nivel de proteína.

Ejemplo 6: Suministro de genes terapéuticos a las células del SNC para tratar la ELA

Se produjeron grandes lotes de AAVrh.10-miR-SOD1 y AAVrh.10-miR-Scr (miARN desordenado) usando técnicas convencionales. Se preparó AAV auto-complementario (scAAV) debido a que media en la transducción con mayor eficiencia que el AAV monocatenario convencional [14]. Se probó scAAVrh.10 y se encontró que expresaba EGFP más rápidamente (en el plazo de 1 semana) y de forma más fuerte que un AAV monocatenario.

Se administró AAVrh.10-miR-SOD1 a un grupo de ratones G93A (que expresan SOD1 de forma elevada) y AAVrh.10-miR-Scr a otro grupo de ratones G93A (n=15). Se inyectó AAVrh.10 por vía intratecal en el LCR en el área lumbar y se inyectó por vía intraventricular en el prosencéfalo en ratones de 60 días de edad ($\sim 4,8 \times 10^{10}$ partículas en 8 ul).

Se dejó que los animales vivieran su esperanza de vida natural antes de sucumbir a la ELA. La esperanza de vida se comparó entre los dos grupos. Se encontró que los ratones que recibieron el virus AAVrh.10-miR-SOD1, que expresa SOD1miR5 (SEQ ID NO: 26), vivieron en promedio 135 días (± 14 días), mientras que los ratones que recibieron AAVrh.10-miR-Scr, que expresa un miARN desordenado (SEQ ID NO: 31), vivieron en promedio 122 días (± 6 días) (Figura 6B). Además, examinando el grado de la expresión de EGFP en tejido de médula espinal cervical, torácica y lumbar, se observó una correlación en los niveles de expresión en estos tejidos, particularmente con tejido cervical, y la esperanza de vida en los ratones tratados con AAVrh.10-miR-SOD1 (Figura 7A), pero no en ratones tratados con AAVrh.10-miR-Scr (Figura 7B). Estos resultados sugieren que silenciar la expresión de SOD1 mutante en la médula espinal cervical es particularmente beneficioso para prolongar la supervivencia. Se perfundió un subconjunto de los animales de cada grupo con fijador, se cortaron y se tiñeron para SOD1 en la médula espinal. Se detectó SOD1 usando técnicas convencionales [9]. La intensidad de tinción de SOD1 estaba reducida en células que expresaban EGFP en comparación con las células que no expresaban EGFP que se transducen con AAVrh.10-miR-SOD1 (Figura 6A, que muestra atenuación de la expresión de SOD1 en astrocitos). No se observó reducción de la expresión de SOD1 en células transducidas con AAVrh.10-miR-Scr.

Se diseccionaron tejidos de otro subconjunto de animales en ambos grupos para estimar los niveles de transducción. Los niveles de transducción se estimaron determinando el contenido de genoma vírico usando PCR en muestras de ADN obtenidas de diferentes regiones del SNC y que no son del SNC. Las mediciones en tejidos que no son del SNC (por ejemplo, hígado) proporcionaron una indicación de si virus se había filtrado a la periferia. Se realizaron análisis de Northern y de Western para medir los niveles de SOD1 en la médula espinal. El anticuerpo usado para la detección de SOD1 fue anti-SOD1 humana polyclonal, de oveja, por Biodesign International, N.º de catálogo K90077C.

Ejemplo 7: Protocolo de administración combinada intratecal / intraventricular

Se inyectaron virus AAV en el LCR del ratón por inyección intratecal lumbar y/o inyección en el tercer ventrículo del cerebro. La inyección en el espacio subaracnideo lumbar de los ratones se llevó a cabo usando un método modificado de Wu *et al.* [22]. Se preparó un catéter delgado (aproximadamente 5 cm) estirando tubo de PE10 hasta el diámetro interno de 0,12 mm. La sección estirada se cortó a 1,7 a 1,9 mm, y se hicieron dos perlas (separadas 1 mm) entre las secciones fina y gruesa calentando y presionando el tubo. Para implantar el catéter, el ratón se anestesió por inyección de avertina (2,2,2-tribromoetanol al 1,2 % en alcohol terc-amílico al 2 % y PBS) por vía intraperitoneal a 0,23 ml/10 g de peso corporal [23]. El catéter se implantó entonces entre las vértebras L5 y L6. El catéter se suturó en el músculo superficial en el área con perlas. Se inyectaron los virus a una dosis de 4,80E+10 copias de genoma (para el cribado de virus, en 6 ul) a 2,40E+10 copias de genoma (para terapia, en 8 ul) mediante el catéter por una jeringa Hamilton a una velocidad de 2 ul/minuto. El catéter se selló en el extremo por calor y se dejó en ese sitio durante un día. Se cerró la herida mediante grapas. La inyección en el tercer ventrículo del cerebro se llevó a cabo usando un instrumento estereotáxico Stoelting y bombas de micro-inyección de World Precision Instruments después del procedimiento estereotáxico habitual. Se inyectó la misma dosis de virus en el tercer ventrículo a una velocidad de 1 ul/minuto.

A continuación, se muestran las dosis estimadas para seres humanos y monos, y la comparación con inyección i.v. Los dos tipos de mono son de tamaño similar.

20

Tabla 2 - Dosis estimadas para seres humanos y monos

| Especie | promed. de ml de LCR | Velocidad de producción de LCR estimada ml/hora | Dosis estimada (CG) | partículas/g de peso corporal |
|--|--|--|------------------------|----------------------------------|
| ratón | 0,035 | 0,018 | 2,40E+10 | 1,2E+09 |
| ser humano | 140 | 21 | 9,6E+13 | 1,3E+09 |
| <i>Macaca mulatta</i> (monos rhesus) | 14 | 2,5 | 9,6E+12 | 1,7E+09 |
| <i>Macaca fascicularis</i> (macaco cinomolgo) | Véase Foust KD, <i>et al.</i> , Nature Biotechnology, Volumen 28, Número 3, marzo de 2010, 271-274 | | 1,00E+14 | 2,20E+11 |

Referencias para los antecedentes y Ejemplos 1-7

1. Daya S, Berns KI: Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. Clin Microbiol Rev 2008, 21:583-593.
2. Eberling JL, Jagust WJ, Christine CW, Starr P, Larson P, Bankiewicz KS, Aminoff MJ: Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. Neurology 2008, 70:1980-1983.
3. Feigin A, Kaplitt MG, Tang C, Lin T, Mattis P, Dhawan V, During MJ, Eidelberg D: Modulation of metabolic brain networks after subthalamic gene therapy for Parkinson's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences 2007, 104:19559-19564.
4. Cideciyan AV, Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Schwartz SB, Boye SL, Windsor EAM, Conlon TJ, Sumaroka A, Pang J-j, *et al.*: Human RPE65 Gene Therapy for Leber Congenital Amaurosis: Persistence of Early Visual Improvements and Safety at 1 Year. Hum Gen Ther, 0.
5. Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun J-C, Guillot S, Haase G, Szulc J, Henderson CE, Aebischer P: Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. Nat Med 2005, 11:423-428.
6. Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH: Retrograde Viral Delivery of IGF-1 Prolongs Survival in a Mouse ALS Model. Science 2003, 301:839-842.
7. Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND: vEgF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. Nature 2004, 429:413-417.
8. Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DCP, Wong L-F, Bilsland LG, Greensmith L, Kingsman SM, *et al.*: Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. Nat Med 2005, 11:429-433.
9. Wu R, Wang H, Xia X, Zhou H, Liu C, Castro M, Xu Z: Nerve Injection of Viral Vectors Efficiently Transfers Transgenes into Motor Neurons and Delivers RNAi Therapy Against ALS. Antioxidants & Redox Signaling 2009, 11:1523-1534.
10. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK: Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. Nat Biotechnol 2009, 27:59-65.
11. Duque S, Joussemet B, Riviere C, Marais T, Dubreuil L, Douar AM, Fyfe J, Moullier P, Colle MA, Barkats M: Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. Mol Ther 2009, 17:1187-1196.
12. Vandenberghe LH, Wilson JM, Gao G: Tailoring the AAV vector capsid for gene therapy. Gene Ther 2009, 16:311-319.
13. McBride JL, Boudreau RL, Harper SQ, Staber PD, Monteys AM, Martins I, Gilmore BL, Burstein H, Peluso

- RW, Polisky B, et al.: Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: Implications for the therapeutic development of RNAi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008, 105:5868- 5873.
- 5 14. McCarty DM: Self-complementary AAV Vectors; Advances and Applications. *Mol Ther* 2008, 16:1648- 1656.
15. Boilée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Koliou G, Cleveland DW: Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006, 312:1389- 1392.
- 10 16. Xia X, Zhou H, Huang Y, Xu Z: Allele-specific RNAi selectively silences mutant SOD1 and achieves significant therapeutic benefit *in vivo*. *Neurobiol Dis* 2006, 23:578-586.
- 15 17. Yamanaka K, Chun SJ, Boilée S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW: Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2008, 11:251253.
- 20 18. Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K: Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 2007, 10:608-614.
- 15 19. Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S: Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 2007, 10:615-622.
- 20 20. Wang Y, Ou Mao X, Xie L, Banwait S, Marti HH, Greenberg DA, Jin K: Vascular Endothelial Growth Factor Overexpression Delays Neurodegeneration and Prolongs Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice. *J Neurosci* 2007, 27:304-307.
- 25 21. Storkebaum E, Lambrechts D, Deweerchin M, Moreno-Murciano MP, Appelmans S, Oh H, Van Damme P, Rutten B, Man WY, De Mol M, et al.: Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci* 2005, 8:85-92.
22. Wu, W. P., Xu, X. J. y Hao, J. X. (2004) *J. Neurosci. Methods* 133, 65-69
23. Papaioannou, V. E. y Fox, J. G. (1993) *Lab. Anim. Sci.* 43, 189-192

25 **Ejemplo 8. rAAV9 administrado por vía sistémica regulado por micro-ARN Introducción al ejemplo**

Este ejemplo implica el uso de microARN (miARN) endógenos específicos de tejido para reprimir la expresión de rAAV fuera del SNC, manipulando sitios de unión de miARN perfectamente complementarios en el genoma de rAAV9. El ejemplo describe virus adeno-asociados recombinantes (rAAV) que pueden cruzar la barrera hematoencefálica y lograr una transferencia génica transvascular eficiente y estable al sistema nervioso central (SNC), mientras que desdirecciónan determinados otros tejidos (por ejemplo, hígado, corazón, músculo esquelético y otros tejidos). Los enfoques descritos en este ejemplo permitieron la regulación simultánea de múltiples tejidos y la expresión transgénica estable dirigida al SNC sin perturbar de forma detectable la ruta de miARN endógena. La regulación de la expresión del rAAV por miARN fue principalmente a través de escisión específica de sitio del ARNm del transgén, generando fragmentos específicos de ARNm 5' y 3'.

La transferencia génica mediada por virus recombinante adeno-asociado (rAAV), como se divulga en el presente documento, es útil para el tratamiento de un gran número de trastornos neurológicos. Se ha encontrado que los vectores de rAAV divulgados en el presente documento cruzan la barrera hematoencefálica y se expresan específicamente en el SNC. Así, los vectores pueden usarse para el suministro intravascular de rAAV para la terapia génica de enfermedades del SNC, incluyendo las que afectan a grandes áreas del cerebro y la médula espinal.

Este ejemplo describe el uso de microARN (miARN) endógenos para suprimir la expresión transgénica fuera del SNC. Los miARN son ARN no codificantes pequeños que regulan la expresión génica por silenciamiento postranscripcional. En general, los miARN pueden silenciar a los genes por dos mecanismos. Cuando son parcialmente complementarios a secuencias de ARNm, normalmente reducen la estabilidad del ARNm diana y la expresión de proteína (por ejemplo, en dos a cuatro veces. o menos), un modo de regulación que se cree que ajusta la expresión de ARNm. Por lo contrario, cuando los miARN son casi perfectamente complementarios a sus dianas de ARNm, normalmente efectúan la escisión del ARNm, desencadenando su destrucción total.

50 En particular, este ejemplo describe el uso de miARN para desdirecciónar la expresión de rAAV9 tanto por separado como de forma simultánea en el hígado, corazón y músculo esquelético, los tres tejidos que son los más eficazmente elegidos como diana por rAAV9 suministrado por vía intravenosa. El silenciamiento de la expresión transgénica en hígado, corazón y músculo aprovechó la expresión natural de los abundantes miARN (>60.000 copias/célula), miR-122, que se expresan en hepatocitos, y miR-1, un miARN encontrado en el corazón y músculo esquelético de prácticamente todos los animales. Se han usado satisfactoriamente sitios de unión de miR-122 para prevenir la hepatotoxicidad de un transgén de un vector de adenovirus. Se manipularon sitios perfectamente complementarios para miR-1, miR-122 o ambos, en la región no traducida 3' (UTR) de un transgén indicador de β-galactosidasa (*nLacZ*) dirigida al núcleo cuya expresión se dirigió mediante un potenciador del citomegalovirus, el promotor de β-actina de pollo (CB). Este ejemplo presenta múltiples resultados independientes que indican que los miARN reprimen la expresión de *nLacZ* escindiendo el ARNm del transgén en exactamente el mismo sitio que por todos los ARN pequeños unidos a Argonaute en células eucariotas. Cuando se administra por vía sistémica *in vivo*, el vector de rAAV9 desdireccinado por miARN expresó satisfactoriamente el transgén indicador en el SNC, pero no en el hígado o corazón, o músculo esquelético.

65

Resultados

Los miARN reprimen eficientemente la expresión del gen indicador en células cultivadas

- 5 Para evaluar una estrategia para la transducción mediada por rAAV, se introdujeron una o tres copias en tandem de un sitio de unión perfectamente complementario para miR-1 o miR-122 en la 3' UTR de *nLacZ* en un vector plasmídico de rAAV. Las construcciones se transfecaron en células HuH7, una línea celular de hepatoma humano que expresa ~16.000 copias de miR-122 por célula, y se midió el número de células positivas para *nLacZ*. El número de células HuH7 que expresan *nLacZ* para el plásmido de un sitio fue aproximadamente la mitad de las del control sin sitio; tres sitios redujeron el número de células que expresaban *nLacZ* más de siete veces (Figura 12a).
- 10 A continuación, se analizó la expresión de las construcciones de *nLacZ* en células de riñón embrionario humano 293, que expresan de forma natural bajos niveles de tanto miR-122 como miR-1, cuando miR-1 o miR-122 se introdujo como pri-miARN de un segundo plásmido. Se transfecaron células 293 con los plásmidos indicadores de *nLacZ* que portaban 0, 1 o 3 sitios de unión de miR-122 o de miR-1, junto con un plásmido que expresaba tanto pri-miR-122 (Figura 12b) como pri-miR-1 (Figura 12c). Para variar la concentración del miARN, se usó una relación molar baja (1:3) o una alta (1:10) del plásmido del sitio de unión de *nLacZ* con respecto al plásmido de expresión de miARN. Cuando se introdujo miR-122 o miR-1 en las células, la expresión de *nLacZ* se reprimió solo cuando el ARNm del indicador *nLacZ* contenía los sitios de unión de miARN correspondientes; no hubo reducción de células positivas para *nLacZ* cuando miR-1 se coexpresó con *nLacZ* que contenía sitios de unión de miR-122 o cuando miR-122 se coexpresó con *nLacZ* que contenía sitios de unión de miR-1 (Figura 12b,c).
- 15
- 20

Los miARN endógenos específicos de tejido regulan la expresión de rAAV9 suministrado por vía sistémica en ratones adultos

- 25 Para evaluar la regulación por miARN de vectores de AAV9CBnLacZ suministrados por vía sistémica *in vivo*, se produjeron vectores de AAV9CBnLacZ que portaban 0, 1 o 3 sitios de unión de miARN perfectamente complementarios a miR-122 o miR-1. Los vectores se administraron por inyección en la vena de la cola a ratones C56BL/6 macho adultos a una dosis de 5×10^{13} copias de genoma por kg (CG/kg) de peso corporal. Cuatro semanas más tarde, se examinaron el hígado y el corazón de los animales transducidos. La tinción de LacZ reveló que el transgén *nLacZ* se silenció mediante los miARN endógenos en el tipo celular y órgano en el que se expresaron predominantemente: el transgén se silenció específicamente por miR-122 en el hígado y por miR-1 en el corazón (Figura 13a,b). Mientras que las células positivas para *nLacZ* se redujeron en los hígados de los animales tratados con rAAV9CBnLacZ que portaban uno o tres sitios de unión de miR-122, los niveles de expresión de *nLacZ* en los corazones de los mismos animales fueron similares a los de los animales tratados con AAV9CBnLacZ que no portaban sitios (Figura 13a). De forma similar, no se detectó expresión de *nLacZ* en los corazones de los animales que recibieron AAV9CBnLacZ que contenía uno o tres sitios de unión de miR-1, pero no estaba afectada la expresión de *nLacZ* en los hígados de los mismos animales en comparación con la del animal de control (Figura 13b). Estos datos sugieren que cuanto mayor es el número de sitios para un miARN en el rAAV, menor es la expresión de *nLacZ* en el tejido donde se expresó el miARN correspondiente (Figura 13a,b).
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50

La represión por miARN de la expresión de rAAV no perturba las rutas de miARN endógeno

- 55 Se ha informado que transgenes altamente expresados que portan sitios complementarios a miARN estimulan la degradación del miARN correspondiente. Se determinaron los niveles de miR-122, miR-22, miR-26a y *let-7* en hígado transducido con rAAV. No se detectó diferencia en la abundancia de los cuatro miARN entre los tres grupos de estudio (Figura 14a). Además, datos de análisis de secuenciación de alto rendimiento de ARN pequeño de los hígados de un animal de cada uno de los tres grupos de estudio no muestran cambio en los niveles de miARN.
- 60
- 65 Para determinar si los sitios de unión de miARN en los transcriptos de transgenes desregularían la expresión de los ARNm diana endógenos conocidos de miR-122 o miR-1, se analizaron la expresión de ciclina G1, una diana de miR-122 en el hígado (Figura 14b,c) y calmodulina, una diana de miR-1 en el corazón (Figura 14d). No se detectó alteración significativa en la expresión de ciclina G1 o calmodulina. miR-122 regula la biosíntesis del colesterol en el hígado, y los agentes que bloquean la función de miR-122 pueden producir cambios fácilmente detectables en los niveles de colesterol en suero. No se detectó cambio en los niveles de colesterol total, lipoproteína de alta densidad

o lipoproteína de baja densidad en los ratones 4 semanas después de la transducción con tanto rAAV9 de control como rAAV9 que expresaba un transgén que portaba sitios de unión de miR-122 (Figura 14e). Se concluyó que en este ejemplo el desdirecciónamiento mediado por miARN de la expresión del rAAV no tuvo efecto detectable sobre la expresión o función de miARN endógeno.

- 5 *Los miARN endógenos silencian la transducción de rAAV por escisión específica de sitio del ARNm del transgén*
- Para determinar cómo los miARN suprimen la expresión de transgenes suministrados por rAAV *in vivo*, se caracterizó el ARNm del transgén en hígado por PCR convencional (Figura 15b), PCR con transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR) (Figura 15c), hibridación de Northern (Figura 15d,e) y amplificación rápida de extremos 5' de ADN complementario (ADNc) (5' RACE; Figura 15f). Cuando se usaron cebadores que amplificaban la región entre el extremo 3' de *nLacZ* (cebador A⁺F) y el extremo 5' de la señal de poli(A) (cebador A⁺R), se detectó un amplicón que abarcaba los sitios de unión de miARN, un producto de 145 pares de bases (pb), después de 26 ciclos de amplificación para las muestras que recibieron rAAV de control. Se precisaron seis ciclos de amplificación adicionales para detectar una débil banda de 220 pb para las muestras transducidas por rAAV que contenía tres sitios de unión de miR-122. Estos datos concuerdan con los bajos niveles de ARNm intacto de *nLacZ* (Figura 15a,b).

- 10 20 25 Para evaluar cuantitativamente el grado de la represión dirigida por miARN de los transcriptos de transgenes, se realizó qRT-PCR usando oligo(dT) o cebadores hexaméricos al azar para la transcripción inversa y parejas de cebadores de PCR que abarcaban tanto una región 5' (*nLacZ*5'F/5'R) como 3' (*nLacZ* 3'F13'R) de la secuencia codificante de *nLacZ* (Figura 15a). Se examinaron los niveles de ARNm de *nLacZ* con extremos 5' y 3' intactos en ARN total de hígado extraído de cuatro animales que recibieron el rAAV9CBnLacZ de control y cuatro que recibieron rAAV9CBnLacZ que contenía tres sitios de unión de miR-122 en la 3' UTR. Se observaron reducciones que variaban de 3 ± 1 (hexámero al azar) a 7 ± 1 (oligo[dT]) veces en el ARNm de *nLacZ* con un extremo 3' intacto en los animales que habían recibido rAAV9 que contenía sitios de unión de miR-122, con respecto al control. Por lo contrario, se detectó poca o ninguna disminución en el ARNm de *nLacZ* con un extremo 5' intacto para las mismas muestras usando la pareja de cebadores 5'F/5'R (Figura 15c). Estos resultados indican que el modo principal de renovación del ARNm que se ha escindido por un miARN era la degradación exonucleolítica de 3' a 5'.
- 30 35 Para caracterizar adicionalmente el destino del ARNm del transgén direccionado por miR-1 o miR-122, se realizaron análisis por transferencia de Northern. Una sonda de transgén que se une al extremo 5' del ARNm de *nLacZ* detectó un ARN de ~3,4 kb en un animal al que se le inyectó rAAV9CBnLacZ de control, el tamaño esperado del transcripto de *nLacZ* de longitud completa; se detectó una banda ligeramente más grande en la muestra de hígado de un ratón tratado con rAAV9CBnLacZ que portaba tres sitios de unión de miR-1 (Figura 15a,d). A diferencia del único transcripto detectado para el rAAV9 que expresa *nLacZ* que porta tres sitios de unión de miR-1, se detectaron dos ARN de diferentes tamaños para el rAAV que expresa *nLacZ* que porta tres sitios de miR-122 (Figura 15d).

- 40 Las longitudes de estos transcriptos indican que el transcripto más largo probablemente representa el ARNm de longitud completa, mientras que el transcripto más corto más abundante se corresponde con fragmentos 5' de ARN de *nLacZ* escindido por miR-122 en los sitios de unión de miR-122 correspondientes en la 3' UTR (Figura 15d).

- 45 50 55 60 Para confirmar esta observación, se repitió el análisis de Northern usando una sonda de ARN que abarcaba una porción de la 3' UTR del ARNm del transgén. Además de detectar transcriptos de *nLacZ* de longitud completa en las muestras transducidas por rAAV9 que carecían de sitios de unión de miARN, se detectaron dos especies que migraban próximas más pequeñas que el marcador de ARN de 281 nucleótidos. El tamaño de estos fragmentos concordaba con los productos de escisión de 3' dirigidos por miARN del ARNm de *nLacZ* (Figura 15e). Estos dos productos de escisión de 3' también se detectaron por electroforesis en gel del producto del experimento de 5' RACE descrito más adelante (Figura 15f).
- Para determinar si tal escisión de la diana se produce *in vivo* cuando el transcripto de *nLacZ* contiene los sitios de unión de miR-1 o de miR-122, se realizó amplificación rápida de extremos 5' de ADNc (5' RACE). La Figura 16 presenta las secuencias de 21 clones recuperados usando 5' RACE de ARN de hígado (Figura 16a) y 22 clones aislados de ARN de corazón (Figura 16b) de los animales a los que se les inyectó rAAV9 en el que la 3' UTR de *nLacZ* contenía tres sitios de unión de miR-1 y tres de miR-122. En hígado, se detectaron los distintivos de secuencia para la escisión dirigida por miR-122 del ARNm del transgén en cada sitio de unión de miR-122: el 5 % para el primer sitio de unión, 48 % para el segundo sitio de unión y 43 % para el tercer sitio de unión. Todos los extremos 5' mapearon en el fosfato que se encuentra entre los nucleótidos diana que se emparejan con las posiciones 10 y 11 de la secuencia perfectamente complementaria a miR-122, el sitio preciso escindido por los ARN pequeños unidos a proteínas Argonaute en todos los eucariotas (Figura 17a). Se obtuvieron resultados similares en el corazón para los sitios de miR-1 (Figura 17b).

- 65 La Tabla 3 presenta un análisis de 5' RACE ampliado para grupos de vectores adicionales. Se observó que ninguno de los productos de 5' RACE secuenciados se correspondió con la escisión específica de sitio dirigida por miR-1 en hígado o la escisión específica de sitio dirigida por miR-122 en corazón (Tabla 3). Aunque no se detectó escisión dentro de los sitios de unión de miR-1 en el hígado, algunos clones del corazón se escindieron dentro de los sitios de unión de miR-122, pero no en la posición distinta para la escisión dirigida por miARN.

rAAV9 suministrado por vía intravascular puede ser eficientemente controlado por miARN endógenos

5 Se añadieron sitios de unión de miARN-1 y miARN-122 en el genoma del vector de GFP potenciado (EGFP) de scAAV9CB y se inyectaron 2×10^{14} CG/kg en ratones macho C57BL/6 de 10 semanas de edad. Después de 3 semanas, se prepararon cortes de 40 µm de cerebro y médula espinal y cortes de 8 µm de hígado, corazón y músculo esquelético, y se examinaron en cuanto a la expresión de proteína EGFP. Se encontró que scAAV9CBEGFP suministrado por vía intravenosa transdujo eficientemente el SNC; EGFP fue fácilmente detectable en la región del tálamo del cerebro y la región cervical de la médula espinal, pero también en tejidos que no son del SNC tales como hígado, corazón y músculo (Figura 17a). Por lo contrario, la expresión transgénica en los tejidos que no son del SNC se redujo cuando los sitios de unión de miR-1 y de miR122 se incluyeron en el transgén; la expresión de EGFP no se alteró en el SNC, donde miR-1 y miR-122 no estaban presentes (Figura 17a). Se usó RT-PCR cuantitativa para medir la expresión diferencial del transgén de EGFP reprimido en miARN en cerebro ($41,2 \pm 7,7\%$), hígado ($3,0 \pm 0,5\%$), corazón ($0,4 \pm 0,1\%$) y músculo ($1,3 \pm 0,4\%$), con respecto al transgén de EGFP que carecía de sitios de unión de miARN (Figura 17b). Para eliminar cambios asociados a la eficiencia de transducción entre experimentos, los datos se normalizaron con respecto al número de genomas de vector detectados en las muestras experimentales y de control. De forma similar a los análisis microscópicos de la expresión de EGFP nativa, los datos de qRT-PCR muestran que la presencia de sitios de unión de miR-122 o de miR-1 redujeron la expresión transgénica en el hígado (20 veces), corazón (100 veces) y músculo (50 veces), pero no alteraron de forma detectable la expresión transgénica en cerebro.

Discusión de resultados

25 Este ejemplo muestra que rAAV9 puede manipularse de manera que los miARN endógenos repriman la expresión transgénica fuera del SNC. Los resultados indican que tales rAAV9 manipulados pueden usarse en terapias para la degeneración de neuronas asociadas a la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica, expresando factores de crecimiento neurotróficos tales como el factor insulínico de crecimiento, factor de crecimiento derivado del cerebro o factor neurotrófico derivado de los neurogliocitos en los astrocitos transducidos. Este enfoque elimina o reduce la expresión que no es del SNC procedente de los tejidos periféricos transducidos por rAAV9 suministrado por vía sistémica.

35 El lograr la expresión transgénica principalmente solo en los tejidos diana es una consideración para el desarrollo clínico del suministro seguro de genes al SNC. Los resultados en este ejemplo indican que los miARN endógenos pueden aprovecharse para limitar la especificidad de tipo tisular y/o celular de la expresión de rAAV, como se demostró inicialmente para los vectores lentivíricos. Los datos demuestran que los miARN endógenos pueden reprimir eficazmente la expresión transgénica de un rAAV. Tanto en corazón como en hígado, los miARN reprimieron la expresión transgénica dirigiendo la escisión endonucleolítica del ARNm del transgén (Figura 18). La regulación por miARN de la expresión del rAAV no perturbó la expresión o función del miARN endógeno correspondiente, permitiendo que la expresión transgénica se limitara al SNC en ratones. El ejemplo indica que una estrategia que combina múltiples sitios de unión para los miARN expresados en la periferia, pero no el SNC, es útil para el desarrollo de vectores para terapia génica específicos para el SNC más seguros.

Materiales y métodos

45 *Diseño, construcción y producción de vectores.* Se diseñaron sitios de unión de miARN perfectamente complementarios basándose en las secuencias de miR-1 y miR-122 glosadas en miRBase y se insertaron en el sitio de restricción *BstBI* en la 3' UTR del casete de expresión de nLacZ del plásmido de β-galactosidasa direcciónada al núcleo (nLacZ) de pAAVCB ubicuamente expresado usando oligonucleótidos sintéticos (Figura 15a y Tabla 3). Este vector usa un casete híbrido de potenciador del citomegalovirus/promotor de CB que es activo en la mayoría de las células y tejidos. Para expresar miR-122 y miR-1, se amplificaron por PCR fragmentos de pri-miR-122 y pri-miR-1 a partir de ADN genómico de ratón C57/B6 (Tabla 4) y se insertaron en el sitio de restricción XbaI 3' con respecto a un ADNc de luciferasa de luciérnaga del plásmido pAAVCBELuc. La identidad de cada pri-miARN se verificó por secuenciación. Los vectores de AAV9 usados en este estudio se generaron, purificaron y titilaron.

55 *Cultivo celular y transfección.* Se cultivaron células HEK-293 y HuH7 en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero bovino fetal al 10 % y penicilina-estreptomicina (Hyclone, South Logan, UT) 100 mg/l. Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37 °C y CO₂ al 5 %. Los plásmidos se transfecaron transitoriamente usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

60 *Estudios en ratón.* Se adquirieron y se mantuvieron ratones C57BL/6 macho (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Para controlar los perfiles de lípidos de los animales del estudio, se recogieron muestras de suero 4 semanas después de la inyección de rAAV9 y se analizaron en cuanto al colesterol total, lipoproteína de alta densidad y lipoproteína de baja densidad en un analizador COBAS C 111 (Roche Diagnostics, Lewes, RU). Para evaluar la transferencia génica de EGFP limitada al SNC mediada por miARN endógeno, ratones C57BL/6 macho de 10 semanas de edad se inyectaron por vía intravenosa (vena de la cola) con AAV9CBnLacZ-[sitio de unión de miR-

- 122 (BS)₁]. AAV9CBnLacZ-(miR-122BS)₃. AAV9CBnLacZ-(miR-1BS)₁. AAV9CBnLacZ-(miR-1BS)₃, AAV9CBnLacZ-(miR-1BS)₁-(miR-122BS)₁ y AAV9CBnLacZ-(miR-1BS)₃-(miR-122BS)₃, respectivamente, a 5×10^{13} CG/kg de peso corporal o sAAV9CBEgFP a 2×10^{14} CG/kg de peso corporal). Los animales que recibieron vectores de nLacZ se sometieron a necropsia 4 semanas después; se prepararon criolectomas de 8 μm de tejidos de hígado, corazón y páncreas para tinción histoquímica con X-gal. Los animales que recibieron vectores de EGFP se sometieron a necropsia 3 semanas después y se fijaron por perfusión transcardíaca con paraformaldehído al 4 % (peso/vol). Se recogieron cerebro, médula espinal, hígado, corazón y músculo para criolectoma. Se tiñeron tejidos de cerebro y de médula espinal cervical como cortes flotantes en una placa de 12 pocillos usando anticuerpo anti-EGFP de conejo (Invitrogen) diluido 1:500, seguido de anticuerpo secundario anti-conejo de cabra (Invitrogen) diluido 1:400. Fuera del SNC, la expresión de EGFP se detectó directamente por fluorescencia. Se registró la fluorescencia de EGFP y de anticuerpo usando un microscopio invertido Nikon TE-2000S a un aumento x10 y un tiempo de exposición de 3 segundos para hígado, corazón y músculo, y de 5 segundos para talamo (cerebro) y médula espinal cervical.
- Cuantificación de genomas de vector por qPCR. Se extrajo ADN genómico de los tejidos seleccionados usando el minikit de ADN QIAamp (Qiagen, West Sussex, RU), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se llevaron a cabo PCR cuantitativas por triplicado usando ADN de Ring y cebadores específicos de EGFP (EGFP-F y EGFP-R) 0,3 μmol/l usando la mezcla madre GoTaq qPCR (Promega, Madison, WI) en un instrumento de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA).
- Análisis por qRT-PCR. Se extrajo ARN usando Trizol (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cebó el ARN total (0,5-1,0 μg) con hexámeros al azar u oligo(dT) y se transcribieron de forma inversa con transcriptasa inversa MultiScribe (Applied Biosystems). Se realizaron PCR cuantitativas por triplicado con parejas de cebadores específicos de gen (nLacZ5'F/5'R, nLacZ 3'F/3'R, ciclinaG1F/R y EGFP-F/EGFP-R) 0,3 μmol/l usando la mezcla madre GoTaq qPCR en un dispositivo de PCR en tiempo real StepOne Plus. La especificidad de los productos de qRT-PCR obtenidos de los extremos 5' y 3' del ARNm de nLacZ se confirmó por electroforesis en gel.
- Análisis de transferencia de Northern. Se extrajo ARN total de hígado de ratón y se analizó por hibridación de Northern. Para detectar ARNm de nLacZ, un fragmento de 618 pb de ADNc de nLacZ se aisló por digestión de pAAVCBnLacZ con Ncol y PciI y se marcó con α³²P dCTP por unión al azar (Takara, Shiga, Japón). Para detectar fragmentos de 3' del ARNm de nLacZ escindido, un fragmento de 111 pb de la secuencia de poli(A) del genoma de vector se clonó en pCR4-TOPO (Invitrogen) para la preparación de sonda de ARN antisentido marcada con α³²P CTP durante la transcripción *in vitro* usando el kit Riboprobe System T7 (Promega). Para detectar miR-122, miR-26a, miR-22 y let-7, o U6 en ARN de hígado total, se resolvieron ARN pequeños desnaturizando geles de poliacrilamida al 15 %, se transfirieron a membrana Hybond N+ (Amersham BioSciences, Pittsburgh, PA) y se reticularon con luz a 254 nm (Stratagene, La Jolla, CA). Se usaron oligonucleótidos sintéticos, marcados en el extremo 5' con γ³²P ATP usando polinucleótido quinasa T4 (New England Biolabs, Beverly, MA), como sondas de ADN (Tabla 4) y se hibridaron en tampón Church (NaHPO₄ 0,5 mol/l, pH 7,2, EDTA 1 mmol/l, dodecilsulfato de sodio 7 % (peso/volumen)) a 37 °C. Las membranas se lavaron usando 1 x SSC (cloruro de sodio 150 mM, citrato de sodio 15 mM), tampón de dodecilsulfato de sodio 0,1 % y luego se visualizaron usando FLA-5100 Imager (Fujifilm, Tokio, Japón).
- Análisis por transferencia Western. Se extrajeron las proteínas con tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación [Tris-HCl 25 mmol/l, pH 7,6, NaCl 150 mmol/l, NP-40 al 1 % (vol/vol), desoxicolato de sodio al 1 % (peso/vol), dodecilsulfato de sodio al 0,1 % (peso/volumen)] que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas (Boston PB, Boston, MA). La concentración de proteína se determinó usando el método de Bradford (Bio-Rad, Melville, NY). Se cargaron muestras de proteína, de 50 μg cada una, en geles de poliacrilamida al 12 %, se sometieron a electroforesis y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (Amersham BioSciences). Brevemente, las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) a temperatura ambiente durante 2 horas, seguido de incubación con anti-GAPDH (Millipore, Billerica, MA), anti-ciclina G1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) o anti-calmodulina (Millipore) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS que contenía Tween-20 al 0,1 % (vol/vol), las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con LI-COR IRDye durante 1 hora a temperatura ambiente, y después los anticuerpos se detectaron usando Odyssey Imager (LI-COR).
- Ensayo de β-galactosidasa. Se extrajeron proteínas con tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación y se cuantificaron como se ha descrito anteriormente. Se usaron cincuenta microgramos de proteína para cada ensayo de β-galactosidasa usando el sistema Galacto-Star (Applied Biosystems), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 5' RACE. Se realizó 5' RACE como se ha descrito. Se usaron el cebador Outer de 5' RACE y el cebador específico del gen nLacZ, bGHpolyAR (Tabla 4) para la primera ronda de PCR anidada. Se usaron el cebador Inner de 5' RACE y el cebador específico del gen nLacZ, nLacZpolyR, que se localiza cerca del codón de terminación de ADNc de nLacZ, para la segunda ronda de PCR anidada (Tabla 4). Los productos de PCR se clonaron en TOPO en pCR-4.0 (Invitrogen) y se secuenciaron.
- Análisis estadístico. Todos los resultados se informan como media ± DT y se compararon entre grupos usando la

ES 2 698 203 T3

prueba de la t de Student bilateral.

Tabla 3 Resumen de escisión de ARNm de transgén guiada por microARN en hígado y corazón de ratón

| Escisión de miR BS | Posición | Sitio de escisión | | | | |
|---|----------|-------------------|------------------|------------------|---------------|------|
| | | Entre nt 10 y 11 | Entre nt 17 y 18 | Entre nt 18 y 19 | Sitio al azar | |
| Hígado 1 Copia de miR-122 (21 clones) | 1 | 17/21 | 81 % | ND | ND | 19 % |
| 3 Copias de miR-122 BS (11 clones) | 1 | ND | 100 % | ND | ND | 0 % |
| | 2 | 4/11 | | | | |
| | 3 | 7/11 | | | | |
| 3 Copias de cada uno de miR-1 y miR 122 miR 1 3x BS | 1 | ND | ND | ND | ND | 0 % |
| BS en un único vector (21 clones) | 2 | ND | | | | |
| | 3 | ND | | | | |
| miR-122 3x BS | 1 | 1/21 | 95 % | ND | ND | 5 % |
| | 2 | 10/21 | | | | |
| | 3 | 9/21 | | | | |
| Corazón 1 Copia de miR-1 BS (12 clones) | 1 | 12/12 | 100 % | ND | ND | 0 % |
| 3 Copias de miR 1BS (21 clones) | 1 | ND | 80 % | 4/21 | 20 % | ND |
| | 2 | 16/21 | | ND | | |
| | 3 | 1/21 | | ND | | |
| 3 Copias de cada uno de miR 1 y miR 122 miR-122 3x BS | 1 | ND | ND | ND | 1/22 | 14 % |
| BS en un vector único (22 clones) | 2 | ND | | | 1/22 | |
| | 3 | ND | | | ND | |
| miR 1 3x BS | 1 | 1/22 | 73 % | ND | 9 % | ND |
| | 2 | 7/22 | | 1/22 | | |
| | 3 | 8/22 | | 1/22 | | |

Tabla 4. Cebadores y sondas de oligonucleótidos usados en el Ejemplo 8.

| Oligonucleótidos | Secuencia | SEQ ID NO |
|---|---|---------------|
| (miR-1) ₁ sentido | [PHOS]CGAAATACATACTTCTTACATTCCATT | SEQ ID NO: 32 |
| (miR-1) ₁ antisentido | [PHOS]CGAATGGAATGTAAGAAGTATGTATT | SEQ ID NO: 33 |
| (miR-122) ₁ sentido | [PHOS]CGAAACAAACACCATTGTCACACTCCATT | SEQ ID NO: 34 |
| (miR-133) ₁ antisentido | [PHOS]CGAATGGAGTGTGACAATGGTGTGTTTT | SEQ ID NO: 35 |
| (miR-1) ₃ sentido | [PHOS]CGAAATACATACTTCTTACATTCCAATACAT ACTTCTTACATTCCAATACATACTTCTTACATTCC ATT | SEQ ID NO: 36 |
| (miR-1) ₃ antisentido | [PHOS]CGAATGGAATGTAAGAAGTATGTATTGGAA TGAAAGAAGTATGTATTGGAAATGTAAGAAGTATG TATT | SEQ ID NO: 37 |
| (miR-122) ₃ sentido | [PHOS]CGAAACAAACACCATTGTCACACTCCAACAA ACACCATTGTCACACTCCAACAAACACCATTGTCAC ACTCCATT | SEQ ID NO: 38 |
| (miR-122) ₃ antisentido | [PHOS]CGAATGGAGTGTGACAATGGTGTGTTGGAA GTGTGACAATGGTGTGTTGGAGTGTGACAATGGT GTGTTGGTT | SEQ ID NO: 39 |
| (miR-1) ₁ -(miR-122) ₁ sentido | [PHOS]CGAAATACATACTTCTTACATTCCAACAAAC ACCATTGTCACACTCCATT | SEQ ID NO: 40 |
| (miR-1) ₁ -(miR-122) ₁ antisentido | [PHOS]CGAATGGAGTGTGACAATGGTGTGTTGGAA ATGTAAGAAGTATGTATT | SEQ ID NO: 41 |
| Fragmento (miR-1) ₃ - (miR-122) ₃ sintetizado | TTCGAACTCGAGATACTTCTTACATTCCAATA CATACTTCTTACATTCCAATACATACTTCTTACATT CCACCATGGACTAGTACAAACACCATTGTCACACTC CAACAAACACCATTGTCACACTCCAACAAACACCATT TGTCACTCCAGCGGCCGCTTCGAA | SEQ ID NO: 42 |
| Pri-miR-122F | ATCGGGCCCGACTGCAGTTCAGCGTTG | SEQ ID NO: 43 |
| Pri-miR-122R | CGCGGGCCCCGACTTACATTACACACAAT | SEQ ID NO: 44 |
| Pri-miR-1F | CGCGGGCCCCGACTGATGTGAGAGAGAC | SEQ ID NO: 45 |

| | | |
|--------------------------------|-------------------------------|---------------|
| Pri-miR-1R | CGCGGGCCCGACTTTGGCCTCCGAGGC | SEQ ID NO: 46 |
| nLacZ5¢F(5¢F) | TGAAGCTGAAGCCTGTGATG | SEQ ID NO: 47 |
| nLacZ 5¢R(5¢R) | GAGCACCTGACAGCATTGAA | SEQ ID NO: 48 |
| nLacZ3¢F(3¢F) | CTCAGCAACAGCTCATGGAA | SEQ ID NO: 49 |
| nLacZ3¢R(3¢R) | TTACTTCTGGCACACACCA | SEQ ID NO: 50 |
| nLacZpolyF(A ⁺ F) | TGGTGTGGTGCCAGAAGTAA | SEQ ID NO: 51 |
| nLacZpolyR(A ⁺ R) | CAACAGATGGCTGCCAACTA | SEQ ID NO: 52 |
| bGHpolyAR(bGH ⁺ AR) | TGGGAGTGGCACCTTCCA | SEQ ID NO: 53 |
| EGFP-F | CGACCACCTACCAGCAGAACAA | SEQ ID NO: 54 |
| EGFP-R | CTTGTACAGCTCGTCCATGC | SEQ ID NO: 55 |
| CiclinaGIF | AATGGCCTCAGAACATGACTGC | SEQ ID NO: 56 |
| CiclinaG1R | AGTCGCTTCACAGCCAAAT | SEQ ID NO: 57 |
| MM-ActinaF | ATGCCA ACACAGTGCTGTCTGG | SEQ ID NO: 58 |
| MM-ActinaR | TGCTTGCTGATCCACATCTGCT | SEQ ID NO: 59 |
| Sonda de miR-122 | TGGAGTGTGACAATGGTGTGTTG | SEQ ID NO: 60 |
| Sonda de Let-7 | AACTATACAAACCTACTACCTCA | SEQ ID NO: 61 |
| Sonda de miR-26a | AGCCTATCCTGGATTACTTGAA | SEQ ID NO: 62 |
| Sonda de miR-22 | ACA GTT CTT CAA CTG GCA GCT T | SEQ ID NO: 63 |
| Sonda de U6 | CTCTGTATCGTTCCAATTTAGTATA | SEQ ID NO: 64 |

Ejemplo 9: La infección intravenosa de los rAAV medió en la transducción generalizada en el SNC de ratón neonatal

5 *Introducción al ejemplo*

Este ejemplo describe un análisis de nueve vectores de scAAV en cuanto a las propiedades de transferencia génica al SNC después de la administración sistémica. Este estudio implicó identificar vectores más eficaces para la transferencia génica al SNC. En algunos aspectos el estudio examinó serotipos o variantes naturales de los rAAV para la permeación potenciada de la BHE. En algunos casos, el estudio buscó identificar vectores de rAAV con suministro mejorado de proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) al SNC tras la inyección en la vena facial en el día 1 postnatal (P1). Se incluyó AAV9 en el estudio. Excepto por rAAV2 y rAAV5, los otros 7 vectores cruzaron la BHE con una eficiencia de transducción variable, entre los que rAAVrh.10, rAAVrh.39, rAAVrh.43, rAAV9 y rhAAV7 se clasificaron entre los 5 primeros, que mediaron en este estudio en una robusta expresión de EGFP en tanto células neuronales como de la glía en todo el SNC. El desempeño de rAAVrh.10 fue comparable al de rAAV9 y en algún caso mejor. Varios rAAV transducen eficientemente neuronas, neuronas motoras, astrocitos y células de Purkinje; entre ellos, rAAVrh.10 es al menos tan eficiente como rAAV9 en muchas de las regiones examinadas. Los rAAV suministrados por vía intravenosa no provocaron una microglisis anómala en el SNC. Los rAAV que logran una transferencia génica generalizada estable del SNC son útiles como vectores terapéuticos para trastornos neurológicos que afectan a grandes regiones del SNC, así como, como herramientas biológicas convenientes para la investigación en neurociencias.

Resultados

25 Veintiún días después de la administración del vector en ratones P1, se compararon los perfiles de transducción del SNC de los siguientes vectores de AAV recombinantes que codifican EGFP: rAAV1, rAAV2, rAAV5, rAAV6, rAAV6.2, rAAV7, rAAV9, rAAVrh.10, rAAVrh.39 y rAAVrh.43. Los vectores usados en este estudio fueron comparables en cuanto a pureza e integridad morfológica (Figura 19). Como se evalúa por el sistema de puntuación descrito en los métodos, rAAV9 estuvo entre los que mejor se desempeñan; la mayoría de los otros rAAV probados (rAAV1, rAAV6, rAAV6.2, rAAV7, rAAVrh.10, rAAVrh.39 y rAAVrh.43) también dieron lugar a expresión de EGFP en todo el SNC (Tabla 2). El número de células positivas evidentes para EGFP (Tabla 5) entre estructuras subanatómicas estuvo influido por el vector particular usado. Para estos siete rAAV y para rAAV9 (un total de ocho rAAV), que permearon la BHE y realizaron la transducción del SNC después del suministro i.v., se encontraron células positivas para EGFP en el hipotálamo, seguido de bulbo raquídeo, estriado, hipocampo, corteza y cerebelo. Por el contrario, la eficiencia de transducción en el bulbo olfatorio y el tálamo fue relativamente baja (Tabla 5). Se hizo una evaluación cuantitativa de la eficiencia de la transferencia génica de EGFP de cada rAAV. Se seleccionaron 12 regiones importantes del cerebro desde el punto de vista subanatómico y funcional en cuanto al análisis cuantitativo de la intensidad/píxel de EGFP media en cada región para cada rAAV usando el programa informático Nikon NIS elements AR V. 32 (Figura 19a) (véanse los Métodos). Para los ocho vectores que lograron la transducción del SNC después de la inyección i.v., la intensidad/píxel de EGFP media fue relativamente baja en la corteza, núcleo habenular, asta de Amón, giro dentado, tálamo, cerebelo y bulbo olfativo, moderado en plexo coroideo y caudado-putamen, pero alta en hipotálamo, bulbo raquídeo y amígdala (Figura 19a). En la Figura 19b se compararon las intensidades promedio de EGFP de las 12 regiones para diferentes rAAV. Fueron notorios AAVrh.10, AAVrh.39 y AAVrh.43 en cuanto a la eficiencia de la transducción génica en cerebro, seguido de AAV7, AAV9 y AAV1 (Figuras 19a y 19b). Los ocho serotipos eficaces también mediaron en la expresión de EGFP en toda la médula espinal, a diferentes grados. Se realizó el mismo análisis cuantitativo para cada rAAV en cortes de la médula espinal cervical, torácica y lumbar

(Figura 19a); también se compararon las intensidades de EGFP promedio de los tres cortes para diferentes rAAV (Figura 19b). AAV1, AAV9, AA VRh10, AAV.rh39 y AAV.rh43 presentaron una fuerte transducción en la médula espinal con alta intensidad de EGFP observada en la cervical, seguido de los cortes torácico y lumbar de la médula espinal (Figuras 19a y 19b). Para rAAV2 hubo algunas células positivas para EGFP en el hipocampo, corteza e hipotálamo. En ratones inyectados con AAV5 se observaron células positivas para EGFP en el hipotálamo. Se proporciona a continuación una descripción de las observaciones hechas en diferentes estructuras del SNC. Las estructuras subanatómicas del SNC pueden servir como diana para la terapia génica del SNC. En algunos casos, en uno o más trastornos neurológicos las estructuras subanatómicas del SNC están asociadas a cambios patológicos. En algunos casos, las estructuras subanatómicas del SNC tienen perfiles de transducción distintos para uno o más rAAV.

Estriado. La patología del estriado está asociada a la enfermedad de Huntington, coreas, coreoatetosis y discinesias. La drogadicción puede implicar plasticidad en las sinapsis estriatales. La inyección sistémica de rAAV9 en ratones neonatales transduce tejido estriatal. En este estudio, un gran número de células con morfología neuronal en esta región también se transdujeron por rAAVRh.10 (Figura 20), lo que se confirmó por cotinción con un marcador neuronal como se describe a continuación. Otros vectores, que incluyen rAAVRh.39 y rAAV7, también mediaron en la transducción moderada en el estriado (Figura 20). Por el contrario, rAAV6, rAAV6.2 y rAAV1 dieron como resultado una expresión de EGFP relativamente baja en esta estructura (Figura 20).

Hipocampo. El hipocampo es una región asociada a memoria a largo plazo y navegación espacial, que normalmente se dañan por estrés y patogenia de enfermedades tales como la epilepsia y la esquizofrenia. Se observaron de forma bilateral grandes cantidades de neuronas positivas para EGFP en todas las regiones del hipocampo, concretamente el giro dentado, hilio, CA1, CA2 y CA3 para los ratones que recibieron rAAVRh.10, rAAV9, rAAV7, rAAVRh.39 y rAAVRh.43 intravenosos (clasificados por la eficiencia de transducción en esta estructura, Tabla 5 y Figuras 19 y 20). Además del patrón de transducción neuronal, las células positivas para EGFP tenían el aspecto morfológico de astrocitos (Figura 20). Esto se confirmó además por tinción doble con anticuerpos frente a EGFP y con un marcador astrocítico, como se describe más adelante. Para los vectores de rAAV1, rAAV6 y rAAV6.2 administrados por vía intravenosa hubo en el hipocampo pequeñas cantidades de células positivas para EGFP (Figura 20).

Corteza. Los cambios patológicos en la corteza se han implicado en la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson. Los vectores de AAV7, AAV9, AA VRh.10, AA VRh.39 y AA VRh.43 lograron la transducción moderada de EGFP en la corteza (Tabla 5 y Figuras 19 y 20). La morfología de las células transducidas fue concordante con tanto neuronas como astrocitos como se confirmó además por tinción con marcadores celulares y el análisis con microscopía confocal descrito más adelante. Normalmente se observaron células positivas para EGFP destacadas en las regiones ventrolaterales de la corteza, que incluyen la corteza insular agranular posterior, corteza piriforme, corteza entorinal lateral, núcleo amigdalino cortical posterolateral y núcleo amigdalino cortical posteromedial (Figura 20). Se extendieron fuertes señales de EGFP de +1,5 a -3,3 mm en relación con el bregma (0,0 mm). La eficiencia de transducción cortical de rAAVRh.10, rAAV9, rAAVRh.39 y rAAVRh.43 fue comparable (Tabla 5 y Figuras 19 y 20). Los vectores de AAV1, AAV6 y AAV6.2 también transdujeron células en la corteza (Figura 20).

Hipotálamo. Un papel del hipotálamo es secretar neurohormonas para controlar determinados procesos metabólicos. El hipotálamo también se indica en la etiología de la diabetes. Se observó señal de EGFP en el hipotálamo para ocho vectores. La administración intravenosa de rAAVRh.10 dio como resultado la expresión de EGFP más alta en todo el hipotálamo, seguido de rAAVRh.39, rAAV7, rAAV6.2, rAAVRh.43, rAAV9, rAAV1 y rAAV6 (Figuras 19 y 20, y Tabla 5). Curiosamente, la mayoría de las células positivas para EGFP en esta estructura tienen una morfología astrocítica, lo que se determinó por inmunotinción con un marcador específico de tipo celular astrocítico, como se describe más adelante. La señal de EGFP astrocítica tendió a oscurecer el examen directo de los detalles morfológicos de otras células transducidas. Sin embargo, esto se aclaró por tinción inmunofluorescente doble de los cortes de tejidos con anticuerpos para EGFP y marcadores de células neuronales, como se describe más adelante.

Cerebelo. Las lesiones patológicas en el cerebelo se encuentran frecuentemente en enfermedades tales como síndrome afectivo-cognitivo cerebeloso, trastorno del desarrollo de la coordinación, síndrome de la fosa posterior, déficits lingüísticos, envejecimiento, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, autismo, demencia y esquizofrenia. Se detectaron células y fibras positivas para EGFP en el cerebelo para la mayoría de los vectores de rAAV (Tabla 5 y Figuras 19 y 20). Se encontró un gran número de células que expresaban EGFP en las capas de células de Purkinje y granulares para rAAV7, rAAV9, rAAVRh.10, rAAVRh.39 y rAAVRh.43 (Figura 20). El perfil de transducción del vector de rAAV1 indicó expresión en células en la capa de células granulares, mientras que rAAV6 y rAAV6.2 se localizaron en células en la capa de células de Purkinje (Figura 20).

Bulbo raquídeo. El bulbo raquídeo es una posible diana para terapia génica para tratar dolor crónico. La mayoría de los rAAV medió en la expresión de EGFP de moderada a fuerte en el bulbo raquídeo, estando la mayoría de las células verdes presentes en el borde externo (Figura 20). Las eficiencias de transducción de estos rAAV en esta región se clasifican en el siguiente orden: rAAVRh.39 = rAAVRh.43 > rAAV.rh10 > rAAV1 > rAAV9 > rAAV7 > rAAV6.2 > rAAV6 (Tabla 5 y Figura 19a). La morfología de la mayoría de las células transducidas por EGFP fue concordante con que las células eran astrocitos.

Médula espinal. La médula espinal está implicada en enfermedades de las neuronas motoras. rAAVrh.10, rAAV9, rAAVrh.39 y rAAVrh.43 dieron lugar a una expresión de EGFP muy fuerte en la materia gris y blanca cervical, mientras que rAAV1, rAAV6.2 y rAAV7 mostraron intensidad de EGFP moderada (Tabla 5 y Figuras 19 y 21). Para

5 rAAV1, se observó señal de EGFP en materia blanca. La capacidad de transducción de todos los rAAV eficaces disminuyó de la médula espinal cervical a la lumbar. Fueron visibles células positivas para EGFP en la última región. Se observaron grandes poblaciones de células positivas para EGFP con morfología astrocítica en toda la médula espinal (Figura 21). Además, rAAVrh.10, rAAV9, rAAVrh.39, rAAVrh.43 y rAAV7 también transdijeron células con morfología de neurona motora en las regiones ventrales de la médula espinal (Figura 21). Las fibras ascendentes de 10 la columna torácica mostraron señal de EGFP clara. Además, los ganglios de la raíz posterior (DRG) presentaron transducción sobresaliente con fuerte expresión de EGFP en neuronas de GRP (Figura 22 y Figura 26). Las identidades de los tipos celulares transducidos por el rAAV en la médula espinal se caracterizaron por cotinción por inmunofluorescencia con anticuerpos frente a EGFP y marcadores específicos de tipo celular, como se describe más 15 adelante.

15 *La administración i.v. de vectores de AAV conduce a la transducción de diferentes tipos celulares en el SNC*

Para confirmar la identidad de las células transducidas en diferentes regiones del SNC, se realizó tinción inmunofluorescente doble con anticuerpos para EGFP y NeuN (marcador neuronal genérico), proteína fibrilar ácida 20 de la glía (GFAP; marcador de astrocitos), calbindina-D28K (marcador de células de Purkinje) y colina acetil transferasa (ChAT; marcador de neuronas motoras) (Figura 23). Los resultados de la inmunotinción mostraron que un gran número de células positivas para NeuN expresaron EGFP en todo el cerebro de ratón, lo que indicó la transducción neuronal generalizada. Las regiones con alta densidad de neuronas transducidas incluyeron estriado, hipocampo, corteza e hipotálamo. Los vectores de rAAVrh.10, rAAV9, rAAV7 y rAAVrh.39 fueron eficientes en 25 mediar en la transducción neuronal, seguido de AAV6.2, AAV1 y AAV6 (Figuras 19 y 23). Además, se transdijeron neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra por AAV.rh10 (Figura 23). Las células transducidas en el SNC incluyeron astrocitos positivos para GFAP con somas pequeños y procesos altamente ramificados (Figura 23). La 30 inmunotinción de calbindina-D28K confirmó la identidad de varias células transducidas en el cerebelo como células de Purkinje, con expresión de EGFP en tanto soma como en sus procesos de tipo árbol (Figura 23). Los rAAV aptos para la transducción de células de Purkinje incluyen: rAAVrh.10, rAAV9, rAAVrh.39, rAAV7, rAAV6.2 y rAAVrh.43. rAAV1 y rAAV6 transdijeron una porción de células de Purkinje con una intensidad de EGFP relativamente baja 35 (Figura 19). La transducción de neuronas motoras se confirmó por la presencia de grandes células EGFP+/ChAT+ en la médula espinal ventral para varios vectores de rAAV (Figura 23). rAAVrh.10, rAAV9, rAAV7, rAAVrh.39 mostraron una eficiencia de transducción de neuronas motoras comparable (Figura 21).

35 *La administración i.v. de vectores de AAV medió en la transducción fuerte en ventrículos y vasos sanguíneos del cerebro*

Se observó expresión de EGFP en las células del plexo coroideo en los ventrículos laterales, 3° y 4° de los animales 40 infundidos con rAAVrh.39, rAAVrh.10, rAAVrh.43, rAAV7 y rAAV9 (clasificados por eficiencia de transducción, Tabla 5 y Figuras 19 y 24). La expresión de EGFP en diferentes ventrículos del cerebro del mismo ratón fue similar (Figura 24). También se transdijeron ependimocitos que revisten los ventrículos. Una observación referente a la distribución 45 de las células positivas para EGFP fue el evidente gradiente, con el número más alto de células transducidas en regiones periventriculares y números progresivamente más bajos a medida que aumenta la distancia a los ventrículos. Esto fue más evidente en áreas alrededor de los ventrículos 3° y 4° que en los ventrículos laterales (Figura 24). También se encontró una amplia señal de EGFP en vasos sanguíneos de todo el cerebro y la médula espinal del ratón. Esto se verificó por tinción inmunofluorescente doble con anticuerpos dirigidos a EGFP y un 50 marcador específico de endotelio de vasos sanguíneos, CD34 (Figuras 27a y 27b). A diferencia de los perfiles de transducción de rAAV en diferentes regiones del parénquima cerebral, la transducción de EGFP de los vasos sanguíneos en todo el SNC fue relativamente uniforme para cualquier vector dado. Sin embargo, la transducción de vasos sanguíneos estuvo influenciada por el rAAV particular usado. La mayoría de los rAAV medió en una transducción de vasos sanguíneos de moderada (por ejemplo, rAAV6) a altamente eficiente (por ejemplo, rAAVrh.10) en el SNC.

55 *La inyección i.v. de vectores de AAV no provoca microgliosis*

También se tiñeron cortes de cerebro con anticuerpo frente a Iba-1 para marcar células de la microglía. Las células 60 positivas para Iba-1 en los cortes de ratones que recibieron rAAVrh.10 no fue más que las de los ratones sin tratamiento previo o inyectados con PBS (Figura 28). Este resultado indicó que los rAAV suministrados por vía intravascular no provocaron inflamación sostenida en el SNC de los ratones 3 semanas después de la inyección de neonatos P1.

Discusión de resultados

65 En este estudio, el perfil de transducción del SNC se evaluó para 10 vectores de rAAV diferentes suministrados por infusión intravascular en ratones neonatales. La mayoría de los rAAV pueden cruzar la BHE y mediar en la

- transferencia génica al SNC del ratón neonatal con grados variables de eficiencia (Figuras 19-21 y Tabla 5). Después de la administración sistémica, rAAVrh.10, rAAVrh.39, rAAVrh.43 y rAAV9 son los rAAV eficaces con capacidades de transducción y tropismo celular similares, como se evalúa por la expresión de EGFP global en el SNC. Específicamente, varias regiones en el SNC del ratón, que incluyen estriado, hipocampo, corteza, hipotálamo, 5 cerebelo, bulbo raquídeo y médula espinal cervical, revelaron una expresión sustancial de EGFP. Además, rAAV6.2 y rAAV7 también fueron eficaces. AAV1 y AAV6, lograron la transducción del SNC (Tabla 5). La expresión de EGFP nativa fue detectable en cortes de cerebro y médula espinal para la mayoría de los rAAV sin inmunotinción (Figura 29).
- 10 Este ejemplo tiene importancia clínica para la terapia génica de trastornos relacionados con el SNC, incluyendo para pacientes jóvenes. Para diversas enfermedades neurológicas puede ser necesario el tratamiento temprano durante la infancia para prevenir el daño irreversible del SNC. La capacidad de los rAAV para transducir grandes cantidades de células neuronales en diferentes regiones es importante para tratar enfermedades neurológicas tales como atrofias musculares espinales, lipofuscinosis neuronal ceroidea y degeneraciones espinocerebelosas. La eficiencia 15 de algunos vectores de rAAV para transducir células de Purkinje y de la capa granular indica que los vectores pueden usarse para tratar ataxias espinocerebelosas. La transducción de astrocitos por los rAAV que expresen factores neurotróficos secretados también puede ser beneficiosa para varias enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Canavan y la esclerosis lateral amiotrófica. La transducción vascular en el SNC puede ser importante para tratar la isquemia cerebral y el accidente cerebrovascular. La aplicación clínica del suministro 20 intravascular de genes mediado por rAAV también puede extenderse al sistema nervioso periférico (SNP). La transducción eficiente de GRP proporciona nuevas estrategias terapéuticas para pacientes que padecen dolor crónico.
- 25 El suministro sistémico de genes al SNC también es útil como método para manipular la expresión génica en investigación. Puede aplicarse la expresión transgénica eficaz y estable en el SNC por administración intravenosa de rAAV para establecer modelos de animales transgénicos somáticos, que es un método posiblemente más barato, más rápido y más simple que la transgénesis convencional. También pueden crearse modelos de animales con atenuación de genes del SNC somáticos usando el método descrito en el presente documento.
- 30 Algunos rAAV demostraron de hecho perfiles de transducción exclusivos en el SNC. Por ejemplo, rAAV1 presentó células granulares transducidas en el cerebelo, mientras que rAAV6 y rAAV6.2 transdijeron células de Purkinje, y otros transdijeron ambos tipos de células (Figura 9). Esto indica que una vez que atraviesan la BHE, los rAAV tienen distintos tropismos, que pueden atribuirse a la cápside debido a que el genoma vectorial usado en todos los vectores era el mismo.
- 35 Los serotipos de AAV divulgados en el presente documento pueden transducir eficientemente células endoteliales de capilares del cerebro, neuronas y astrocitos. Esto indica que estos vectores pueden extravasarse de la circulación y llegar al parénquima del SNC, posiblemente cruzando la BHE. El AAV puede cruzar la barrera endotelial por una ruta de transcritosis. En este estudio, los plexos coroideos y su tejido parenquimatoso circundante se transdijeron 40 eficientemente. Además, hubo un gradiente de intensidad evidente de EGFP del tejido periventricular (más alta) al parénquima profundo (más baja). Estas observaciones indican que el AAV puede entrar en el SNC del ratón neonatal a través del plexo coroideo, seguido de la distribución generalizada a través del LCR y/o del flujo de fluido intersticial para transducir células neuronales y de la glía.
- 45 Pueden usarse promotores específicos de neuronas y de la glía, tales como sinapsina-1, y promotores de GFAP para limitar la expresión génica a un tipo específico de célula. Otro método para lograr el suministro de genes dirigido al SNC es utilizar interferencia por ARN para desdireccionalizar los tejidos periféricos por mecanismos reguladores postranscripcionales. Añadiendo sitios de unión de microARN en el extremo 3' de los casetes del transgén, la expresión transgénica después de la administración sistémica de vectores de AAV puede reducirse o 50 eliminarse en tejidos tales como hígado, corazón y músculo esquelético, mientras se mantiene la transducción del SNC.
- Materiales y métodos*
- 55 *Producción de AAV*
- Se produjeron vectores de scAAV por transencapsidación del genoma de vector de rAAV flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV2 con las cápsides de diferentes AAV usando el método de transfección transitoria de células 293 y sedimentación en gradiente de CsCl, como se ha descrito previamente. Se titularon las preparaciones de vector por PCR cuantitativa. La pureza de los vectores se evaluó por electroforesis en gel SDS-acrilamida al 4-12 % y tinción con plata (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se examinó la integridad morfológica de cada vector usado en el estudio por microscopía electrónica de transmisión de viriones de AAV recombinante con tinción negativa. La expresión de EGFP en el genoma de los vectores de scAAV está dirigida por un potenciador del CMV/promotor de β-actina de pollo híbrido.
- 65 *Infecciones de ratones neonatales*

Se usaron ratones C57BL/6 de tipo silvestre compañeros de camada. La cría de ratones se realizó usando el método de ritmo programático. Se controlaron ratones preñados diariamente desde el día embrionario 17 al 21 para garantizar que las crías recién nacidas pudieran recibir la dosificación con los vectores en P1. Se retiró de la jaula la madre (alojada individualmente) de cada camada que iba a inyectarse. Los vectores se diluyeron a una concentración de 4×10^{12} CG/ml en PBS y posteriormente se extrajeron 100 µl de solución con jeringas de insulina 31G (jerigas de insulina BD Ultra-Fine II U-100). Las crías P1 de ratones C57BL/6 se anestesiaron usando isoflurano y se apoyaron sobre hielo. Para las inyecciones intravenosas se usó un microscopio de disección para visualizar la vena temporal (situada justo anterior a la oreja). La aguja se insertó en la vena y se comprimió manualmente el émbolo. La correcta inyección se verificó observando el emblanquecimiento de la vena. Cada cría recibió 4×10^{11} CG de los diferentes vectores de scrAAVCBEGFP (rAAV1, rAAV2, rAAV5, rAAV6, rAAV6.2, rAAV7, rAAV9, rAAVrh.10, rAAVrh.39, rAAVrh.43; n=6-8 ratones por grupo) a través de la vena temporal superficial. Después de la inyección, las crías se limpiaron cuidadosamente, se frotaron con su lecho de paja original y después se devolvieron a su jaula original. Entonces, la madre se volvió a introducir en la jaula después de un breve embotamiento por vía nasal usando almohadillas de etanol.

Procesamiento histológico

Los animales del estudio se anestesiaron 21 días después de la inyección, luego se perfundieron por vía transcardíaca con 15 ml de PBS frío, seguido de 15 ml de solución de fijación que contenía paraformaldehído al 4 % (v/v) con glutaraldehído al 0,2 % (v/v) en PBS. Después, los cadáveres enteros se fijaron posteriormente en solución de fijación durante 5 días. Se extrajeron las médulas espinales y los cerebros bajo un microscopio de disección de campo claro, se aclaron en PBS y luego se crioprotegieron en sacarosa al 30 % (peso/volumen) en PBS a 4 °C. Una vez los tejidos se sumergieron al fondo de la solución de sacarosa, se incluyeron en el compuesto Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA) y se congelaron en un baño de nieve carbónica/etanol. Los bloques de tejido se almacenaron a -80 °C hasta que se cortaron. Se cortaron cortes flotantes seriados de 40 µm del cerebro entero en un criostato (Thermo Microm HM 550). Para la médula espinal, se tomaron cortes de 3 mm de longitud de las regiones cervical, torácica y lumbar, y después se prepararon cortes transversales seriados de 40 µm igual que anteriormente.

Inmunotinción y análisis por obtención de imágenes de microscopía

Se tiñeron cortes de cerebro y de médula espinal como cortes flotantes en placas de 12 pocillos. Los cortes se lavaron 3 veces en PBS durante 5 min cada vez, y luego se incubaron en solución de bloqueo que contenía Triton-X100 al 1 % (v/v) (Fisher, Pittsburg, PA), leche en polvo al 5 % (peso/volumen) y suero de cabra al 10 % (v/v) (Invitrogen) durante 2 h a temperatura ambiente. Después, los cortes se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, los cortes de tejidos se lavaron dos veces en Tween-20 al 0,05 % (v/v) en PBS (PBST) y una vez con PBS, durando cada etapa de lavado 10 min. Después de eso, los cortes se incubaron con anticuerpos secundarios apropiados en solución de bloqueo a temperatura ambiente durante 2 h. Los cortes se lavaron otra vez como anteriormente antes de montarlos en portaobjetos de vidrio. Se usó Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para cubrir todos los portaobjetos, y después se analizaron usando un microscopio de fluorescencia invertido (Nikon Eclipse Ti) o un microscopio confocal Leica TSC-SP2 AOLS equipado con una lente de aceite de 63x y un microscopio invertido DM-IRE2. Los anticuerpos primarios usados en este estudio fueron los siguientes: anti-GFP de conejo (Invitrogen), anti-ChAT de cabra y anti-NeuN de ratón (ambos de Millipore, Billerica, MA), anti-GFAP de ratón (Cell Signaling, Danvers, MA), anti-CD34 de rata (Abcam, Cambridge, MA), anti-calbindina D-28k de ratón (Sigma, St. Louis, MO) y anti-DARPP de conejo (Abcam, Cambridge, MA). Los anticuerpos secundarios usados en el estudio incluyeron: anti-IgG de conejo de burro DyLight 488 AffiniPure (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA); anti-IgG de cabra de burro DyLight 549 AffiniPure (Jackson ImmunoResearch); anti-IgG de rata de cabra DyLight 594 AffiniPure (Jackson ImmunoResearch); anti-IgG de ratón de cabra DyLight 594 AffiniPure (Jackson ImmunoResearch); anti-IgG de conejo-Alexa flúor 488 de cabra (Invitrogen) y anti-IgG de ratón-Alexa flúor 568 de cabra (Invitrogen).

Comparación semicuantitativa y cuantitativa de la transducción de EGFP por diferentes vectores

Para generar un formato de datos cuantificable y comparable, se desarrolló un sistema de puntuación semicuantitativa para estimar la eficiencia de transducción de diferentes vectores de rAAV en diferentes regiones del SNC del ratón. Brevemente, se marcaron las regiones con células no positivas para EGFP como (-). Las regiones con muy pocas células positivas para EGFP se puntuaron (+), las regiones con algunas células positivas para EGFP se clasificaron como (++) , las regiones con muchas células positivas para EGFP se marcaron como (+++). Finalmente, las regiones repletas de células positivas para EGFP se marcaron como (++++) .

A continuación, se seleccionaron 12 regiones importantes desde el punto de vista subanatómico y funcional en el cerebro, así como cortes cervicales, torácicos y lumbares de la médula espinal, para análisis cuantitativo de imágenes que se tomaron en un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti equipado con una cámara refrigerada Retiga 2000-RV cCd. Se usó el programa informático Nikon NIS elements AR v. 3.2 para la cuantificación de la intensidad. Antes de la cuantificación, se obtuvieron la intensidad de la fuente de luz y los tiempos de exposición óptimos

representando una curva de intensidad/tiempo de exposición usando portaobjetos de fluorescencia de referencia (Ted Pella, prod. 2273). Se encontró que la intensidad y los tiempos de exposición tenían una correlación lineal. Además, la sobreexposición y la subexposición extrema distorsionan la correlación lineal. Se usaron la máxima intensidad (ND1) y una exposición de 20 ms para todos los cortes para evitar la sobreexposición. Para la cuantificación, se usó la región de interés (RDI) fijada para cuantificar el área más brillante de cualquier región del cerebro dada. Se obtuvo una intensidad media (intensidad total/tamaño de RDI) para cada región de todos los serotipos.

5 **Tabla 5. Características de transducción de los serotipos de AAV después de las inyecciones intravasculares en**
 10 **cerebro de ratón neonatal**

| | | Bulbo olfatorio | | Estriado | | Hipocampo | | Corteza | | Tálamo | | Hipotálamo | | Cerebelo | | Bulbo raquídeo | | Cervical | | Torácica | | Lumbar | | Plexo coroideo | | |
|--------|-----|-----------------|------|------------|-----|------------|-----|------------|----|------------|------|------------|-----|------------|------|----------------|------|------------|-----|------------|-----|------------|------|----------------|------|---|
| | | Puntuación | n | Puntuación | n | Puntuación | n | Puntuación | n | Puntuación | n | Puntuación | n | Puntuación | n | Puntuación | n | Puntuación | n | Puntuación | n | Puntuación | n | Puntuación | n | |
| AAV1 | + | 3 | ++ | 3 | ++ | 3 | ++ | 3 | + | 3 | +++ | 3 | +++ | 3 | +++ | 3 | +++ | 3 | +++ | 3 | +++ | 3 | + | 3 | +++ | 3 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AAV2 | - | 3 | - | 3 | + | 3 | + | 3 | + | 3 | + | 3 | + | 3 | + | 3 | + | 3 | - | 3 | - | 3 | ++ | 3 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AAV5 | - | 3 | - | 3 | - | 3 | + | 3 | - | 3 | + | 3 | - | 3 | - | 3 | - | 3 | - | 3 | - | 3 | - | 3 | - | 3 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AAV6 | + | 3 | + | 3 | ++ | 3 | ++ | 3 | + | 3 | +++ | 2 | ++ | 3 | ++ | 3 | ++ | 3 | + | 3 | + | 3 | ++ | 3 | +++ | 3 |
| | | | | | | | | | | | | ++ | 1 | | | | | | | | | | | | | |
| AAV6.2 | - | 3 | +++ | 2 | ++ | 3 | ++ | 3 | + | 3 | ++++ | 3 | ++ | 3 | ++ | 3 | ++ | 3 | ++ | 3 | ++ | 3 | + | 3 | ++++ | 3 |
| | | | ++ | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AAV7 | +++ | 1 | +++ | 3 | +++ | 2 | ++ | 3 | + | 3 | ++++ | 3 | +++ | 1 | ++ | 3 | ++ | 3 | + | 3 | + | 3 | +++ | 3 | | |
| | ++ | 2 | | | ++ | 1 | | | | | | | | ++ | 2 | | | | | | | | | | | |
| AAV9 | +++ | 2 | +++ | 3 | ++ | 3 | +++ | 1 | + | 3 | ++++ | 1 | +++ | 1 | ++ | 3 | ++++ | 1 | ++ | 3 | + | 3 | +++ | 3 | | |
| | ++ | 1 | | | | | ++ | 2 | | | | | +++ | 2 | ++ | 2 | | | +++ | 2 | | | | | | |
| rh10 | +++ | 1 | ++++ | 1 | +++ | 3 | +++ | 2 | ++ | 2 | ++++ | 3 | +++ | 1 | +++ | 3 | ++++ | 1 | ++ | 3 | + | 3 | +++ | 3 | | |
| | ++ | 2 | ++ | 2 | | | ++ | 1 | + | 1 | | | | ++ | 2 | | | +++ | 2 | | | | | | | |
| rh39 | +++ | 1 | ++++ | 2 | +++ | 3 | +++ | 1 | + | 3 | ++++ | 3 | +++ | 1 | ++++ | 1 | ++++ | 1 | +++ | 3 | + | 3 | ++++ | 3 | | |
| | ++ | 2 | +++ | 1 | | | ++ | 2 | | | | | | ++ | 2 | +++ | 2 | +++ | 2 | | | | | | | |
| rh43 | ++ | 3 | +++ | 3 | +++ | 3 | +++ | 3 | + | 3 | ++++ | 1 | ++ | 3 | ++++ | 1 | ++++ | 2 | +++ | 3 | + | 3 | +++ | 3 | | |
| | | | | | | | | | | | | ++ | 2 | | | ++ | 2 | +++ | 1 | | | | | | | |

Puntuación: (-) Sin transducción, (+) muy pocas células positivas, (++) algunas células positivas, (+++) muchas células positivas y (++++) la región está casi saturada con células positivas para EGFP. El número de animales (n) con la puntuación particular se proporciona a la derecha de la puntuación.

Ejemplo 10: Evaluación de un tratamiento basado en rAAV en un modelo de enfermedad de Canavan

Introducción al ejemplo

15 La EC es un leucodistrofia infantil rara y mortal producida por mutaciones recesivas autosómicas en el gen aspartoacilasa (ASPA) [como se ha establecido en el trabajo de posgrado de G.G. (12)]. La deficiencia de ASPA en pacientes con EC conduce a ácido N-Acetyl-aspártico (NAA) elevado en orina (un distintivo de EC) y a la degeneración esponjosa de la materia blanca en todo el SNC, produciendo enlentecimiento psicomotor grave y muerte prematura. Un modelo de ratón ASPA^{-/-} imita la neuropatología y las manifestaciones clínicas observadas en pacientes con EC, es decir, degeneración esponjosa de materia blanca, déficits motores, retrasos del desarrollo y muerte prematura (en el plazo de 3 semanas después del nacimiento).

20

En este estudio, se usaron rAAV suministrables por i.v. para dirigirse al SNC de forma global para tratar la degeneración dispersa de la MB en ratones EC. Las inyecciones i.v. únicas del vector de ASPA a los ratones EC neonatales corrigieron el defecto metabólico, la disfunción psicomotora y otros fenotipos de enfermedad, y prolongaron la supervivencia. Aunque los ratones EC no tratados empezaron a mostrar retraso del crecimiento, disfunción psicomotora en la 2^a semana después del nacimiento y murieron uniformemente poco después del

destete, los ratones tratados empezaron a ganar peso 2 semanas después de la inyección de vector y casi alcanzaron a sus compañeros de camada heterocigóticos en el plazo de 7-8 semanas. A diferencia de los ratones EC, la movilidad de los animales tratados fue similar a la de los compañeros de camada ts. Los datos de la prueba de la barra giratoria en los ratones tratados no mostraron diferencias significativas en el tiempo de latencia entre los ratones EC tratados y sus compañeros de camada ts de la misma edad, lo que indica que la terapia génica corrigió la ataxia, un síntoma neuromuscular típico de la EC. La caracterización bioquímica indicó reducción de los niveles de NAA en las muestras de orina y el restablecimiento de la actividad de ASPA en sus tejidos de cerebro y riñón. La mitigación de los fenotipos bioquímico y clínico se correlacionó bien con la histopatología globalmente mejorada no solo en cerebro y médula espinal, sino también en tejidos periféricos tales como el riñón, lo que indica que la EC no es solo un trastorno del SNC.

Resultados

Se dosificaron ratones EC en P1 con AAV9ASPA (vena facial, 4×10^{11} CG). Los ratones se controlaron en cuanto al crecimiento, marcha, función motora en la barra giratoria, niveles de NAA en orina y actividades de ASPA en el cerebro. Los resultados mostraron que i) los ratones EC no tratados empezaron a perder peso en la 2^a semana y murieron en la 3^a semana después del nacimiento; ii) los animales tratados recuperaron su capacidad para crecer en la 5^a semana y alcanzaron a los animales ASPA^{+/−} en la 10^a semana; iii) la terapia génica corrigió completamente la marcha de los ratones EC así como la función motora de los ratones EC tratados en P1 (Figura 30A), medido por la prueba de la barra giratoria; iv) la terapia génica restableció la visión de ratones EC. Las pruebas de electrorretinografía (ERG) en los ojos de los ratones EC mostraron respuestas no registrables a la luz, mientras que fueron fácilmente detectables respuestas de ERG bien definidas en los ratones EC tratados (Figura 30B). Estos datos indican una retinopatía más grave y pérdida de visión en ratones EC, y la terapia génica puede mitigar la retinopatía y restablecer la visión de los ratones EC; v) la terapia génica mejoró claramente los defectos metabólicos de NAA, ya que los niveles de NAA en los ratones CD tratados se aproximan a los de los ratones de control (Figura 30c) y vi) la corrección del metabolismo de NAA se correlaciona bien con el restablecimiento de la expresión (Figura 30E) y las actividades de ASPA (Figura 30D) en el cerebro de los ratones EC tratados.

Para determinar si las correcciones fenotípicas se correlacionaban con la neuropatología aliviada, así como con la expresión de ASPA *in situ* en los cortes de cerebro de los ratones EC tratados, se analizaron cortes de cerebro 3 meses después de la terapia génica en cuanto a neuropatología e inmunohistoquímica de ASPA. Aunque el cerebro de ratón sin tratar muestra una marcada vacuolación que implica de forma esparsa a todas las regiones del cerebro y la médula espinal, la vacuolación tanto en el cerebro como la médula espinal del animal tratado parece más irregular y variable, con vacuolas generalmente de tamaño más pequeño. Algunas áreas de la corteza cerebral no muestran casi vacuolación (Figura 31A). Además, se usó el sistema del complejo avidina-biotina (CAB) para teñir cortes de cerebro para detectar la expresión de ASPA en la corteza cerebral *in situ* (Figura 31B). Para generar mediciones cuantitativas de la mejora de la neuropatología en los ratones EC tratados, se cuantificaron antes y después del tratamiento de terapia génica las "vacuolas" producidas por la degeneración de la materia blanca en los cortes de cerebro y de médula espinal de los ratones EC. Para este análisis cuantitativo, se usaron un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti y el programa informático Nikon NIS elements AR V.3.2. Las vacuolas que fueron > 3.000 píxeles, 1.000 - 3.000 píxeles y 100 - 1.000 píxeles se definieron como vacuolas grandes, medianas y pequeñas, respectivamente. De entre las 5 regiones del cerebro evaluadas en este experimento, el bulbo olfatorio tuvo tras la terapia génica la mitigación más espectacular en la degeneración de materia blanca (Figura 32A). Para las otras 3 regiones, aunque las vacuolas grandes se eliminaron completamente y los números de vacuolas medianas se redujeron notablemente, la reducción en los números de vacuolas pequeñas (<100 um) no fue tan significativa en este experimento (Figura 32A). El mismo análisis en los cortes de médula espinal reveló una tendencia similar (Figura 32B).

Se evaluó la histopatología de los riñones en los ratones EC. Los glomérulos mostraron una estructura normal, pero se asociaron a dilatación de los espacios de Bowman. El epitelio tubular renal estaba difusamente atenuado (o atrófico) en asociación con el agrandamiento de las luces tubulares (Figura 33A). Por el contrario, el ratón EC tratado tenía glomérulos normales. Las células epiteliales tubulares renales se tiñeron bien y tenían un volumen normal (Figura 33B). Estos resultados indican la implicación del riñón en la fisiopatología de la EC y del riñón como una diana periférica para la terapia génica de la EC. Este resultado también indica tropismo renal de vectores de AAV como una consideración para la selección de un vector para terapia génica de la EC. Se evaluaron dos vectores, rAAV9 y rh.10, en cuanto a la eficiencia de la transducción del riñón después del suministro i.v. en ratones C57BL/6 de 10 semanas de edad. Los resultados indican el uso de rAAVrh.10 (Figura 33D) como un vector útil para la terapia génica de la EC debido a que transduce el riñón eficientemente, además de su transducción eficiente del SNC (Figura 33C).

Secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos

>gi|9632548|ref|NP_049542.1| proteína de la cápside [Virus adeno-asociado -1] (SEQ ID NO: 1)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLG
 PFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQP
 AKKRLNFGQTGDSEVPDPQPLGEPPATPAAVGPTMASGGGAPMADNNNEGADGV
 GNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYS
 TPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLNFNQKVEVTNDGVTTIA
 NNLTSTVQVFSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMPQYGYLTLNNGSQAVERGS
 SFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFFEVPHSSYAHQSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRT
 QNQSGSAQNKKDLLFSRGSPAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSHTKTDNNNSNFTWT
 GASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDEDKFFPMMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMIT
 DEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQSSSTDPATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQG
 PIWAKIPHTDGHFHPSPLOMGFGFLKNPPPQILIKNTPVANPPAEFSATKFASFITQYST
 GQVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTERPRPIGTRYL
 TRPL

>gi|110645923|ref|YP_680426.1| proteína principal de la cubierta VP1 [Virus adeno-asociado - 2] (SEQ ID NO: 2)

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGP
 NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFG
 GNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSGTGKAGQQPA
 RKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNNEGADGV
 NSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTP
 WGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLNFNQKVEVTQNDGTTIAN
 NLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMPQYGYLTLNNGSQAVERGS
 SFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHQSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRT
 NTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSHTSADNNNSEYSWTG
 ATKYHLNGRDSLNVNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITD
 EEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPI
 WAKIPHTDGHFHPSPLOMGFGFLKHPPPQILIKNTPVANPSTTFSAAKFASFITQYSTG
 QVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTR
 NL

5

>gi|51593838|ref|YP_068409.1| proteína de la cápside [Virus adeno-asociado - 5] (SEQ ID NO: 3)

MSFVDHPPDWLEEVGEGLREFLGEAGPPPKPNQQHQDQARGLVLPGYNLGP
 GLDRGEPVNRADEVAREHDI SYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSF
 GGNGLGKAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRJDDHFPKRKKARTEEDSKP
 STSSDAEAGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGPLGDNNQGADGVGN
 AGSDWHDNSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSONNHQYREIKSGSV
 DGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRHS
 HWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNQKVEVTQD
 STTIANNLTSTVQVFTDD
 DYQLPYVVGNGTEGCLPAFP
 PQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFCLEYFPSK
 MLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNL
 KLANPLVDQYLYRFVSTNNNTGGVQFN
 NLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNL
 GSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPP
 QPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQ
 PANPGTTATYLEG
 NMILITSESETQP
 VNRVAY
 NVGGQM
 ATNNQS
 TTAPATGT
 YNLQEIVPG
 SVW
 MERDV
 LQGPI
 WAKIPETGA
 AHFH
 PSPAMGGFGLKH
 PPPMM
 LIKNT
 PVP
 GNITS
 FSD
 DV
 P
 VSS
 FITQY
 STG
 QV
 T
 V
 E
 M
 E
 W
 E
 L
 K
 K
 E
 S
 N
 S
 K
 R
 W
 N
 P
 E
 I
 Q
 Y
 T
 N
 N
 Y
 N
 D
 P
 Q
 F
 V
 D
 A
 P
 D
 S
 T
 G
 E
 Y
 R
 T
 R
 P
 I
 G
 T
 R
 Y
 L
 T
 R
 P
 L

10

>gi|2766607|gb|AAB95450.1| proteína de la cápside VP1 [Virus adeno-asociado - 6] (SEQ ID NO: 4)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLG
 PFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAECERLQEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQP
 AKKRLNFGQTGDSEVPDPQPLGEPPATPAAVGPTTMASGGGAPMADNNEGADGV
 GNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYS
 TPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKNIQVKEVTTNDGVTIA
 NNLTSTVQVFSDEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIQYGYLTLNNGSQAVGRS
 SFYCLEYFPSQMLRTGNNFTSYTFEDVPFHSSYAHQSLSRDLMNPLIDQYLYLNRT
 QNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSCTKTDNNNSNFTWT
 GASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDKDFFPMMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMIT
 DEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQSSSTDPATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQG
 PIWAKIPHTDGHFHPSPLOMGFFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYST
 GQVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYL
 TRPL

>gi|171850125|gb|ACB55302.1| proteína de la cápside VP1 [Virus adeno-asociado - 6.2] (SEQ ID NO: 5)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLG
 PFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAECERLQEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQP
 AKKRLNFGQTGDSEVPDPQPLGEPPATPAAVGPTTMASGGGAPMADNNEGADGV
 GNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYS
 TPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKNIQVKEVTTNDGVTIA
 NNLTSTVQVFSDEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIQYGYLTLNNGSQAVGRS
 SFYCLEYFPSQMLRTGNNFTSYTFEDVPFHSSYAHQSLSRDLMNPLIDQYLYLNRT
 QNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSCTKTDNNNSNFTWT
 GASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDKDFFPMMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMIT
 DEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQSSSTDPATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQG
 PIWAKIPHTDGHFHPSPLOMGFFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYST

5

GQVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYL
 TRPL

>gi|22652861|gb|AAN03855.1|AF513851_2 proteína de la cápside [Virus adeno-asociado - 7] (SEQ ID NO: 6)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLG
 PFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAECERLQEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPAKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQ
 PARKRLNFGQTGDSEVPDPQPLGEPPAAPSSVGSGTVAAGGGAPMADNNEGADGV
 GNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNHLYKQISSETAGSTNDNTYFGYS
 TPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKKLRFKNIQVKEVTTNDGVTIA
 NNLTSTIQVFSDEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIQYGYLTLNNGSQSGRSS
 FYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYSFEDVPFHSSYAHQSLSRDLMNPLIDQYLYYLARTQ
 SNPGGTAGNRELQFYQGGPSTMAEQAKNWLPGPCFRQQRVSCTLDQNNNSNFAWT
 GATKYHLNGRNSLVNPGVAMATHKDDEDRFFPSSGVIFGKTGATNKTLENVLMT
 NEEEIRPTNPVATEEYGIVSSNLQAANTAAQTQVVNNQGALPGMVWQNRDVYLQGP
 IWAKIPHTDGNFHPSPLOMGFFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPEVFTPAKFASFITQYSTG
 QVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQQYTSNFEKQTGVDFAVDSQGVYSEPRPIGTRYLTR
 NL

10

>gi|22652864|gb|AAN03857.1|AF513852_2 proteína de la cápside [Virus adeno-asociado - 8] (SEQ ID NO: 7)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLG
 PFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEGQERLQEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQ
 PARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPSGVGPNMAAGGGAPMADNNNEGADG
 VGSSSGNWHCDSTWLDRVITTSTRTWALPTYNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFG
 YSTPWGYFDFNRFHCHFSRWDQRLINNNWGRPKRLSFKLFNIQVKEVTNQEGTKT
 IANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVMIPQYGYLTNNNGSQA
 SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHQSLSRMLNPLIDQYLYYLSR
 TQTTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSTTGQNNNSNFAW
 TAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDEERFFPSNGILFGKQNAARDNADYS
 DVM LTSEEEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQQNTAPQIGTVNSQGALPGMVWQN
 RDVYLQ GPIWAKIPTDGNFHPSPLMGFFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTFN
 QSKLNSFITQYS TGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFA
 VNTEGVYSEPRPIGTRYL TRNL

>gi|46487805|gb|AAS99264.1| proteína de la cápside VP1 [Virus adeno-asociado 9] (SEQ ID NO: 8)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLG
 PGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEGQERLKEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQP
 AKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNNEGADGV
 SSSGNWHCDSQWLDRVITTSTRTWALPTYNHLYKQISNSTSGGSSNDNA
 YFGYST PWGYFDFNRFHCHFSRWDQRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVTD
 NNNGVKTIA NNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVMIPQYGY
 LTNDGSQA VGRS SFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFEVNPFHSSYAHQS
 LSRMLNPLIDQYLYYLSKT INGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPS
 YRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGA
 SSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKV
 MITN EEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAAQATGWVQNQGILPGMVW
 QDRDVYLQGP IWAKIPTDGNFHPSPLMGFFGMKHPPPQILIKNTPVPADP
 PTAFNKDKLNSFITQYST GQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYY
 KSNNEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLT RNL

>gi|29650526|gb|AAO88201.1| proteína de la cápside [Virus adeno-asociado de primate no humano] (SEQ ID NO: 9)
 rh-10

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLG
 PFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEGQERLQEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQ
 PAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNNEGADGV
 GSSSGNWHCDSTWLDRVITTSTRTWALPTYNHLYKQISNGTSGGSTD
 NDNTYFGY STPWGYFDFNRFHCHFSRWDQRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVK
 EVTNQEGTKTIA ANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPAD
 VMIPQYGYLTNNNGSQA VGRS SFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYQ
 FEDVPFHSSYAHQSLSRMLNPLIDQYLYYLSR TQSTGGTAGTQQLFSQAG
 PNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAW TGATKYHLNGR
 DLSLVNPGVAMATHKDDEERFFPSGVLMGFKQGAGKD
 NVDYSSV MLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNA
 APIVGAVNSQGALPGMVWQN
 RDVY LQGPIWAKIPTDGNFHPSPLMGFFGLKHPPPQILIKNTPVPADP
 PTTFSQAKLASFIT QYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYY
 KSTSVDFAVN
 TDGTYSEPRPIGTRYLT RYLTRNL

>gi|171850147|gb|ACB55313.1| proteína de la cápside VP1 [Virus adeno-asociado -rh.39] (SEQ ID NO: 10)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLG
 PFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAECERLQEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQ
 PAKKRLNFGQTGDSEVPDPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNEGADGV
 GSSSGNWHCDSTWLGRVITTSTRTWALPTYNHLYKQISNGTSGGSTDNTYFGY
 STPWGYFDFNRFHCHFSRWDWQRLINNNWGRPKRLSFKLNFNIQVKETQNEGTKTI
 ANNLSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIQYGYLTNNNGSQA
 SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYTFEDVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYYLSR
 TQSTGGTQGTQQLFSQAGPANMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAW
 TGATKYHLNGRDLSLVNPVAMATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQGAGRDNVDYSSV
 MLTSEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQNTGPIVGNVNSQGALPGMVWQNRDVY
 LQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGFGFLKHPPPQILIKNTPVPADPPTFSQAKLASFIT
 QYSTGQSVIEWELQKENSKRWNPEIQTTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGT
 RYLTRNL

>gi|46487767|gb|AAS99245.1| proteína de la cápside VP1 [Virus adeno-asociado rh.43] (SEQ ID NO: 11)

5

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLG
 PFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLEAGDNPYLRYNHADAECERLQEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSGIGKKGQQP
 ARKRLNFGQTGDSEVPDPQPLGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGV
 GSSSGNWHCDSTWLGRVITTSTRTWALPTYNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGY
 STPWGYFDFNRFHCHFSRWDWQRLINNNWGRPKRLSFKLNFNIQVKETQNEGTKTI
 ANNLSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIQYGYLTNNNGSQA
 SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYYLSR
 TQTTGGTANTQLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSTTGQNNNSNFAW
 TAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDEERFFPVTGSCFWQQNAARDNADYS
 LTSEEIKTTNPVATEEYGVADNLQQQNTAPQIGTVNSQGALPGMVWQNRDVY
 LQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGFGFLKHPPPQILIKNTPVPADPPTFNQSKLNS
 FITQYS
 TGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQTTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYL
 TRNL

>proteína de la cápside VP1 [Virus adeno-asociado] CSp3 (SEQ ID NO: 12)

10

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLG
 PGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAECERLKE
 DTS FGGNLGRAVFQAKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQP
 AKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGSNTIASGGAPVADNNEGADGV
 SSGNWHCDSQWLGRVITTSTRTWALPTYNHLYKRISNSTSGGSSNDNAYFGY
 STPWGYFDFNRFHCHFSRWDWQRLINNNWGRPKRLNFKNIRVKEVDNNGVKTITN
 NLTSTVQVFTSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIQYGYLTNDGSQAVGRSS
 FYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYYLS
 KTI NGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTRNNNSEFA
 WPGAS SWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDN
 VDADKVMITNE EEIKTTNPVATESYGVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPG
 MVWQDRDVYLGPI WAKIPHTDGNFHPSPLMGFGVKHPPPQILIKNTPVPAD
 PPTAFNKDKLNSFITQYST GQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQTTSNYY
 KSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLT RNL

>gi|189339202|ref|NP_001121557.1| aspartoacilasa [*Homo sapiens*] (SEQ ID NO: 13)

MTSCHIAEEHIQKVAIFGGTHGNELTGVFLVKHWLENGAEIQRTGLEVKPFITNPRAV
 KKCTRYIDCDLNRFDLENLGKKMSEDLPYEVRAQEINHLFGPKDSEDSYDIIFDLH
 NTTSNMGCTLILEDSRNNFLIQMFHYIKTSALPLCYVYLIEHPSLKYATTRSIAKYPV
 GIEVGPQPQGVLRADILDQMRKMIKHALDFIHFNEGKEFPPCAIEVYKIIEKVDYPR
 DENGEIAAIHPNLQDQDWKPLHPGDPMLTDGKTIPLGGDCTVYPVFVNEAAYYE
 KKEAFAKTTKLTNAKSIRCLLH

5 >gi|189339201:92-1033 aspartoacilasa de *Homo sapiens* (enfermedad de Canavan) (ASPA), variante de transcripto 2,
 ARNm (SEQ ID NO: 14)

ATGACTTCTTGTACATTGCTGAAGAACATATAACAAAAGGTTGCTATCTTGAG
 GAACCCATGGGAATGAGCTAACCGGAGTATTCTGGTTAACGATTGGCTAGAGA
 ATGGCGCTGAGATTAGAGAACAGGGCTGGAGGTAAAACCATTATTACTAACCC
 CCAGAGCAGTGAAGAAGTGTACAGATATATTGACTGTGACCTGAATCGCATT
 TGACCTGAAAATCTTGGCAAAAAAAATGTCAGAACAGATTGCCATATGAAGTGAG
 AAGGGCTCAAGAAATAATCATTTATTGGTCCAAAAGACAGTGAAGATTCTTAT
 GACATTATTTGACCTTCACAACACCACCTCTAACATGGGGTGCACCTTATTCT
 TGAGGATTCCAGGAATAACTTTAATTCAAGATGTTCATTACATTAGACTTCTC
 TGGCTCCACTACCCTGCTACGTTATCTGATTGAGCATCCTCCCTCAAATATGCG
 ACCACTCGTCCATAGCCAAGTATCCTGTGGGTATAGAAGTTGGTCCTCAGCCTC
 AAGGGGTCTGAGAGCTGATATCTTGGATCAAATGAGAAAATGATTAAACATG
 CTCTTGATTTATACATCATTCAATGAAGGAAAAGAATTCCCTCCCTGCGCCATT
 GAGGTCTATAAAATTATAGAGAAAAGTTGATTACCCCCGGGATGAAAATGGAGAA
 ATTGCTGCTATCATCCATCCTAACCTGCAGGATCAAGACTGGAAACCACACTGCATC
 CTGGGGATCCCCTGTTTAACCTCTGATGGGAAGACGATCCACTGGCGGAGA
 CTGTACCGTGTACCCCGTGTGAATGAGGCCGCATTACGAAAAGAAAGA
 AGCTTTGCAAAGACAACAACTAACGCTCAATGCAAAAGTATTGCTGCTGT
 TTACATTAG

10 >gi|31560279|ref|NP_075602.2| aspartoacilasa [*Mus musculus*] (SEQ ID NO: 15)

MTSCVAKEPIKKIAIFGGTHGNELTGVFLVTHWLRNGTEVHRAGLDVKPFI
 NKTRYIDCDLNRFDLENLSKEMSEDLPYEVRAQEINHLFGPKNSDDAYDLVFDL
 HNTTSNMGCTLILEDSRNDFLIQMFHYIKTCMAPLPCSYLIEHPSLKYATTRSI
 VGIIEVGPQPHGVLRADILDQMRKMIKHALDFIHFNEGKEFPPCSIDVYKIME
 KVDYPRNESGDMAAVIHPNLQDQDWKPLHPGDPVFVSLDGKVIPLGGDCTVYP
 VFVNEAAYYEKKEAFAKTTKLTSAKSIRSTLH

>gi|142354273:148-1086 aspartoacilasa de *Mus musculus* (Aspa), ARNm (SEQ ID NO: 16)

ATGACCTCTGTGTTGCTAAAGAACCTATTAAAGAAGATTGCCATCTTGGAGGGA
 CTCATGGAAATGAAC TGACCGGAGTGTCTAGTTACTCACTGGCTAAGGAATGG
 CACTGAAGTTACAGAGCAGGGCTGGACGTGAAGCCATTACCAATCCAAG
 GGC GGTTGGAGAAGTGACCAAGATACTTACTGTGACCTGAATCGTTTGAC
 CTTGAAAATCTTAGCAAAGAGATGTCTGAAGACTGCCATATGAAGTGAGAAGG
 GCTCAAGAAATAATCATTATTGGTCCAAAAAATAGTGTGATGCCTATGACC
 TTGTTTTGACCTTCACAACACCACTTCTAACATGGGTTGCACTCTTATTCTGAG
 GATTCCAGGAATGACTTTAATTCACTGTTCACTATATTAAAGACTTGCATGGC
 TCCATTACCCCTGCTCTGTTATCTCATTGAGCATCCTCACTCAAATATGCAACCA
 CTCGTTCCATTGCCAAGTATCCTGTTGGTATAGAAGTTGGTCTCAGCCTCACGGT
 GTCCTTAGAGCTGATATTAGACCAAATGAGAAAAATGATAAAACATGCTCTG
 ATTTTATACAGCATTCAATGAAGGAAAAGAATTCCCTCCGTCTATTGACGTC
 TATAAAAATAATGGAGAAAAGTTGATTATCCAAGGAATGAAAGTGGAGACATGGCT
 GCTGTTATTCTTAATCTGCAGGATCAAGACTGGAAACCATTCACCGTCTGGAG
 ATCCTGTGTTGTCTCTGATGGAAAAGTTATTCCACTGGGTGGAGACTGTAC
 CGTGTACCCAGTGTGTTGTGAATGAAGCTGCATATTATGAAAAAAAAGAAGCATT
 GCAAAGACAACAAACTAACACTCAGCGAAAAAGCATCCGCTCCACTTGCAC
 TAA

>gi|48762945:149-613 superóxido dismutasa 1 de *Homo sapiens*, soluble (SOD1), ARNm (SEQ ID NO: 17)

ATGGCGACGAAGGCCGTGCGTGCTGAAGGGCGACGGCCAGTGCAGGGCATC
 ATCAATTTCGAGCAGAAGGAAAGTAATGGACCAGTGAAGGTGTGGGAAGCATT
 AAAGGACTGACTGAAGGCCTGCATGGATTCCATGTTCATGAGTTGGAGATAATA
 CAGCAGGCTGTACCACTGCAGGTCTCACTTAATCCTCTATCCAGAAAACACGG
 TGGGCCAAAGGATGAAGAGAGGGATGTTGGAGACTTGGCAATGTGACTGCTGA
 CAAAGATGGTGTGCCGATGTCTATTGAAGATTCTGTGATCTCACTCTCAGGA
 GACCATTGCATCATTGCCGCACACTGGTGGCCATGAAAAAGCAGATGACTTG

5

GGCAAAGGTGGAAATGAAGAAAGTACAAAGACAGGAAACGCTGGAAGTCGTT
 GGCTTGTGGTGTAAATTGGATCGCCCAATAA

>gi|4507149|ref|NP_000445.1| superóxido dismutasa [*Homo sapiens*] (SEQ ID NO: 18)

MATKAVCVLKGDPVQGIINFEQKESNGPVKVWGSIKGLTEGLHGFHVHEFDNTA
 GCTSAGPHFNPLSRKHGGPKDEERHVGDLGNVTADKDGVADSVIEDSVISLSDHCII
 GRTLVVHEKADDLGKGGNEESTKTGNAGSRLACGVIGIAQ

10

>gi|45597446:117-581 superóxido dismutasa 1 de *Mus musculus*, soluble (Sod1), ARNm (SEQ ID NO: 19)

ATGGCGATGAAAGCGGTGTGCGTGCTGAAGGGCGACGGTCCGGTGCAGGGAAACC
 ATCCACTTCGAGCAGAAGGCAAGCGGTGAACCACTGTTGTCAGGACAAATT
 ACAGGATTAACTGAAGGCCAGCATGGGTTCCACGTCCATCAGTATGGGACAAT
 ACACAAGGCTGTACCACTGCAGGACCTCATTAAATCCTCACTCTAACGAAACATG
 GTGGCCCGGGATGAAGAGAGGGATGTTGGAGACCTGGCAATGTGACTGCTG
 GAAAGGACGGTGTGCCAATGTGTCATTGAAGATCGTGTGATCTCACTCTCAGG
 AGAGCATTCCATCATTGCCGTACAATGGTGGTCCATGAGAAACAAAGATGACTT
 GGGCAAAGGTGGAAATGAAGAAAGTACAAAGACTGGAAATGCTGGAGCCGCT
 TGGCCTGTGGAGTGATTGGATTGCGCAGTAA

15

>gi|45597447|ref|NP_035564.1| superóxido dismutasa [*Mus musculus*] (SEQ ID NO: 20)

MAMKAVCVLKGDGPVQGTIHFEQKASGEPVVLSGQITGLTEGQHGFHVHQYGDNT
QGCTSAGPHFNPHSKKHGGPADEERHVGDLGNVTAGKDGVANVSIEDRVISLSGEH
SIIGRTMVVHEKQDDLKGKGNEESTKTGNAGSRLACGVIGIAQ

>pAAVscCB6 EGFPmir SOD5 (directo) 5243 pb (SEQ ID NO: 21)

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGCAAAGCCCGGGCGTCGGCG
ACCTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTAGTAG
CCATGCTCTAGGAAGATCAATTCAATTACCGCTGACATTGATTATTGACTAGT
TATTAATAGTAATCAATTACGGGTCTAGTTCATAGCCCATAATGGAGTTCC
GCGTTACATAACTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCG
CCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATACTAAGCCTAATAGGGACTTC
CATTGACGTCAATGGGTGGATTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCA
AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCATTATGCCAAGTACATGACCTTATGGACTTCTACTTGGCAGTACA
TCTACGTATTAGTCATCGTATTACCATGTCGAGGCCACGTTCTGCTTCACCTCC
CCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTGTATTATTTATTTTAATTATTT
GTGCAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGGGGGGGGGGGG
GCGAGGGCGGGCGGGCGAGGCAGAGGTGCGCGGCAGCCAATCAGAGC
GGCGCGCTCCGAAAGTTCTTTATGGCGAGGCAGGGGGGGGGGGGGGG
AAAAGCGAACGCGCGGGCGGGAGCAAGCTCTAGCCTCGAGAATTACCGCG
TGGTACCTCTAGAGCAGAGCTCGTTAGTGAACCGTCAGTTCGAAATGCCACCA
TGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGC
TGGACGGCGACGTAACGCCACAAGTTAGCCTGAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCG
ATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCC
CGTGCCTGGCCCACCCCTCGTACCGCGTGCAGTGCTTCAGC

CGCTACCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCAAGTCGCCATGCCGAAG
 GCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC
 GCGCCGAGGTGAAGTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG
 GCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGCACAAGCTGGAGTACAAC
 ACAACAGCCACAACGTCTATATCATGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGG
 TGAACATTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACC
 ACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCCACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACC
 ACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCAACGAGAAGCGCGATC
 ACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGCACGCCGCCCCGATCACTCTGGCATGGACGA
 GCTGTACAAGTAAGTAACAGGTAAGTGCATCGTAATGCAGGAAAGCTTAT
 TCGGGTGAGATGGGCTGGGCACCATCTGGGACCCCTGACGTGAAGTTGTC
 GACTGGAGAACTCGGTTGTCGTCTGTTGCGGGGGCGCAGTTATGGCGGTGCCG
 TTGGGCAGTGCACCCGTACCTTGGGAGCGCGGCCCTCGTGTGACGTC
 ACCCGTTCTGTTGACCTGCTGTTGACAGTGAGCAGCAATGTGACTCGCTG
 ACAAAAGCTGTGAAGCCACAGATGGGCTTGTCAAGCAGTCACATTGCCTGCCTAC
 TGCCTCGGACTTCAAGGGCTCGAGAATTCAAGGGGGCCACCTGCCGGTAGGT
 GTGCGGTAGGCTTTCTCGTGCAGGACGCAAGGTTGCCCTAGGGTAGGCTC
 TCCTGAATCGACAGGCCGGACCTCTGGCGCCGCAACACCGTCTGACCGT
 ATTCACTCCTTTCTGCAAGGCTTGTGGAAGAAATGGGATCCGATCTT
 TCCCTCTGCCAAAAATTATGGGACATCATGAAGCCCTGAGCATCTGACTTCT
 GGCTAATAAAGGAAATTATTTCAATTGCAATAGTGTGTTGGAATTGGTGTCT
 CTCACTCGGCCTAGGTAGATAAGTAGCATGGGGTTAACATTAAACTACAAGG
 AACCCCTAGTGTGGAGTTGCCACTCCCTCTGCGCTCGCTCGCTACTGA
 GGCGGGCGACCAAAAGGTGCCGACGCCGGCTTGCGGGCGCTCAGT
 GAGCGAGCGAGCGCAGCCTAACCTAACCTAACCTGGCGTCTTACAA
 CGTCGTGACTGGAAAACCCCTGGCGTACCCAACTAACCTAACCGCTTGCAGCACATC
 CCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCGCACCGATGCCCTTCCA
 ACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCCATTAAAG
 CGCGGGGGGTGCGTACCGCAGCGTACACTTGCCAGCGCCCTA
 CGGCCCGCTCTTCGCTTCTCCCTTCTGCCACGTTGCCGGCTTCCC
 CGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTCCGATTAGTGTCTTACGGC
 ACCTCGACCCAAAAACTTGATTAGGGTGTGGTACGTAGTGGCCATGCC
 CTGATAGACGGTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTAACATTAGTGGAC
 TCTTGTCCAAACTGGAACACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTGTATTAA
 TAAGGGATTTCGCCATTGCGCTATTGGTAAAAAAATGAGCTGATTAAACAAA
 AATTAAACCGAATTAAACAAATTAACGCTAACATTAGGTGGCACTTT
 CGGGGAAATGTGCGCGAACCCCTATTGTTATTCTAAATACATTCAAATA
 TGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAATGCTCAATAATATTGAAAAG
 GAAGAGTATGAGTATTCAACATTCCGTGCGCCCTATTCCCTTTGCGGCAT
 TTTGCCCTCCTGTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGA
 AGATCAGTTGGGTGACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAA
 GATCCTGAGAGTTGCCCGAAGAACGTTCCAATGATGAGCACTTTAAA
 GTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCG
 GTGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGA
 AAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTGCCATAAC
 CATGAGTGATAACACTGCGGCCACTTACTCTGACAACGATCGGAGGACCGAA
 GGAGCTAACCGCTTTGACAAACATGGGGATCATGTAACCTGCCCTGATCGT
 TGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG

CCTGTAGCAATGGCAACAAACGTTGCGCAAACATTAACTGGCGAACTACTTACTC
TAGCTTCCC GGCAACAATTAAATAAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTGCAGGAC
CACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCC
GGT GAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCC
TCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGA
AATAGACAGATCGCTGAGATAAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAG
ACCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTAAAACCTCATTAAATTAAA
AGGATCTAGGTGAAGATCCTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTG
AGTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG
AGATCCTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTGCAAACAAAAACCACCGCTA
CCAGCGGTGGTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTCCGAAGGTAA
CTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACAAACTGTTCTTAGTGTAGCCGTAGTT
AGGCCACCACTCAAGAACTCTGTAGCACCACCATACCTCGCTGCTAATC
CTGTTACCAGTGGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACT
CAAGACGATAGTTACCGATAAGGCAGCAGCGGTGGCTGAACGGGGGGTTCGT
GCACACAGCCCAGCTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAACCTACAGC
GTGAGCTATGAGAAAGGCCACGCTCCGAAGGGAGAAAGGCCAGGGTAC
CGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTCCAGGGGA
AACGCCTGGTATCTTATAGTCCTGTCGGGTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCG
ATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC
GGCCTTTACGGTTCTGCCCTTGCTGGCTTGTGTCACATGTTCTTCCTGC
GTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTGAGTGAGCTGATACC
GCTCGCCGCAGCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGA
AGAGGCCCAATACGCAAACCGCCTCCCCCGCGCTGGCCGATTATTAATGC
AGCTGGCACGACAGGTTCCGACTGAAAGCGGGCAGTGAGCGAACGCAATT
AATGTGAGTTAGCTACTCATTAGGCACCCAGGCTTACACTTATGCTCCGG
CTCGTATGTTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTACACACAGGAAACAGCTA
TGACCATGATTACGCCAGATTAAATTAAAGGCCTTAATTAGG

>sod1mir1 (directo) 108 pb (SEQ ID NO: 22)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACATCATCAATTCCGAGCAGAACTGTGAAGCCACA
GATGGGTTCTGCTGAAATTGATGATGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

5

>sod1mir2 (directo) 106 pb (SEQ ID NO: 23)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACGCATTAAAGGATCCTGACTGACTGTGAAGCCACA
GATGGGTCAGTCAGTCCTTAATGCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

10 >sod1mir3 (directo) 108 pb (SEQ ID NO: 24)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACTGCATGGATTCTCATGTTCATCTGTGAAGCCACA
GATGGGATGAACATGGAATCCATGCAGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

>sod1mir4 (directo) 106 pb (SEQ ID NO: 25)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACAAGGATGAAGATCGAGGCATGCTGTGAAGCCACA
GATGGGCATGCCTCTCTCATCCTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

15

>sod1mir5 (directo) 110 pb (SEQ ID NO: 26)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACGCAATGTGACTTCGCTGACAAAGCTGTGAAGCCA
 CAGATGGGCTTGTCAAGCAGTCACATTGCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGG
 G

>sod1mir6 (directo) 108 pb (SEQ ID NO: 27)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACCGATGTGTCTATCTTGAAGATTCTGTGAAGCCACA
 GATGGGAATCTTCAATAGACACATCGGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

5

>sod1mir7 (directo) 106 pb (SEQ ID NO: 28)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACGGTGGAAATGATCAGAAAGTACTGTGAAGCCACA
 GATGGGTACTTCTTCATTCCACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

10

>sod1mir8 (directo) 110 pb (SEQ ID NO: 29)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACGCTGTAGAAATTGTATCCTGATCTGTGAAGCCAC
 AGATGGGATCAGGATACTTCTACAGCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

15

>sod1mir9 (directo) 106 pb (SEQ ID NO: 30)

TGCTGTTGACAGTGAGCGAGGTATTAAACTTGTCAAGATTAGTGAAGCCACAGA
 TGTAAATTCTGACAAGTTAATACCCCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

20

>pAAVscCB6 EGFPmir scr (1820 pb - 1925 pb, directo) 106 pb (SEQ ID NO: 31)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACGATGCTCTAACCGTTCTATCAAGTGAAGCCACAG
 ATGTTGATAGAACCTTAGAGCATCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

REIVINDICACIONES

1. Un virus adeno-asociado recombinante (rAAV) que comprende (i) una proteína de la cápside de AAV9 o de AAVrh.10 y (ii) un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido a un transgén para su uso como medicamento; en donde el transgén es para suministrarse al tejido del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto por administración intratecal y por administración intracerebral, y en donde el rAAV infecta células en el cerebro y en la médula espinal del sujeto.
- 5 2. El rAAV para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la administración intracerebral es una administración intraventricular.
- 10 3. El rAAV para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la administración intratecal es en la región cervical del sujeto.
- 15 4. El rAAV para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la administración intratecal es en la región torácica del sujeto.
- 20 5. El rAAV para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la administración intratecal es en la región lumbar del sujeto.
- 25 6. El rAAV para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la dosis del rAAV para administración intratecal o intracerebral está en un intervalo de 10^{10} copias de genoma a 10^{14} copias de genoma.
7. El rAAV para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el transgén es un gen asociado al SNC.
- 30 8. El rAAV para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el gen asociado al SNC se selecciona de proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), tirosina hidroxilasa (TH), GTP-ciclohidrolasa (GTPCH), aminoácido descarboxilasa (AADC) y aspartoacilasa (ASPA).
- 35 9. El rAAV para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el rAAV es AAV rh.10 y el transgén codifica un ARN inhibidor que se une específicamente al ARNm de SOD1, e inhibe la expresión de SOD1 en el sujeto, y en donde el rAAV es para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), en donde opcionalmente el ARN inhibidor tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26.
10. El rAAV para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el rAAV está formulado en una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 11. El rAAV para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el rAAV es AAV rh.10 y la administración intratecal logra la distribución a través del espacio intratecal, transduciendo células en la materia gris a lo largo de la médula espinal y el tronco encefálico.
- 45 12. El rAAV para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la administración intracerebral comprende la administración en al menos uno de los siguientes: cerebro, bulbo raquídeo, protuberancia, cerebelo, cavidad intracraneal, meninges que rodean el cerebro, duramadre, materia aracnoidea, la piamadre y/o líquido cefalorraquídeo (LCR) del espacio subaracnoidal que rodea el cerebro.

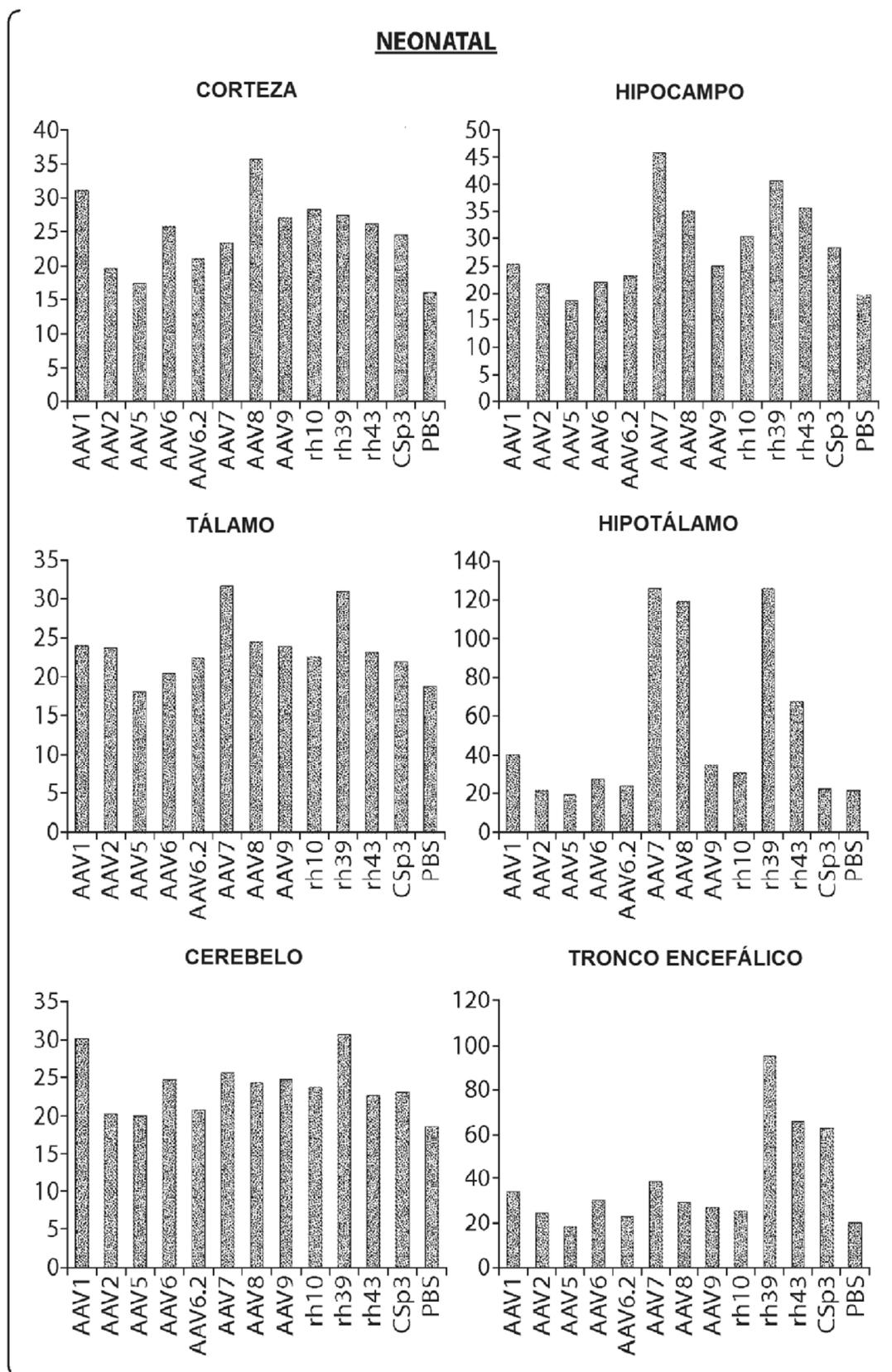
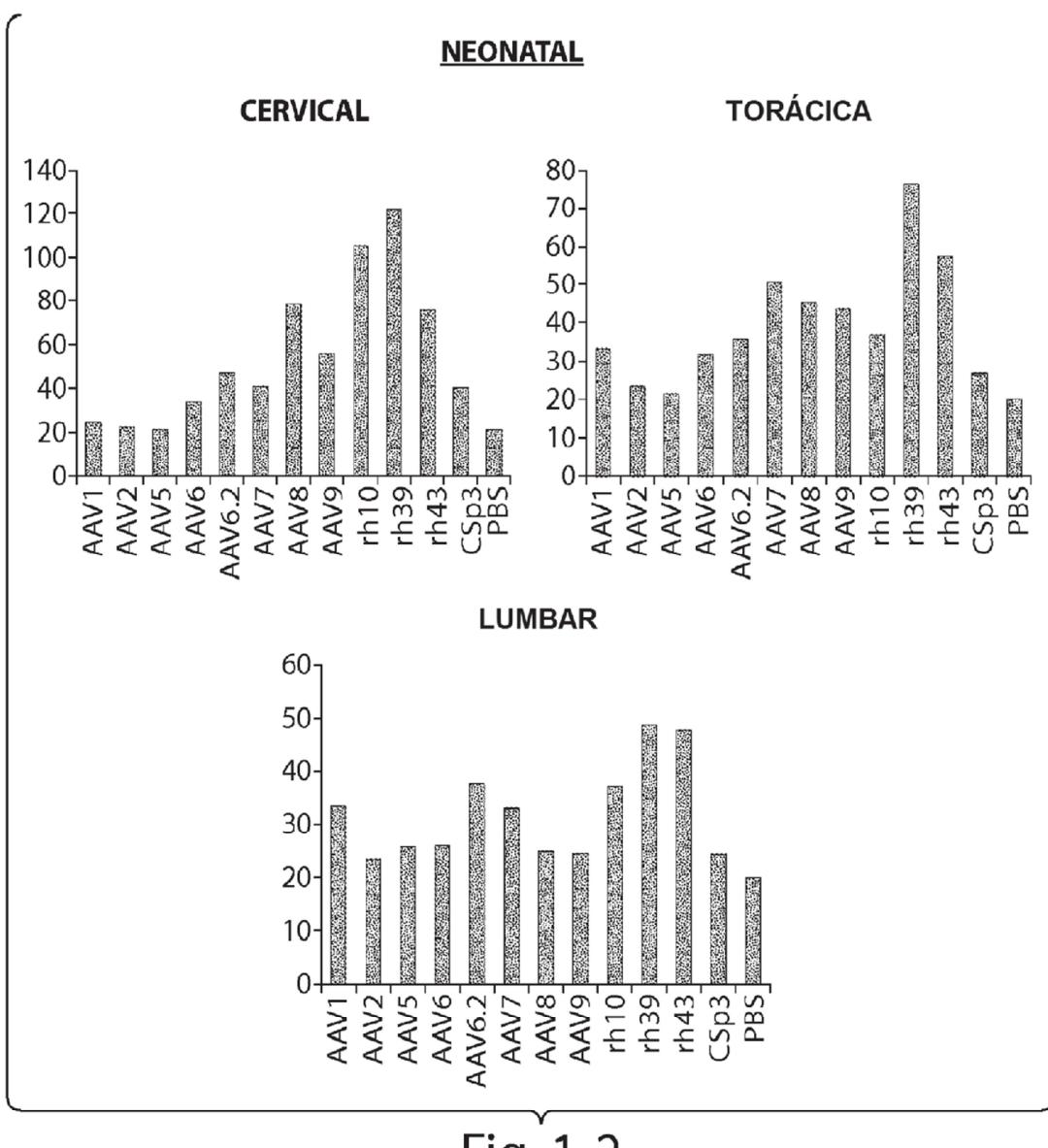


Fig. 1-1



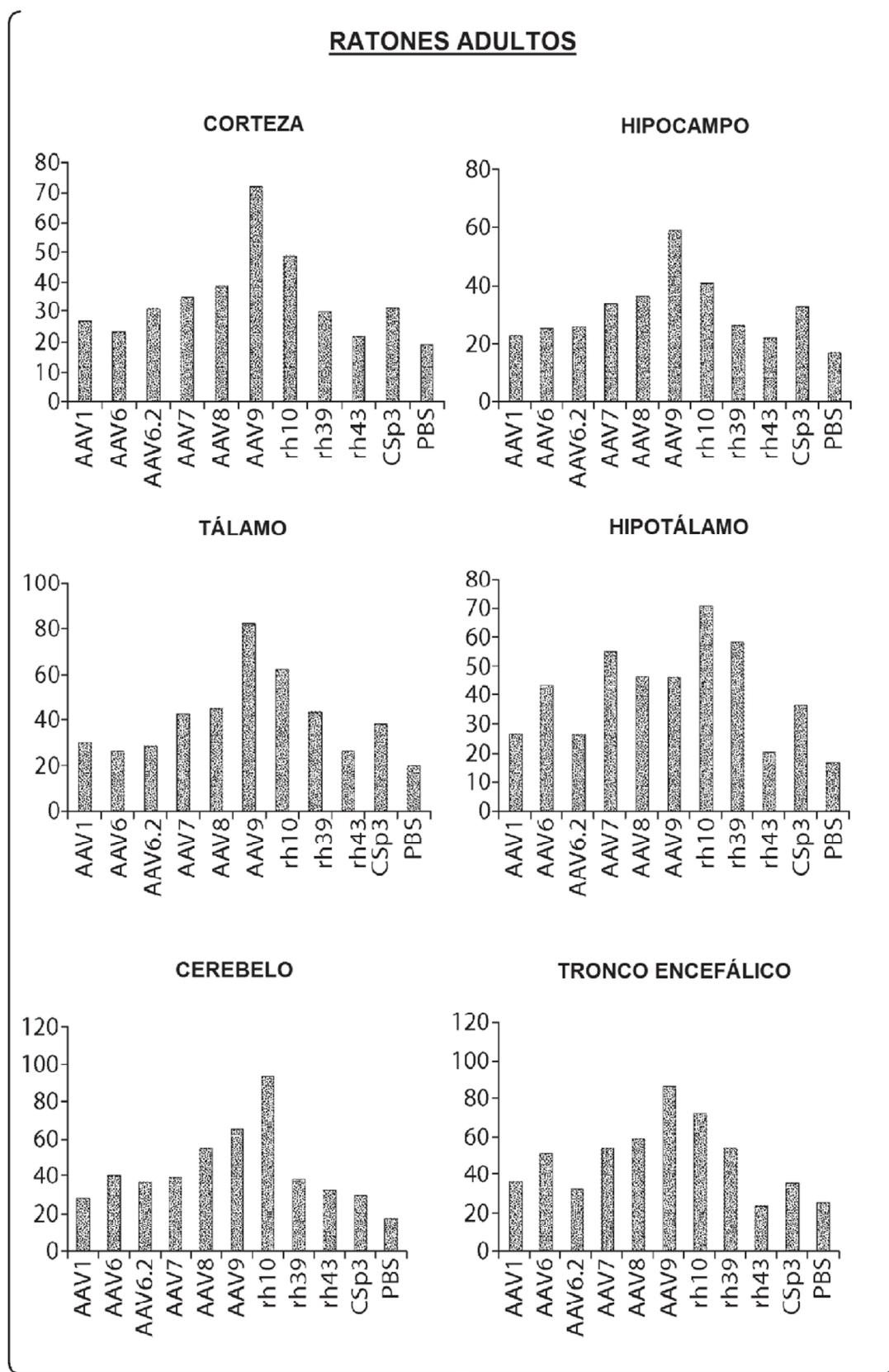
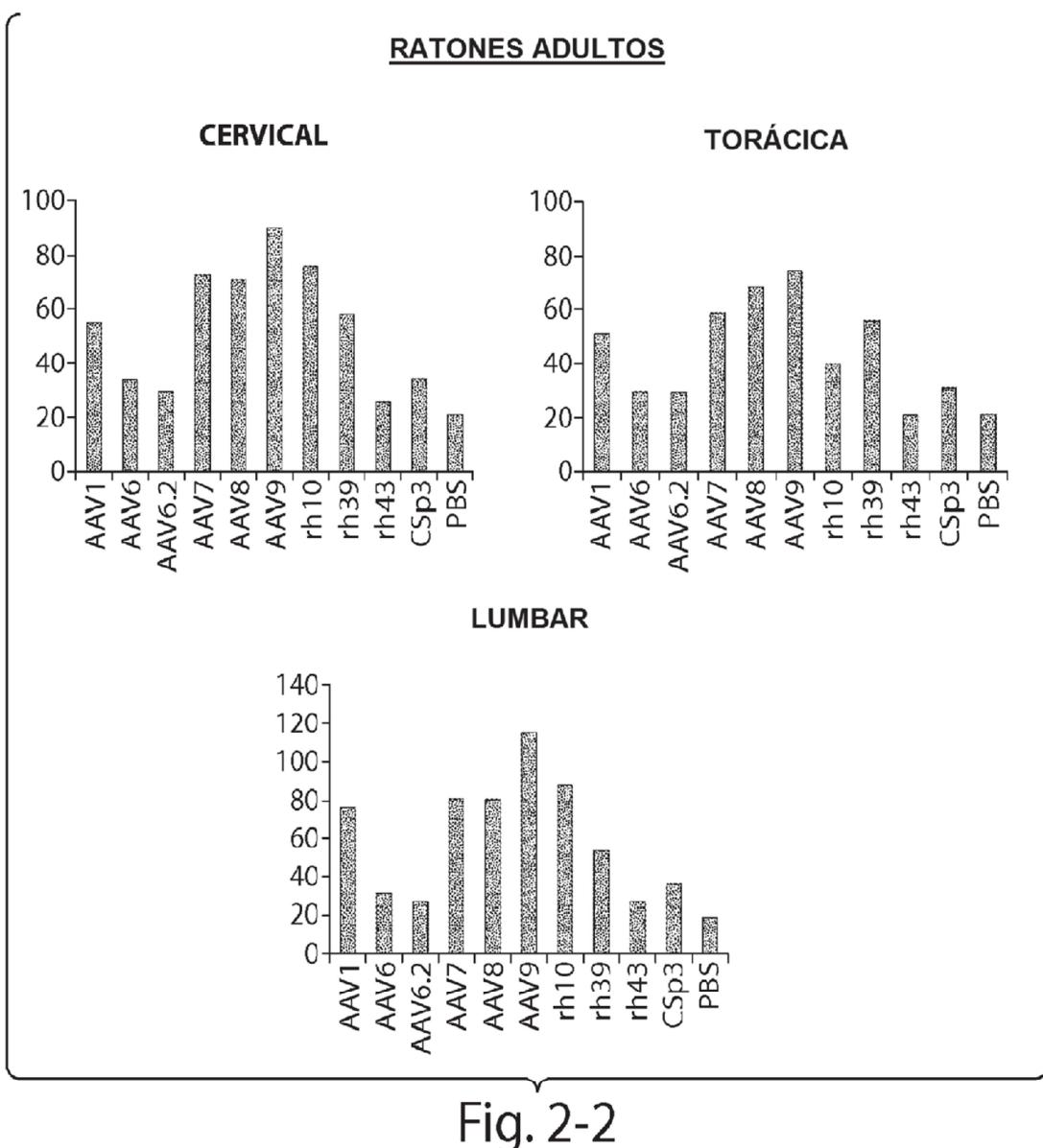


Fig. 2-1



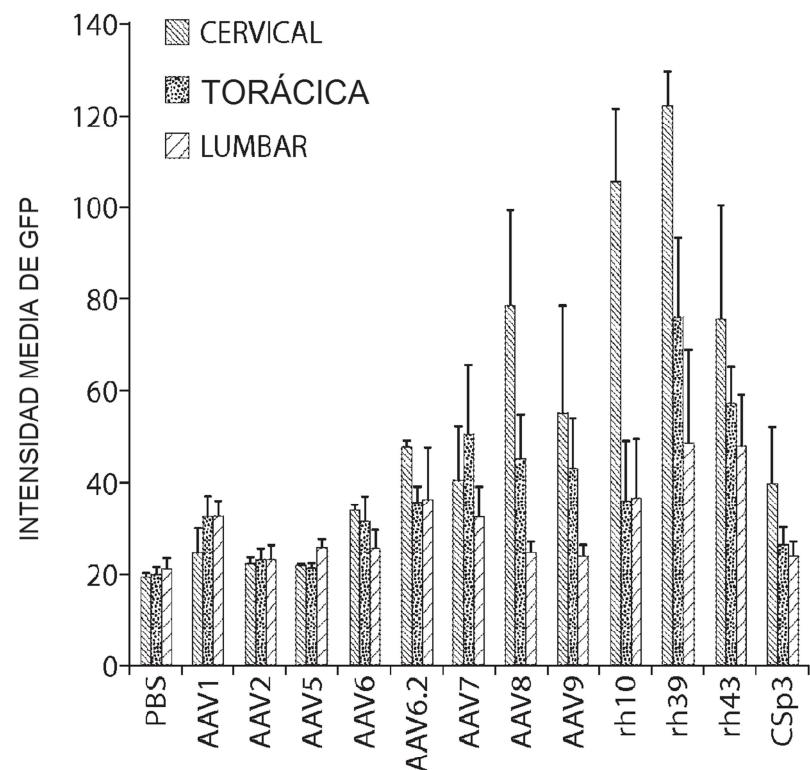


Fig. 3

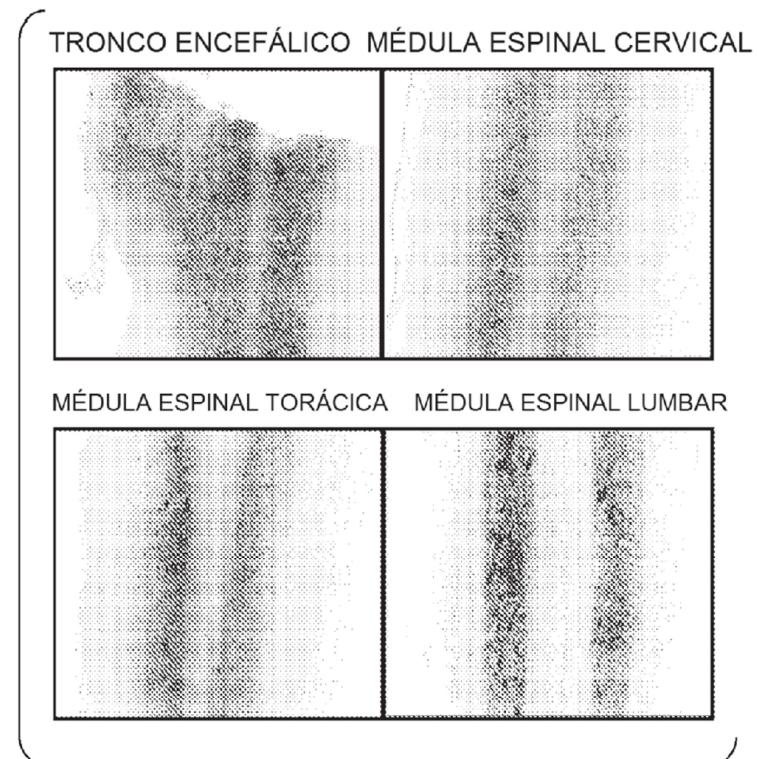


Fig. 4A

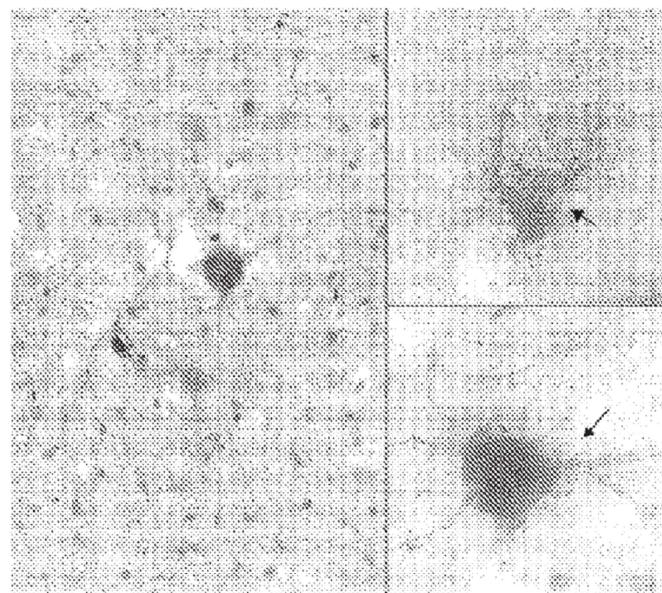


Fig. 4B



Fig. 5A

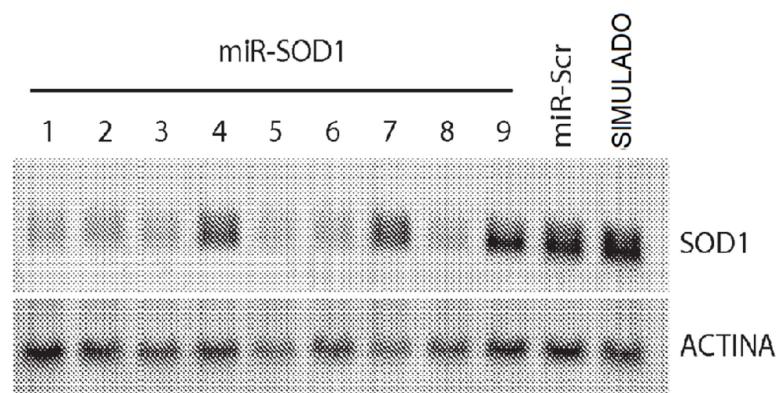


Fig. 5B

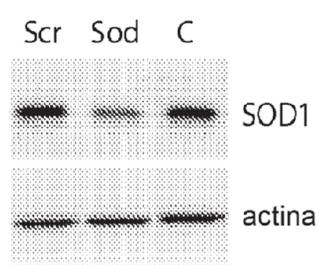


Fig. 5C

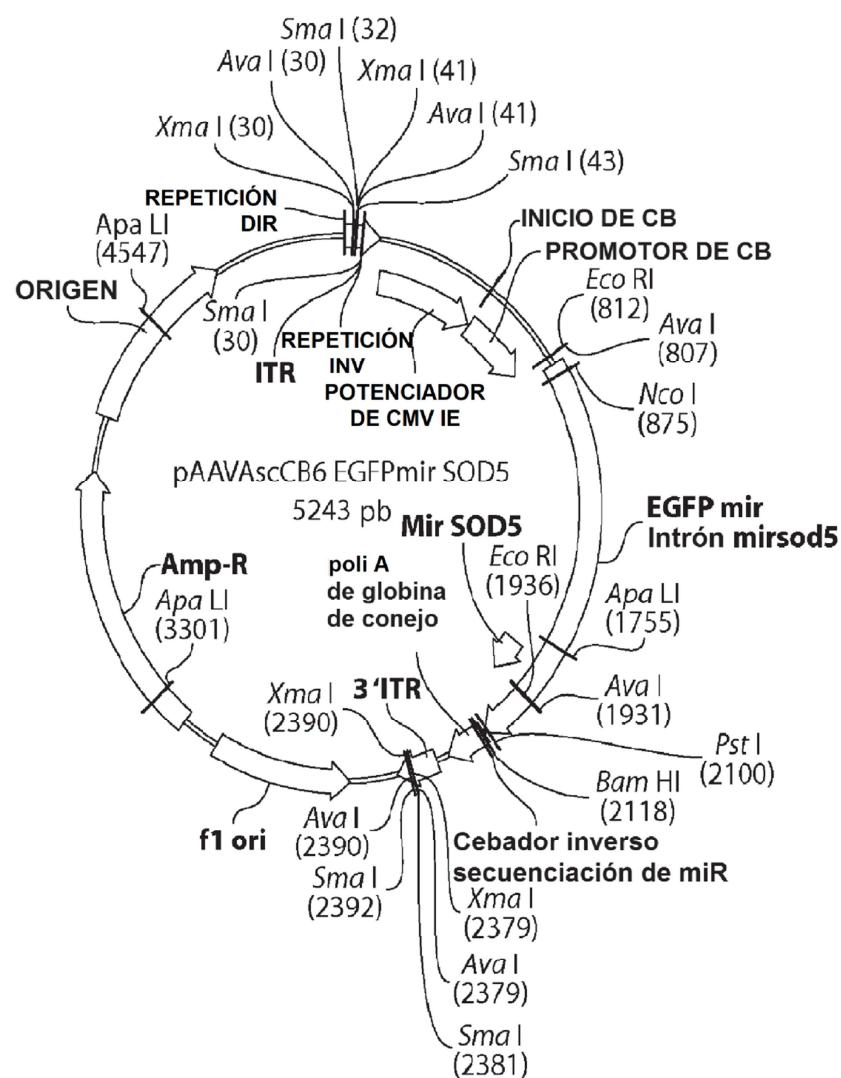


Fig. 5D

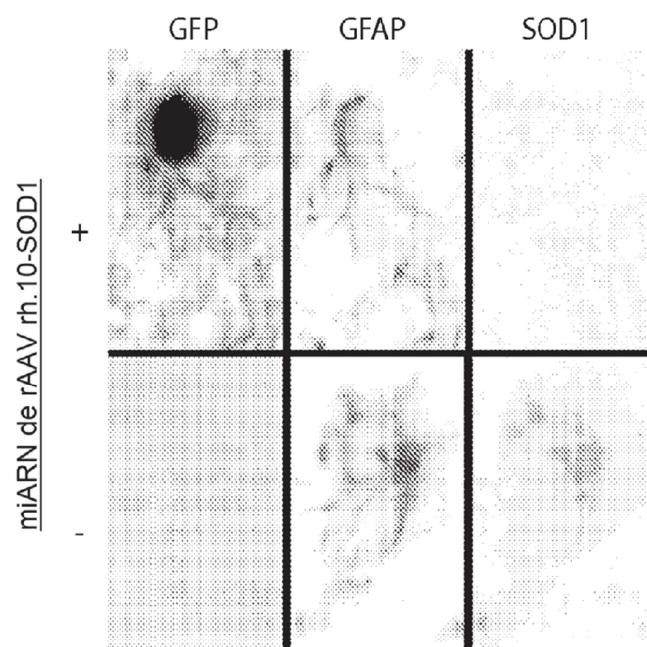


Fig. 6A

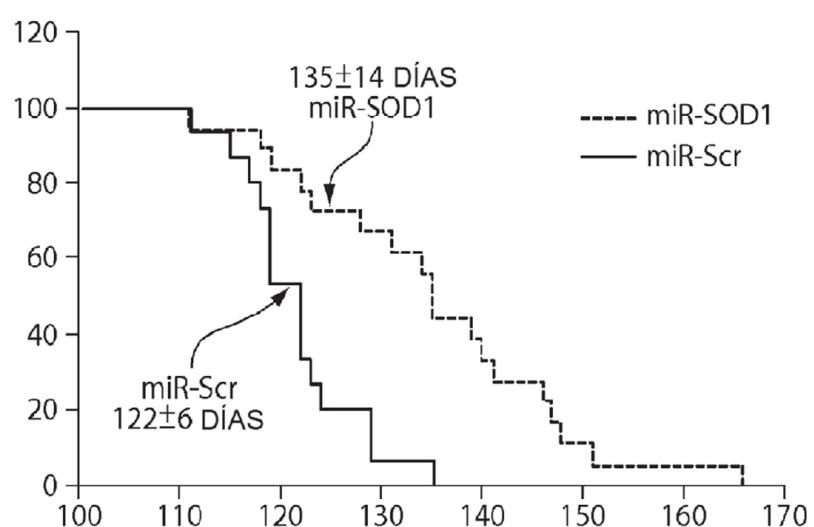


Fig. 6B

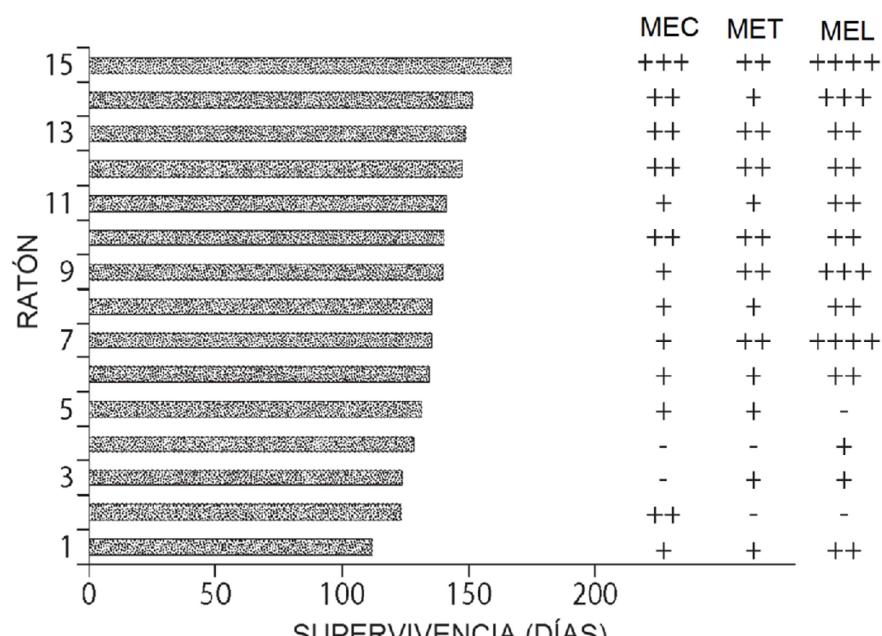


Fig. 7A

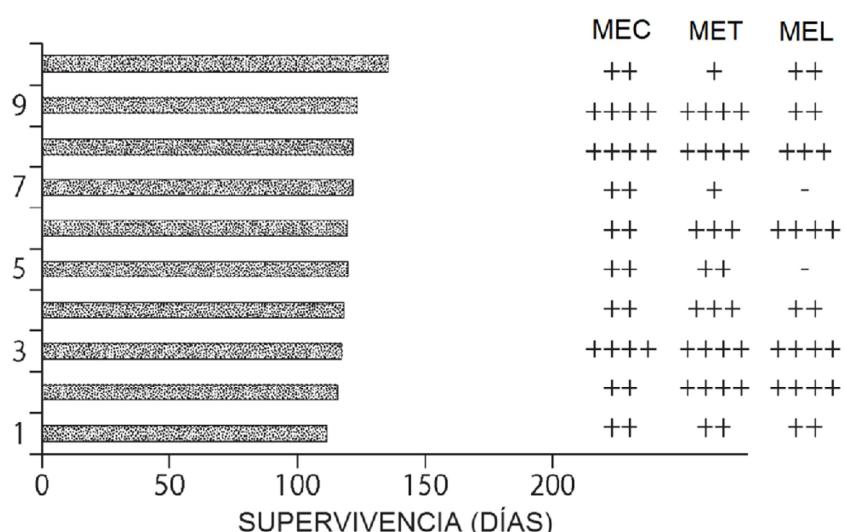


Fig. 7B

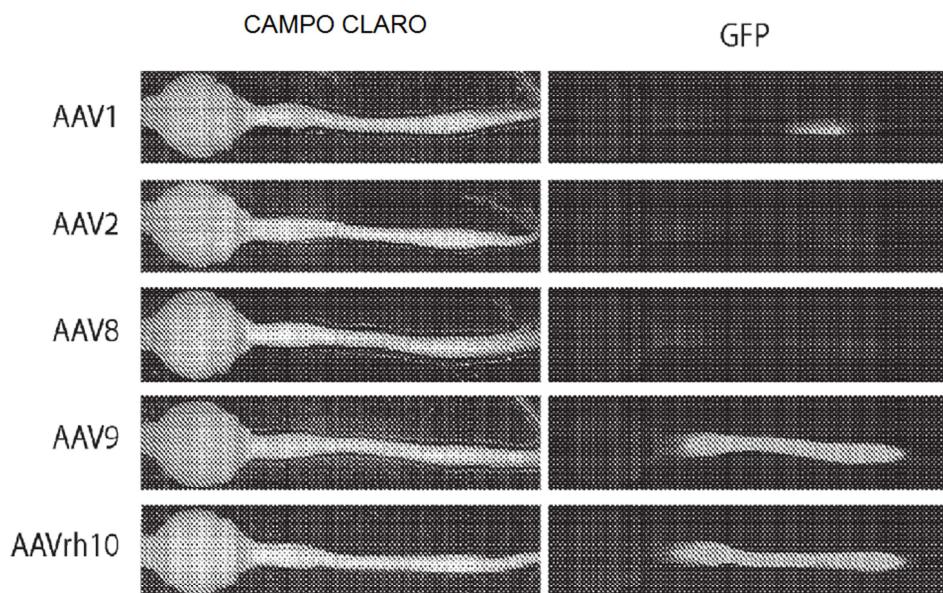


Fig. 8

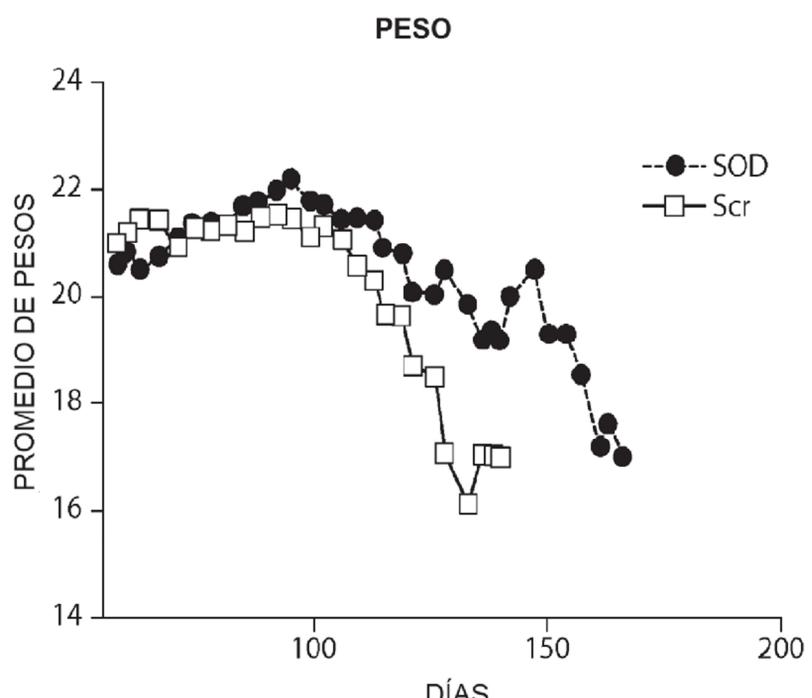
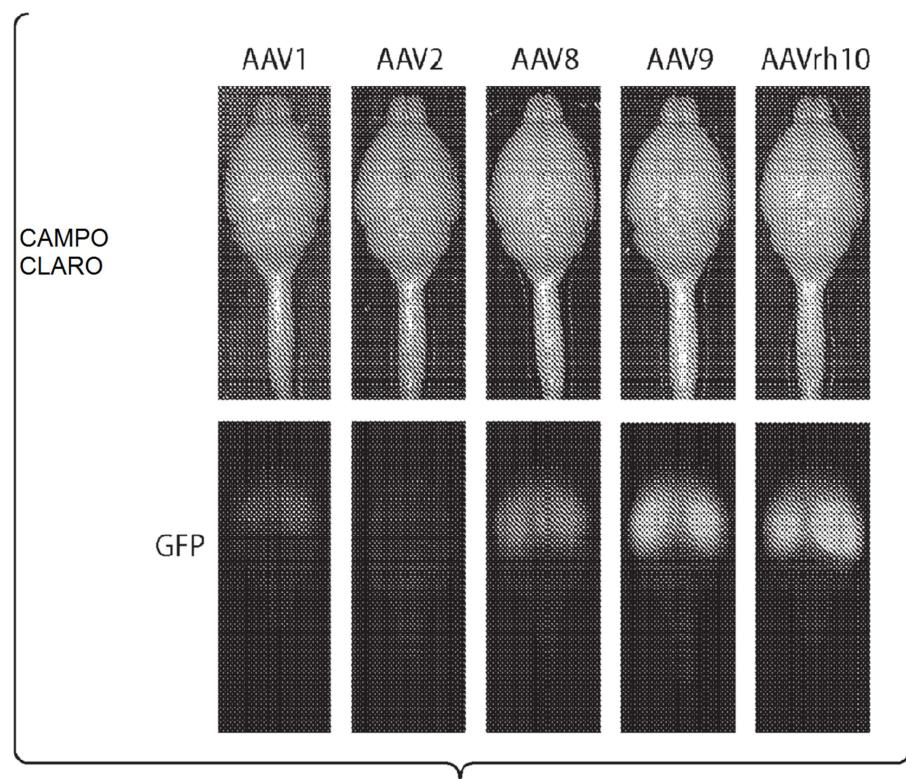


Fig. 9



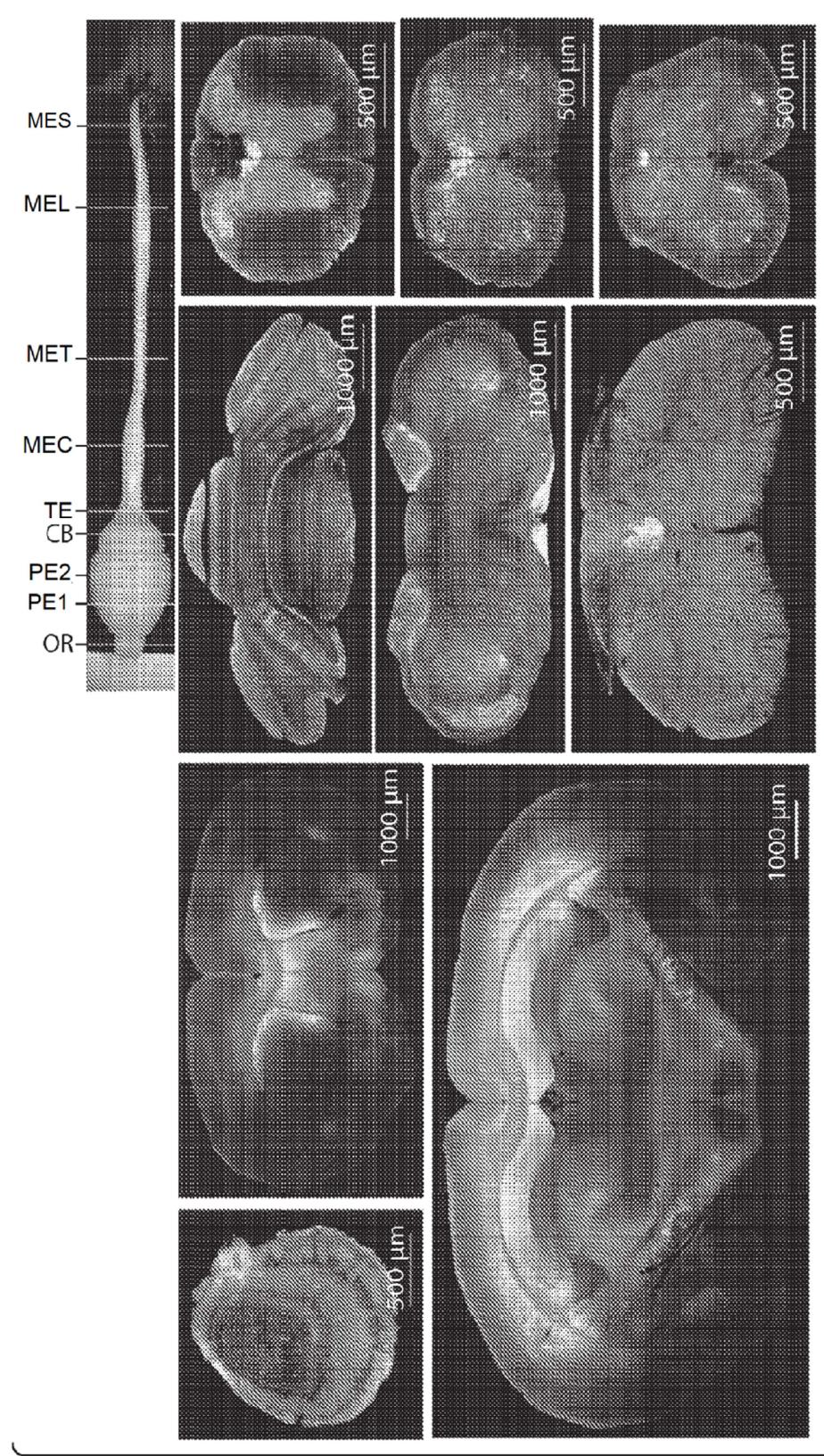


Fig. 11

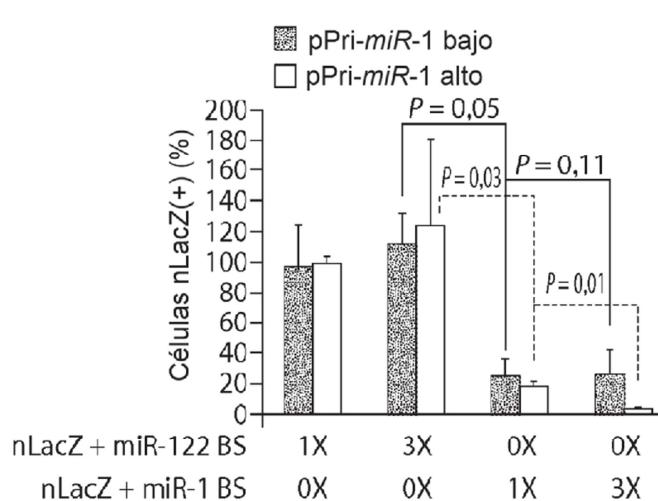
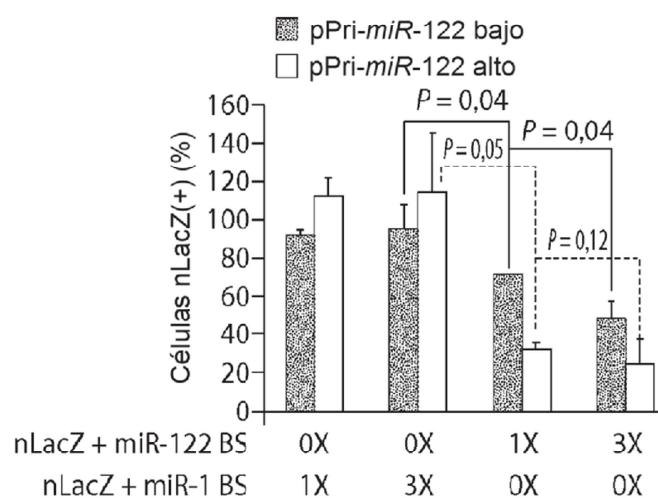
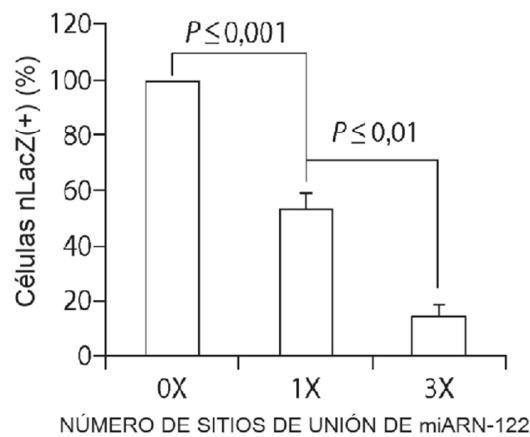


Fig. 12C

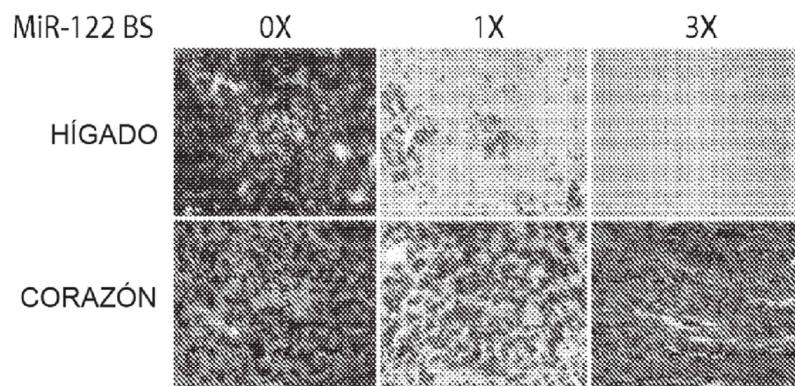


Fig. 13A

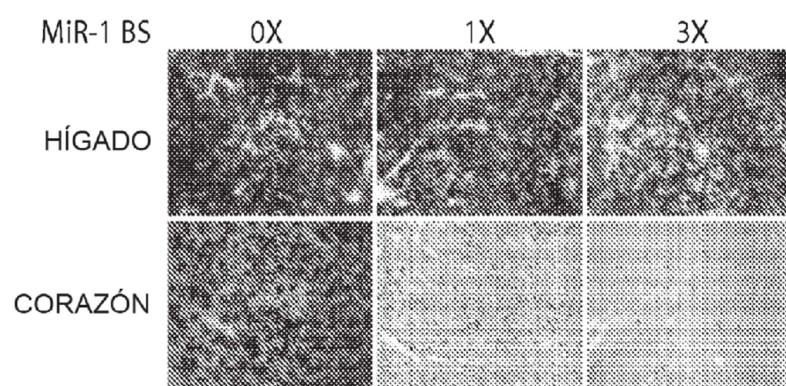


Fig. 13B

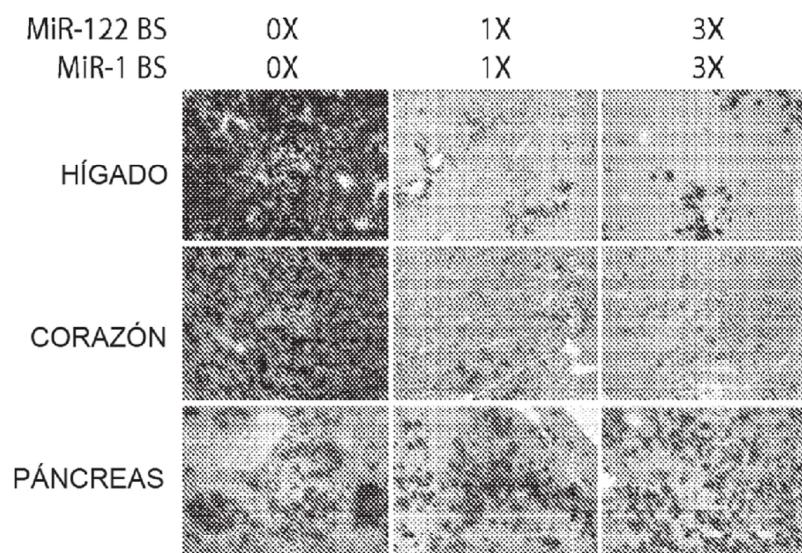
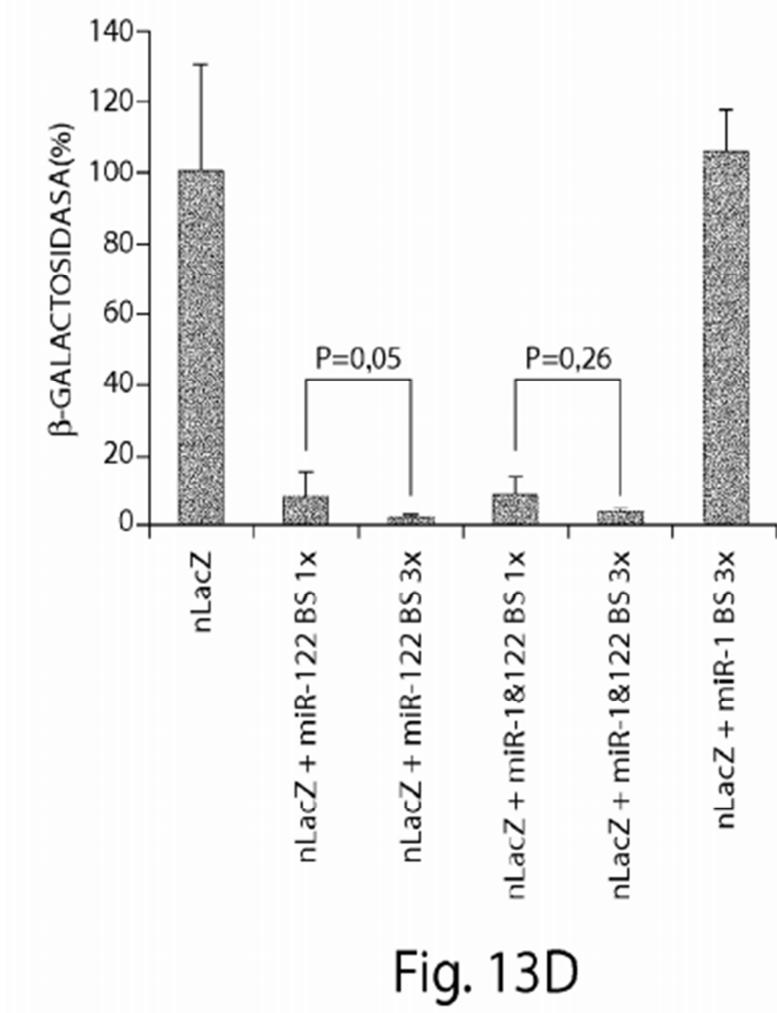
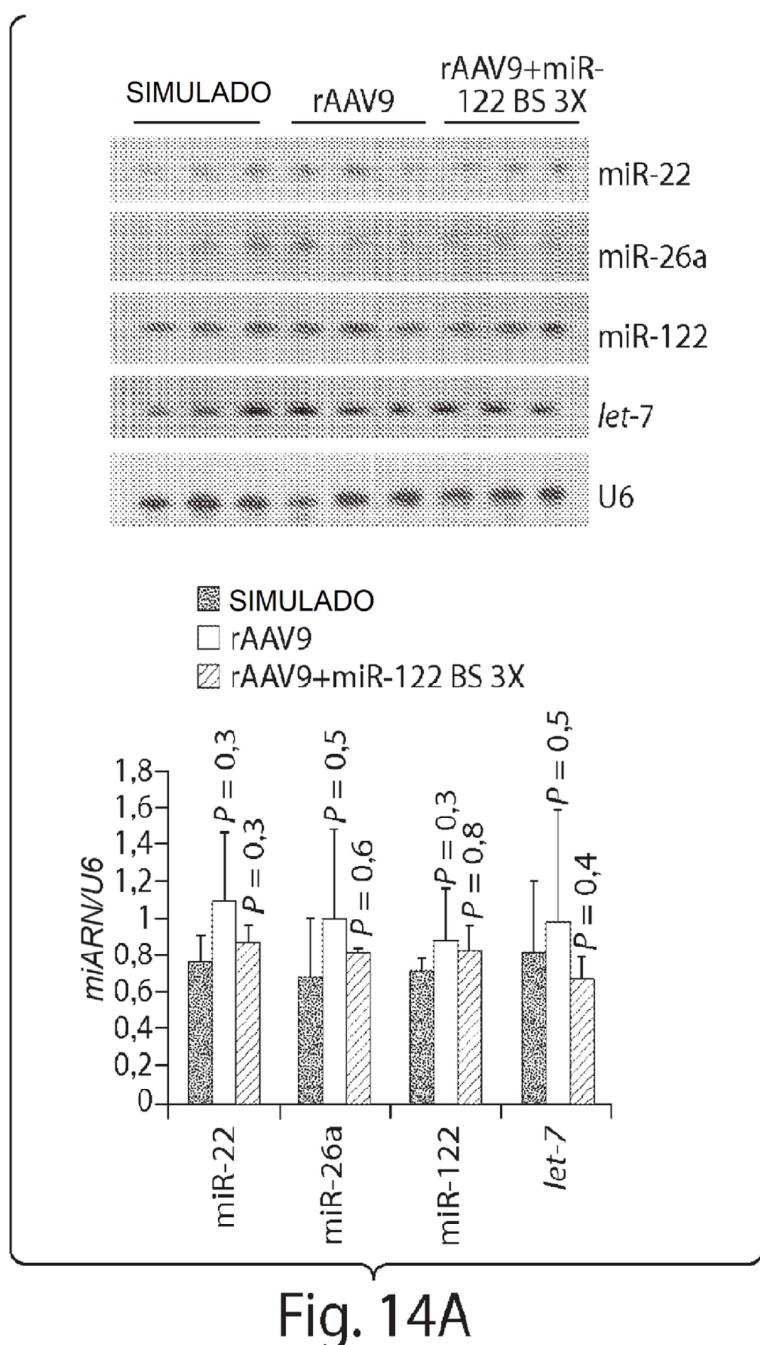


Fig. 13C





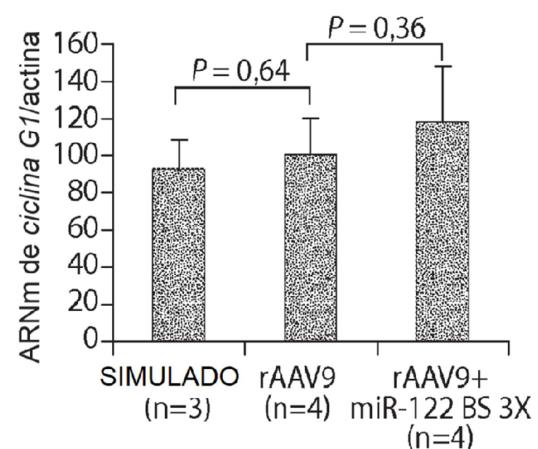


Fig. 14B

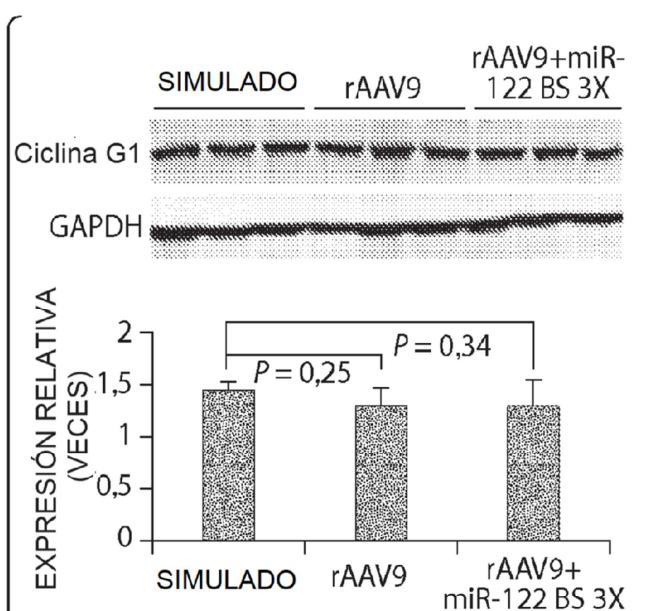


Fig. 14C

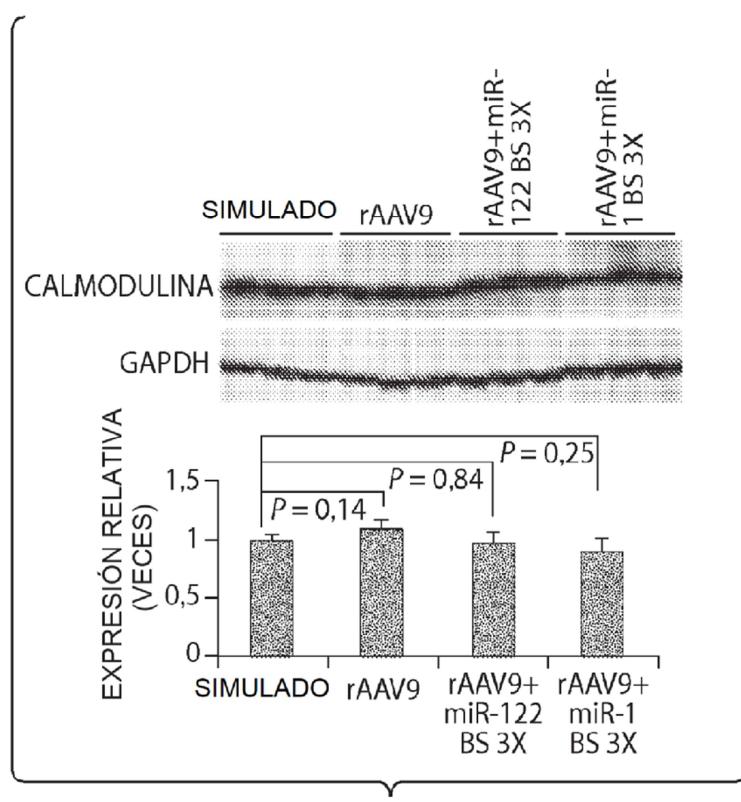


Fig. 14D

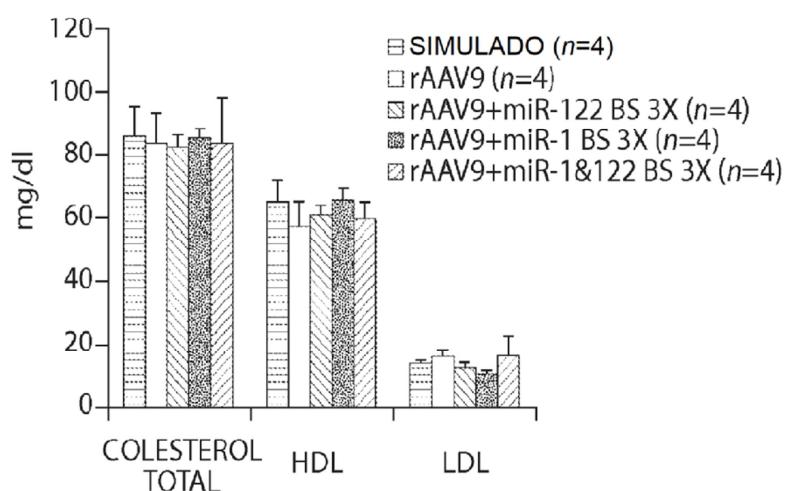
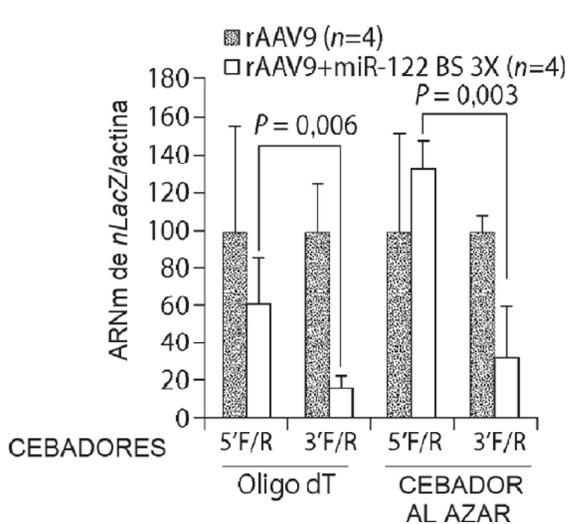
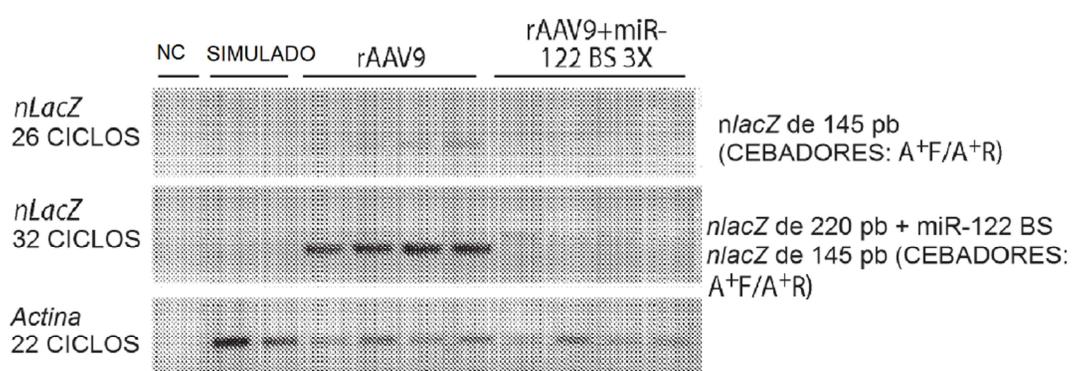
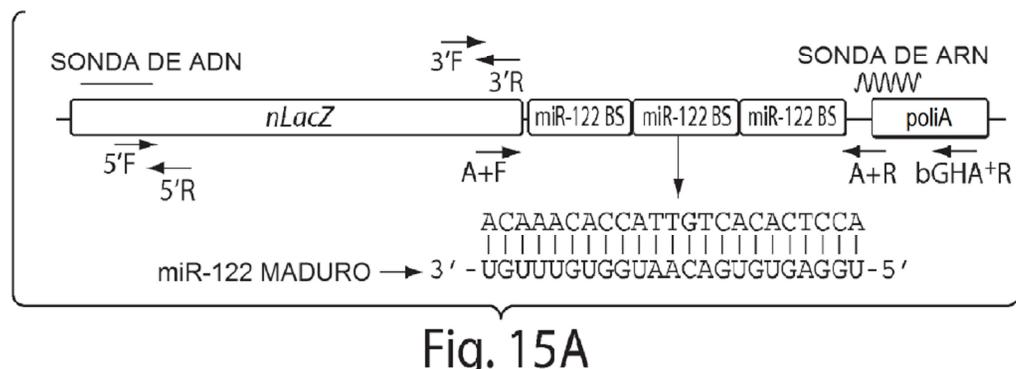


Fig. 14E

**Fig. 15C**

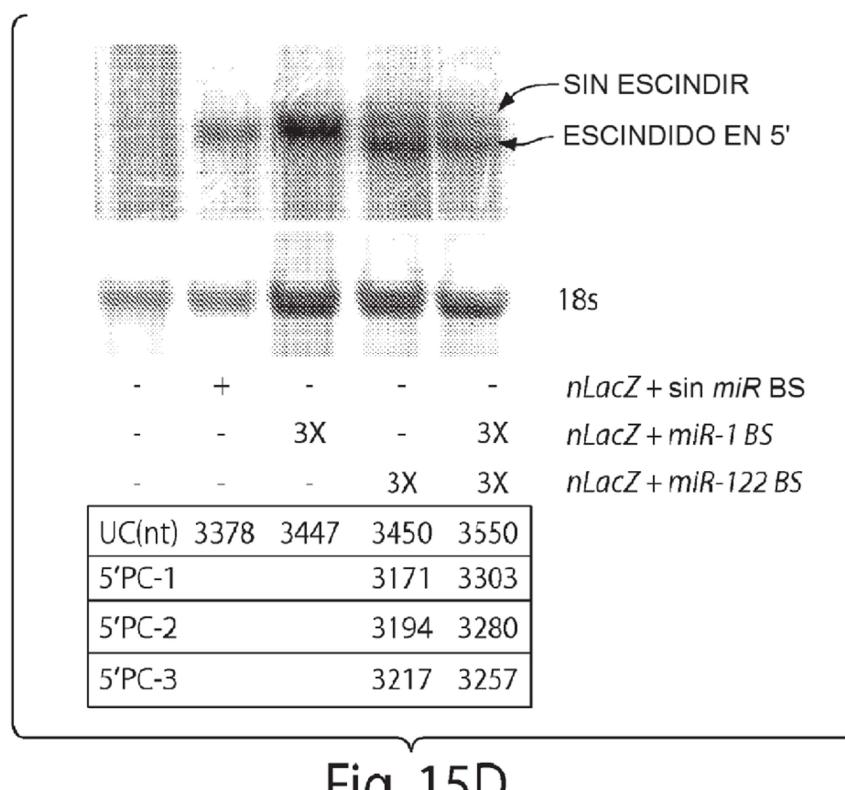


Fig. 15D

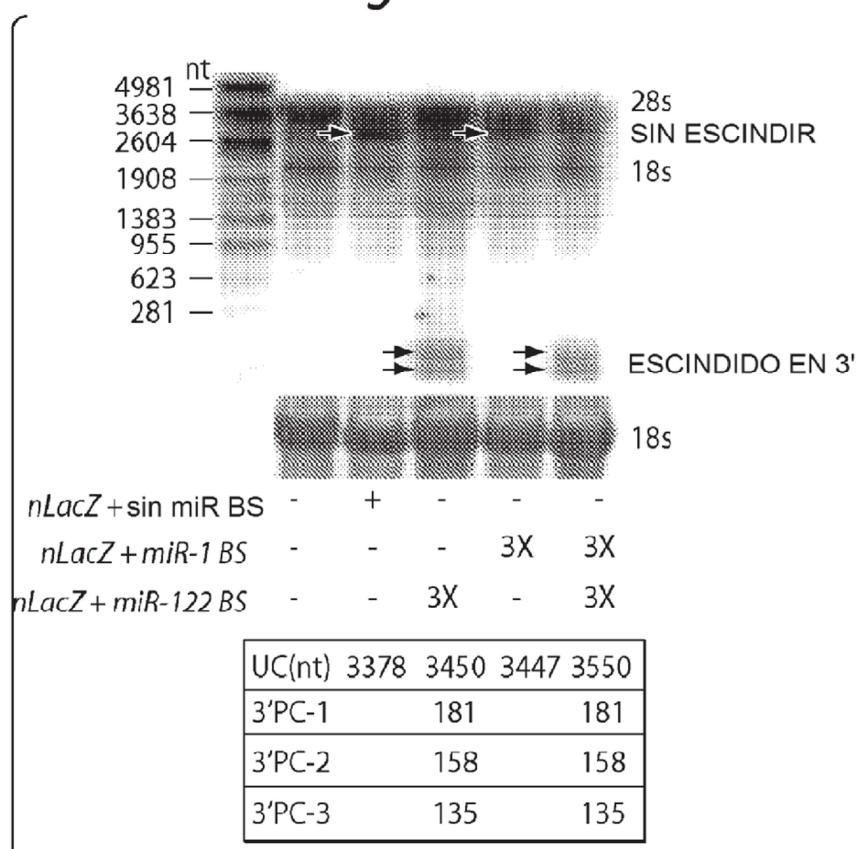


Fig. 15E

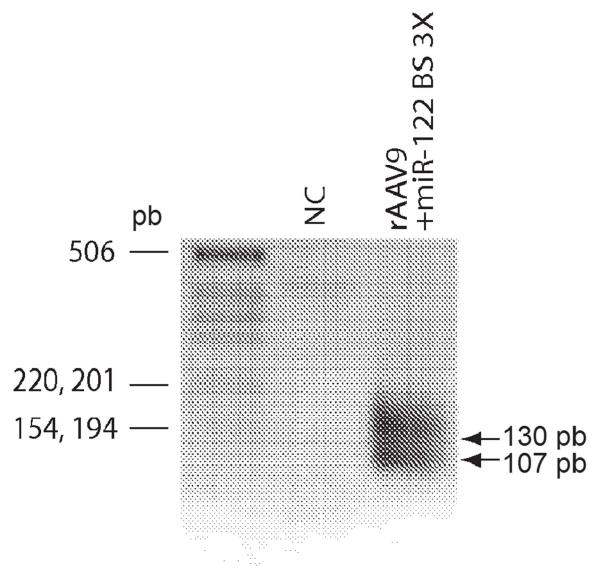


Fig. 15F

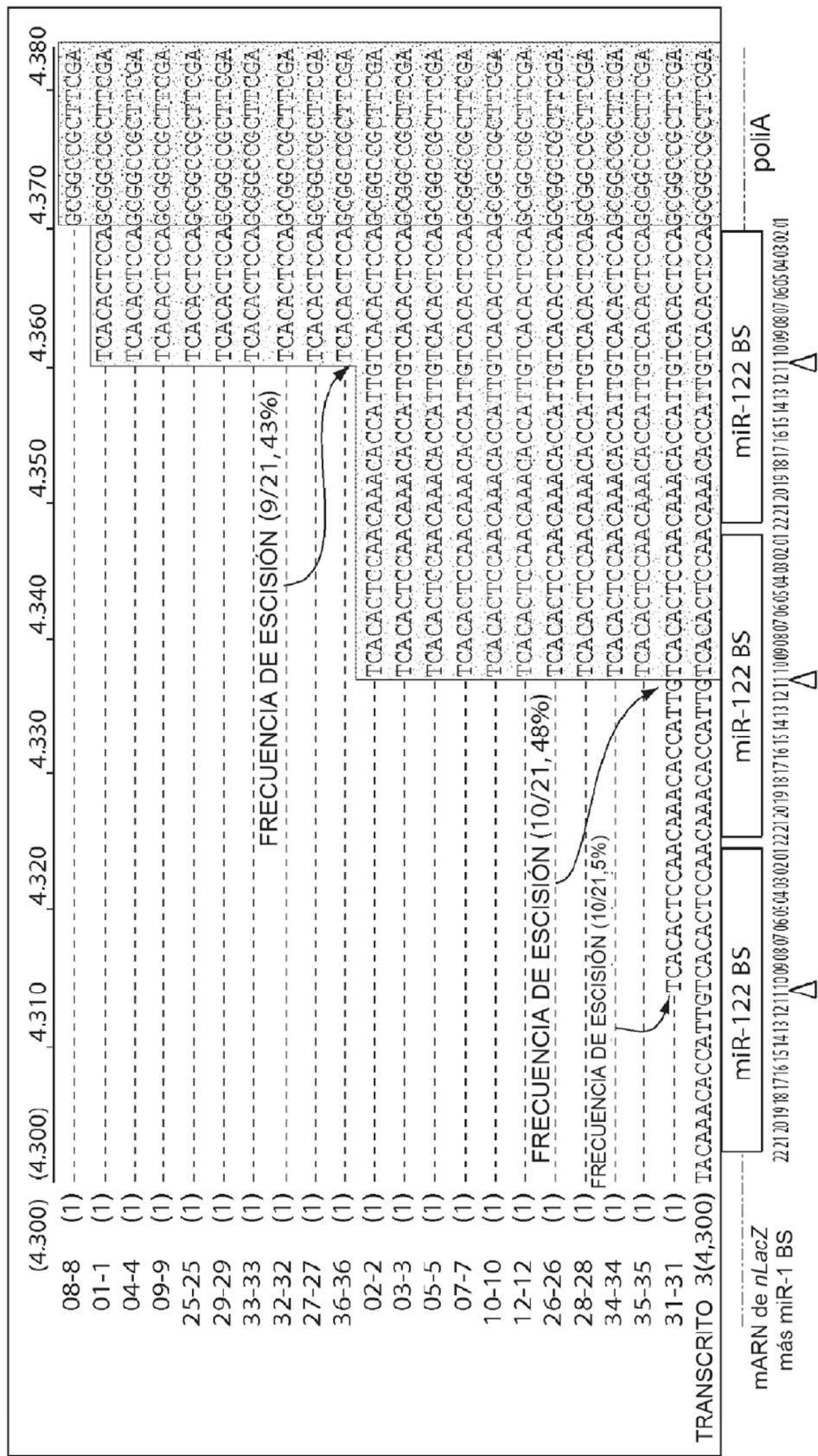


Fig. 16A

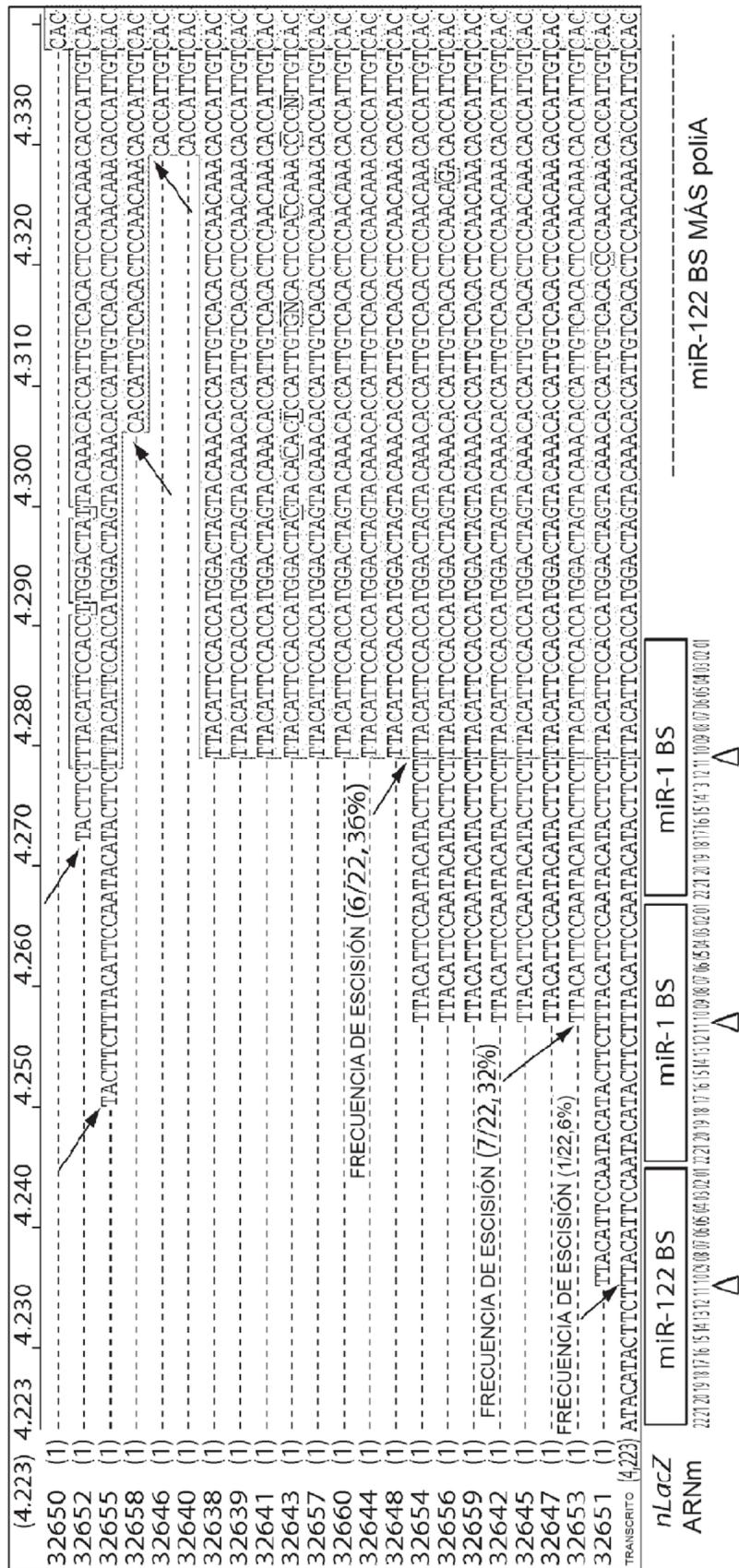


Fig. 16B

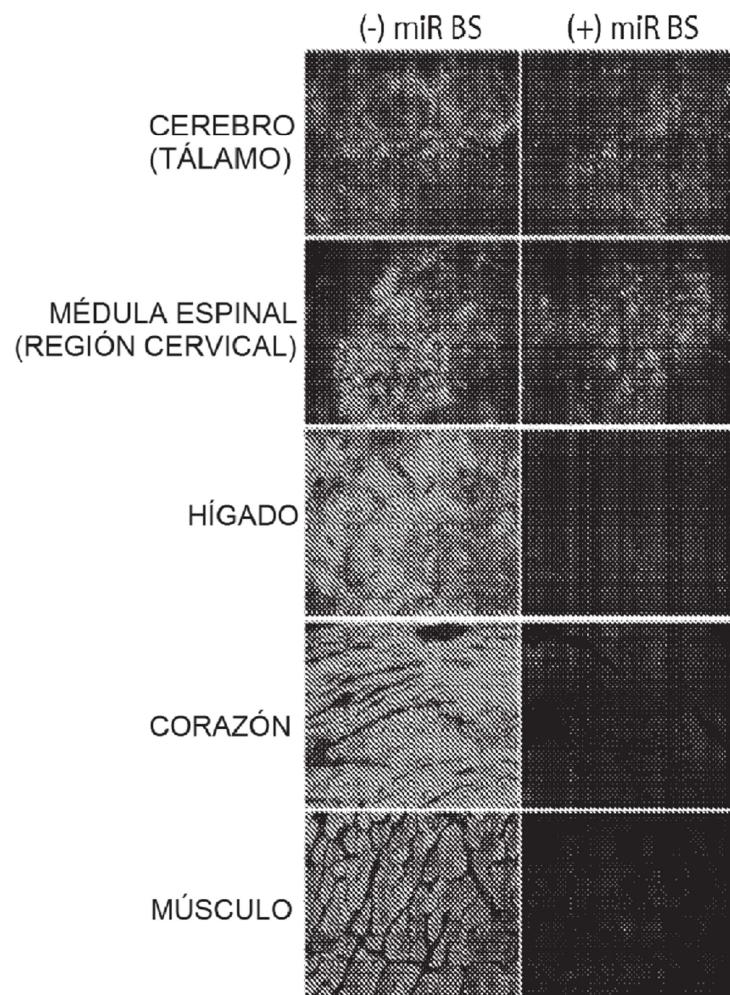


Fig. 17A

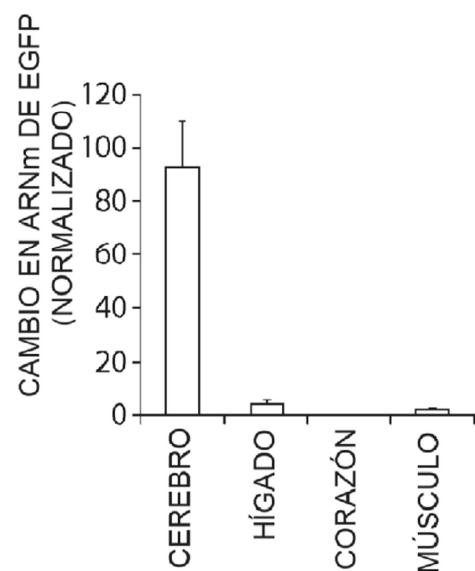


Fig. 17B

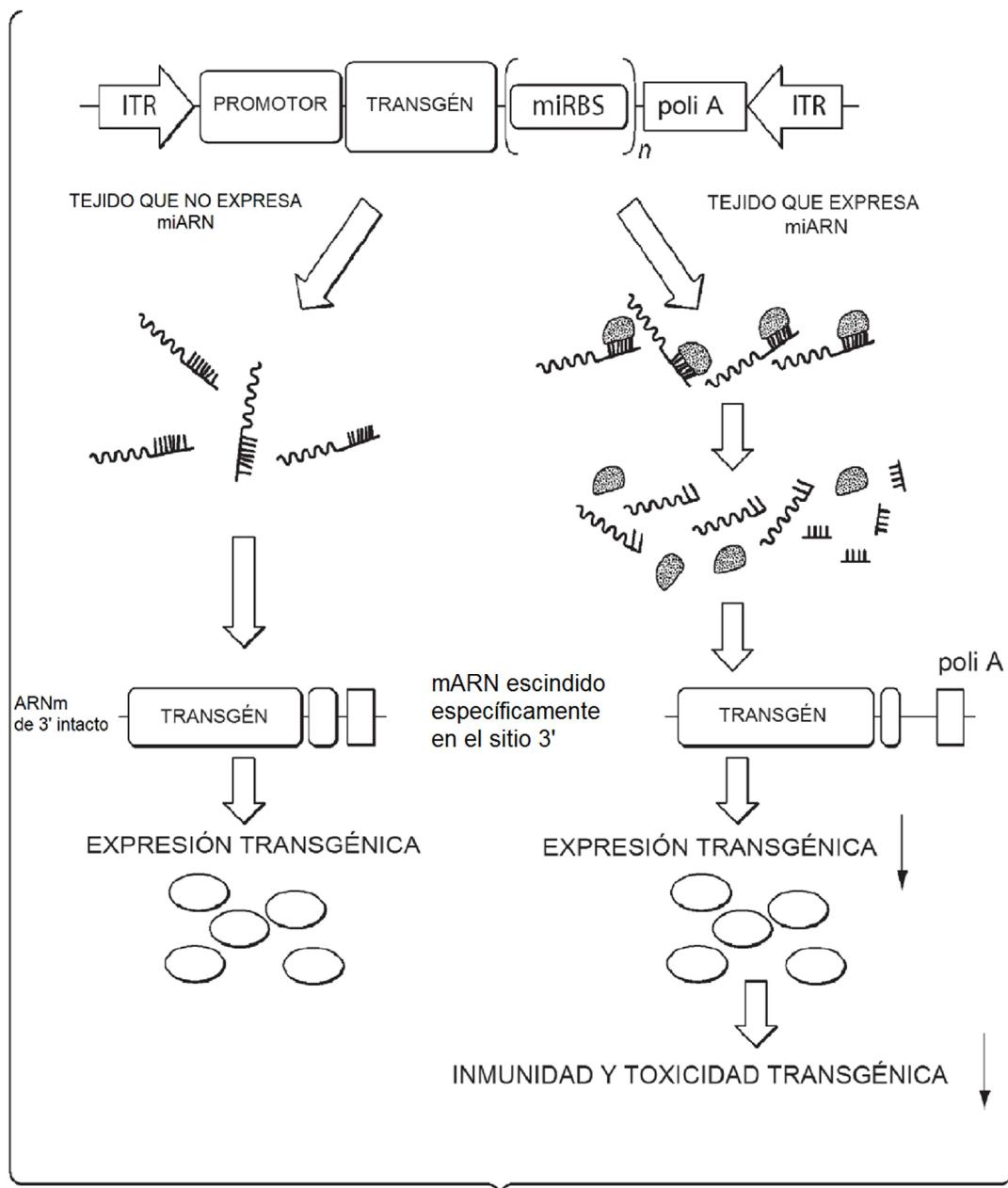


Fig. 18

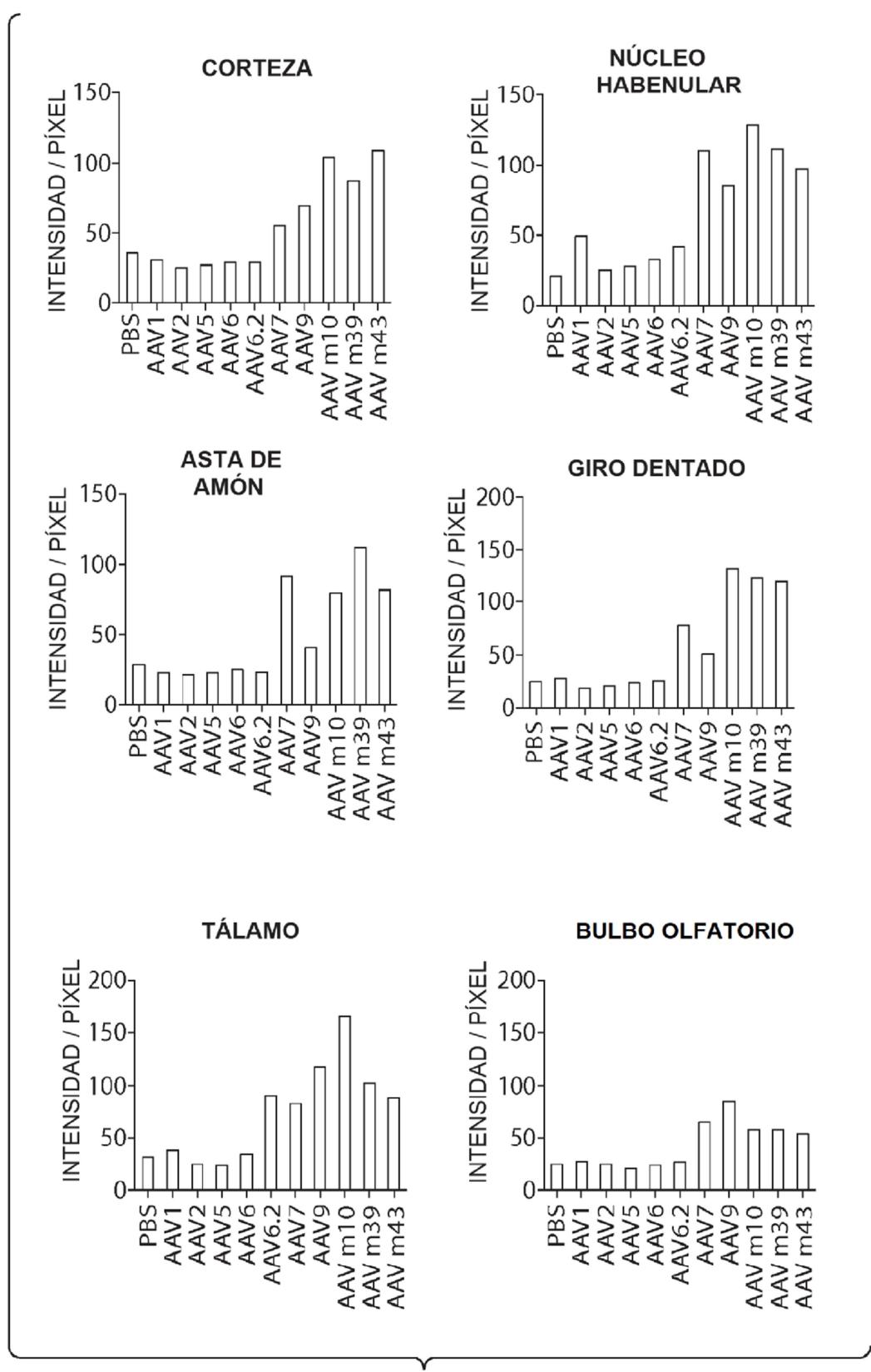


Fig. 19A-1

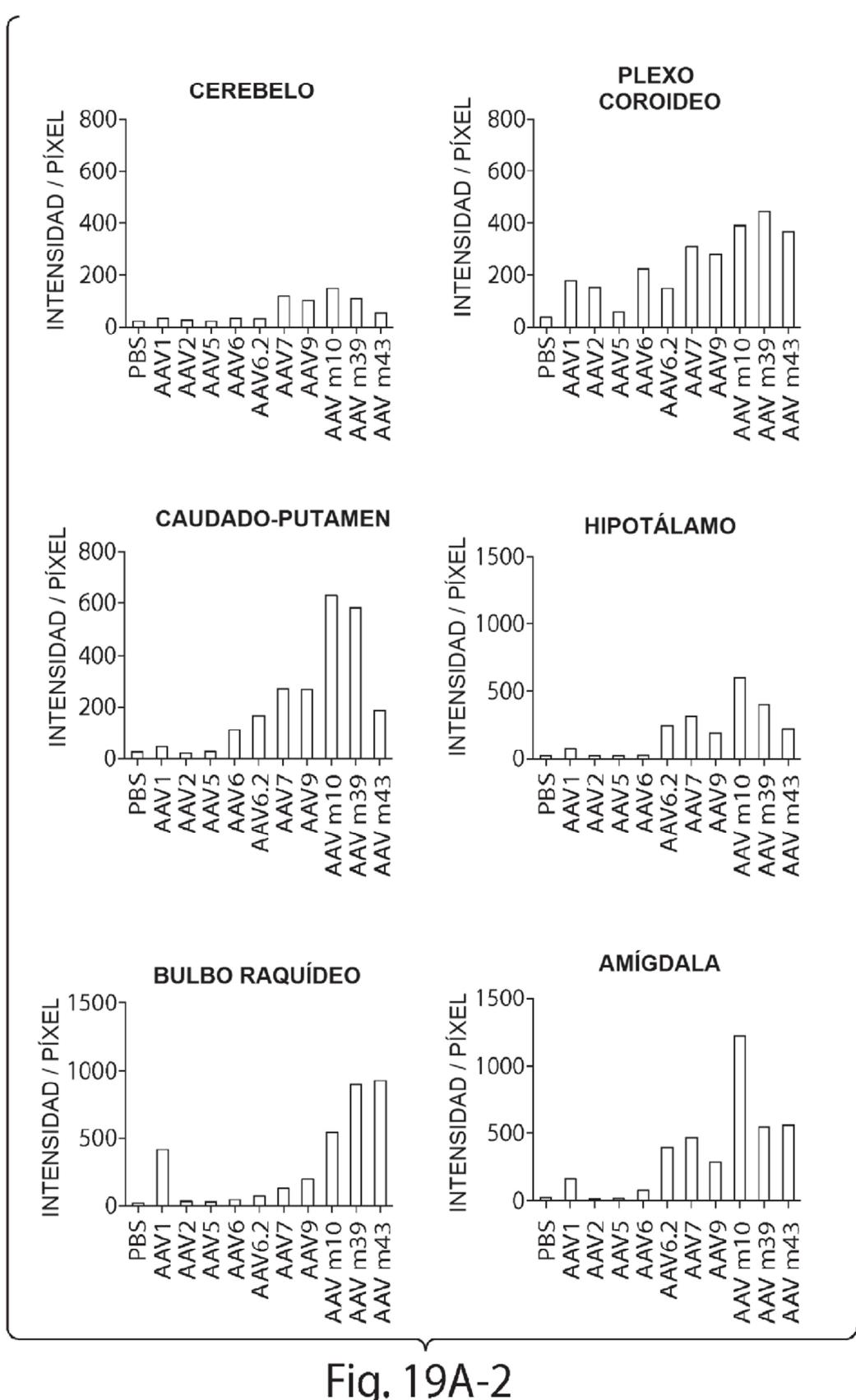


Fig. 19A-2

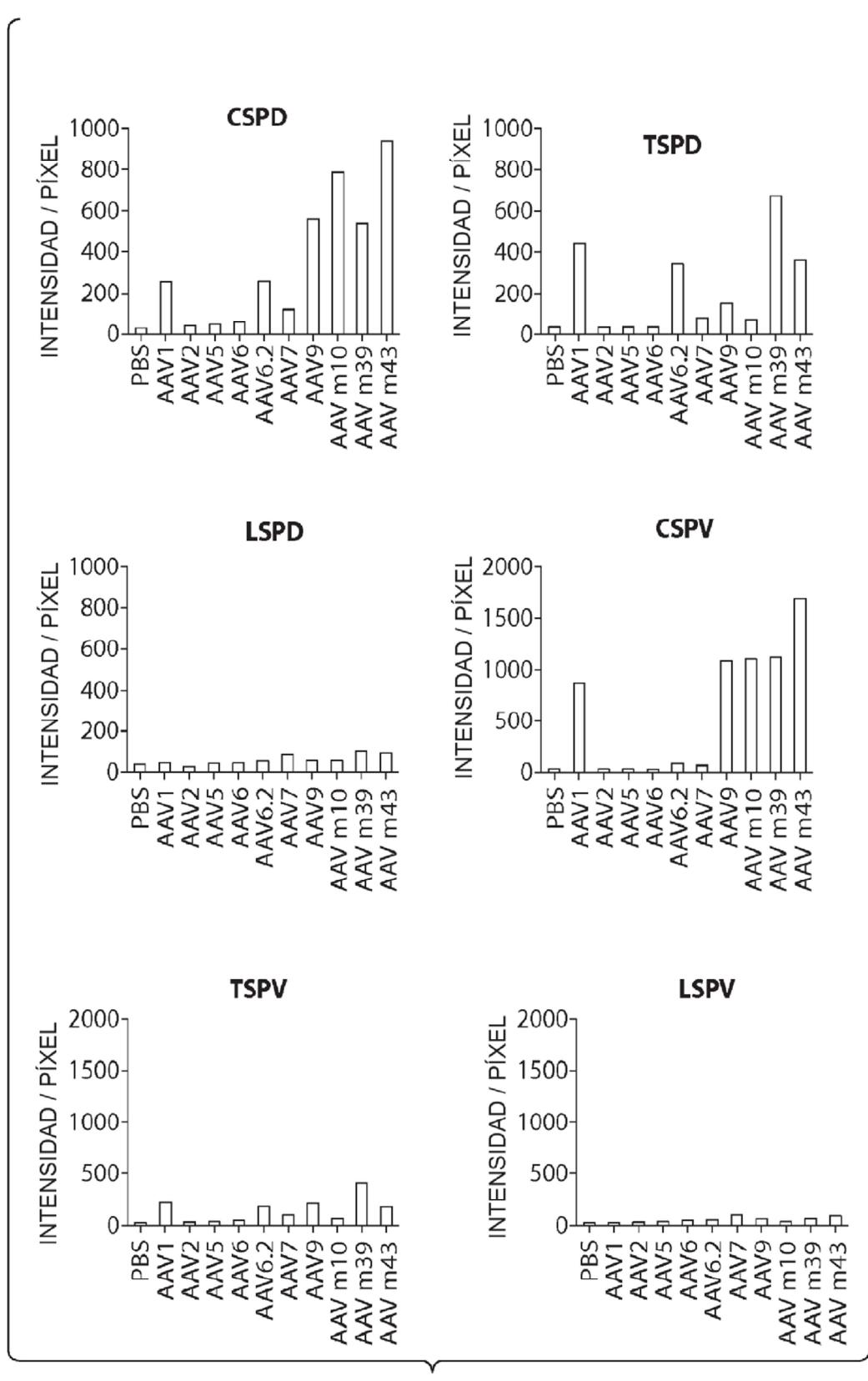


Fig. 19A-3

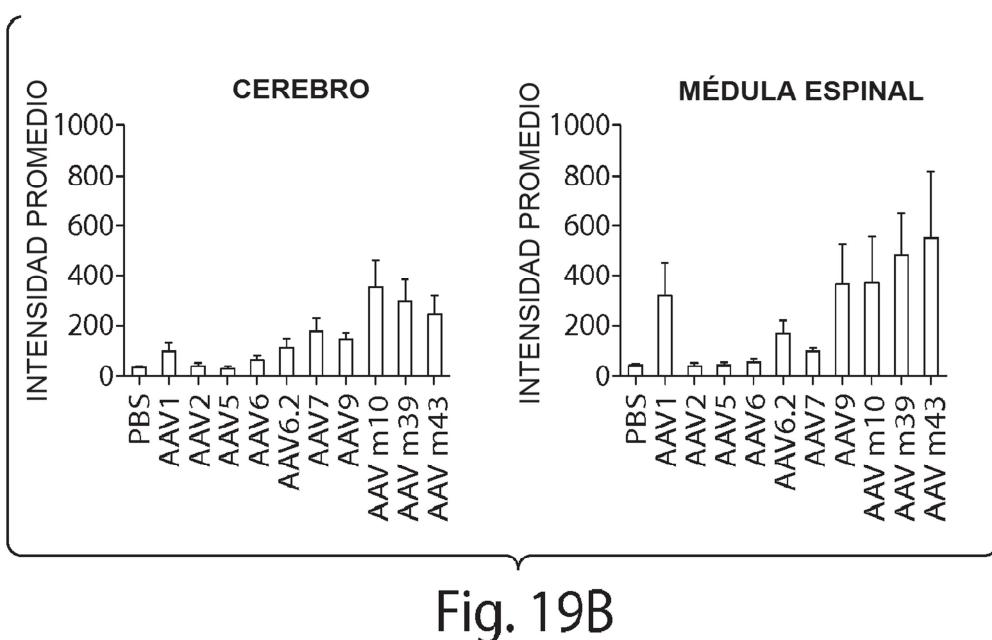


Fig. 19B

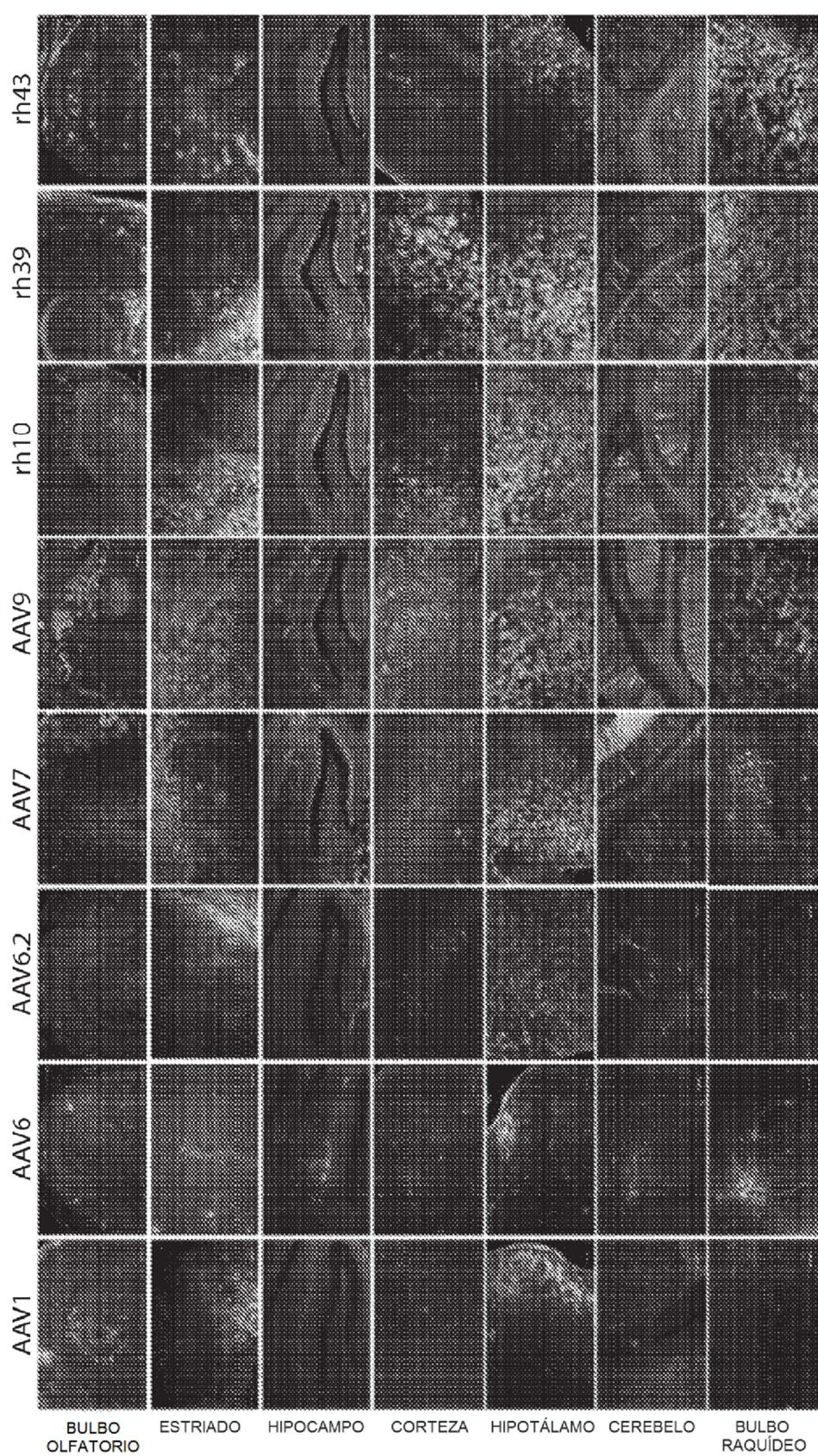


Fig. 20

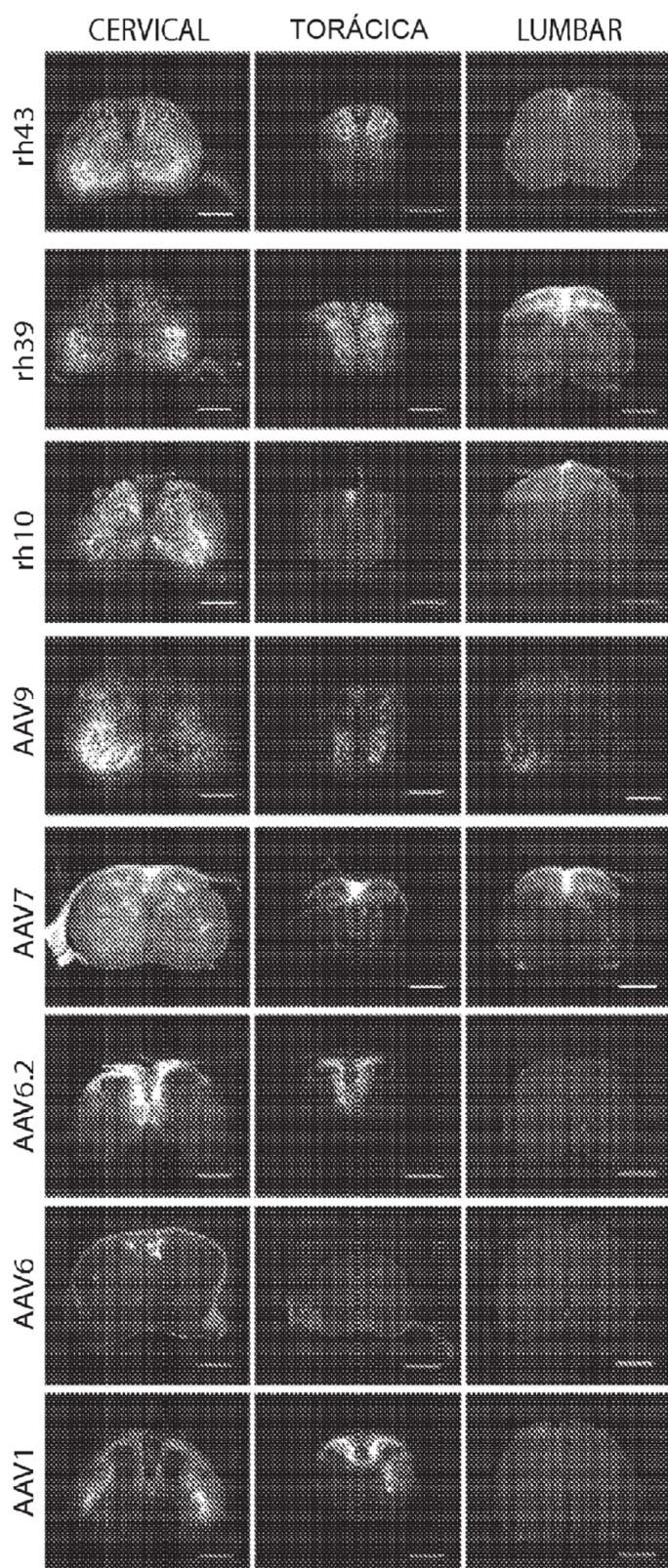


Fig. 21

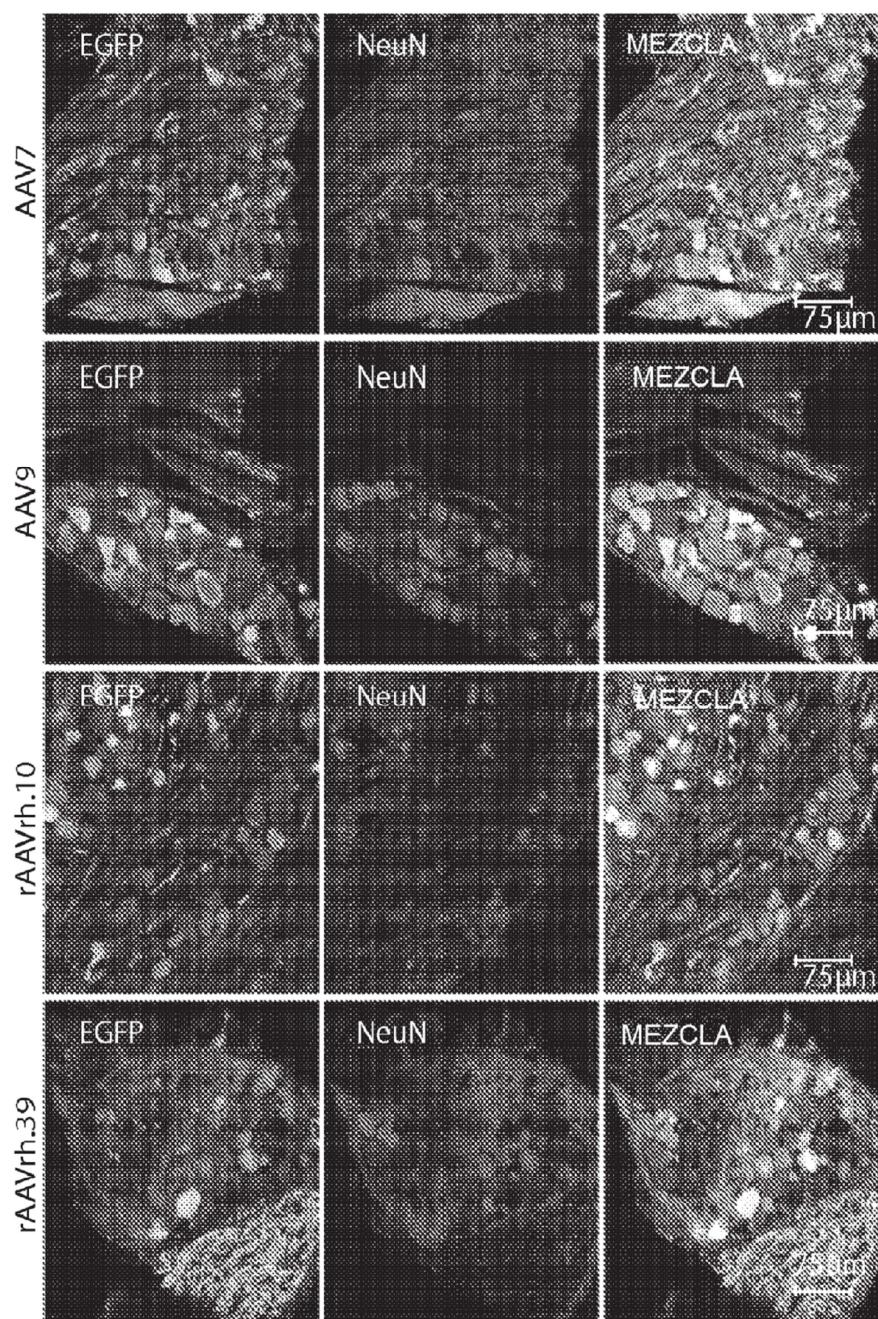


Fig. 22

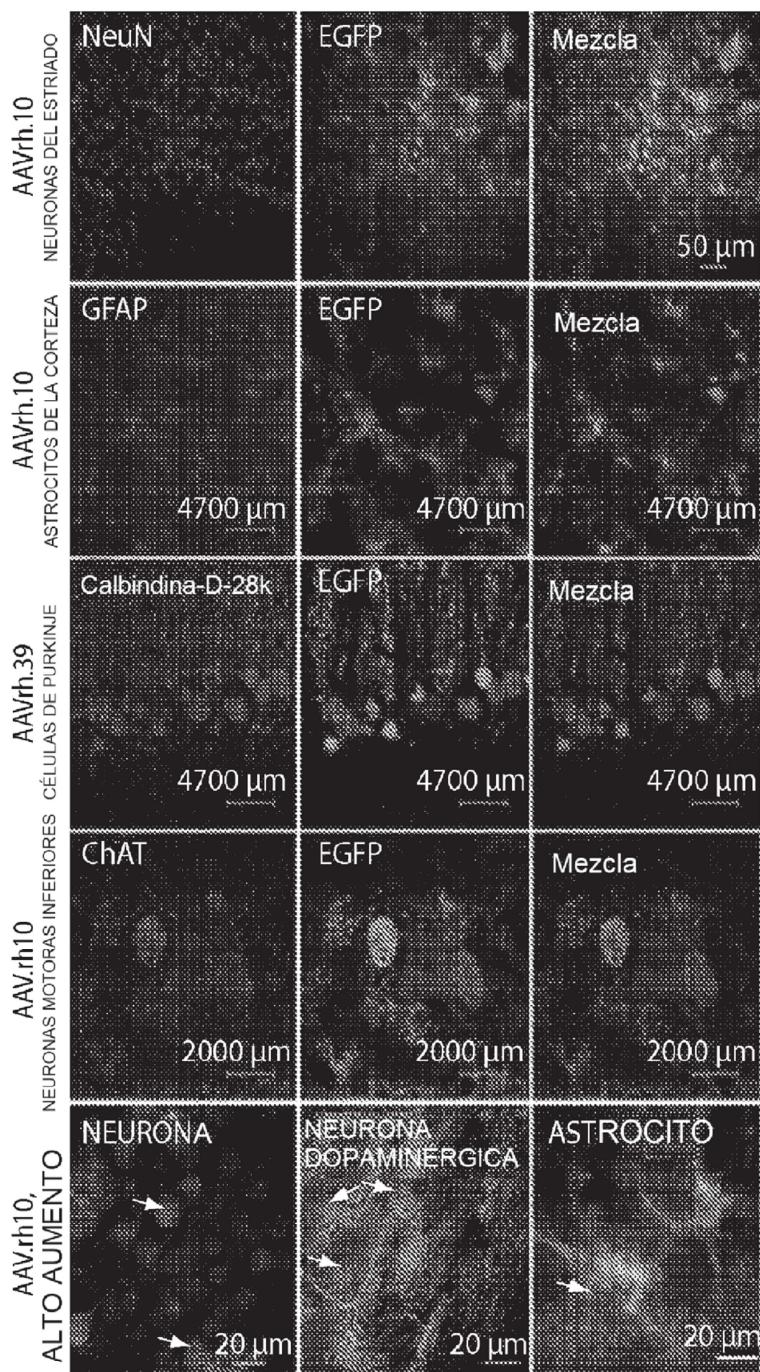


Fig. 23

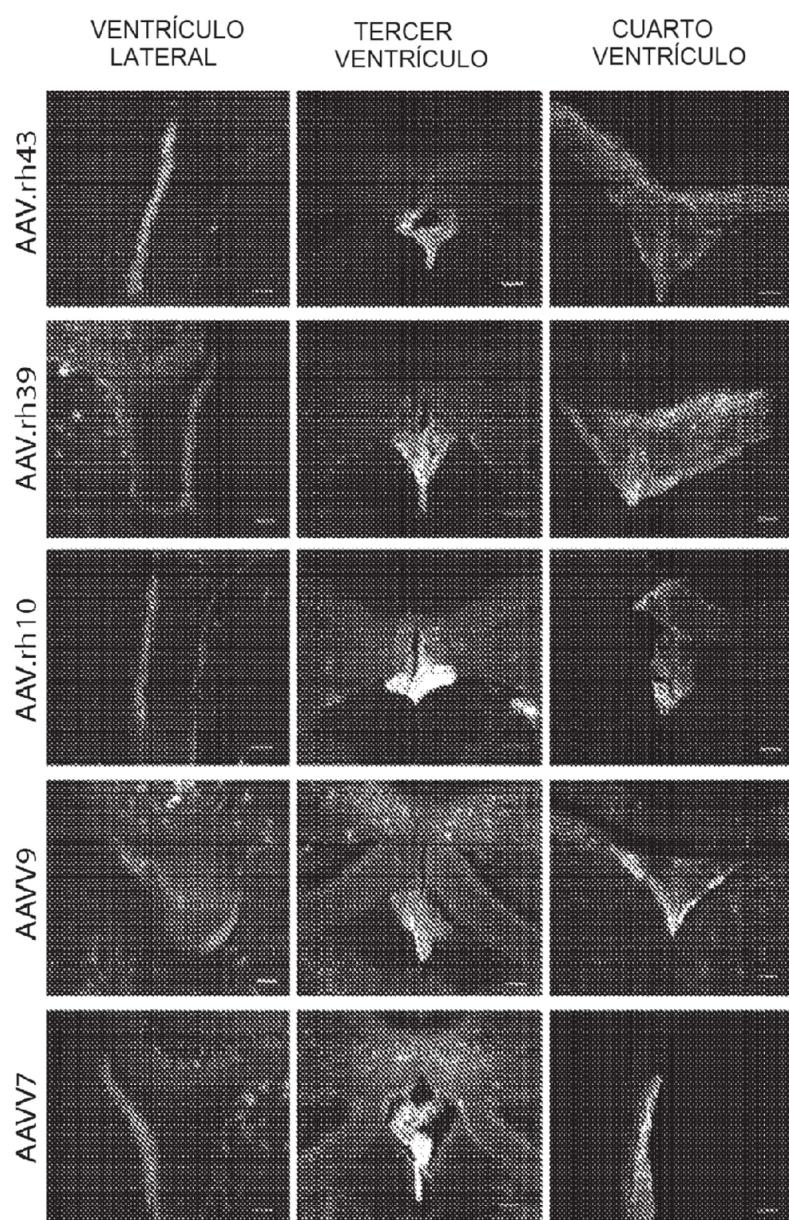


Fig. 24

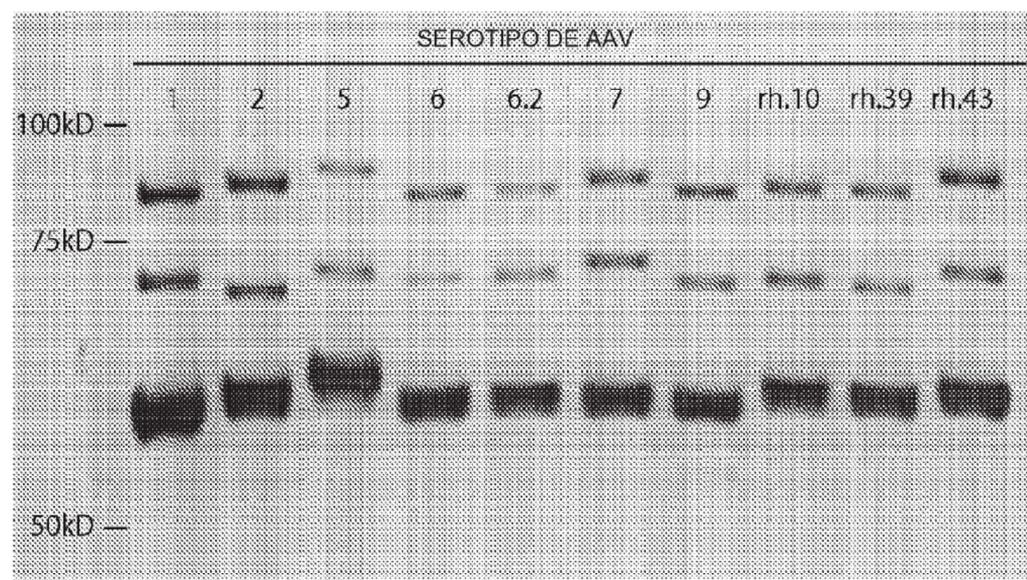


Fig. 25A

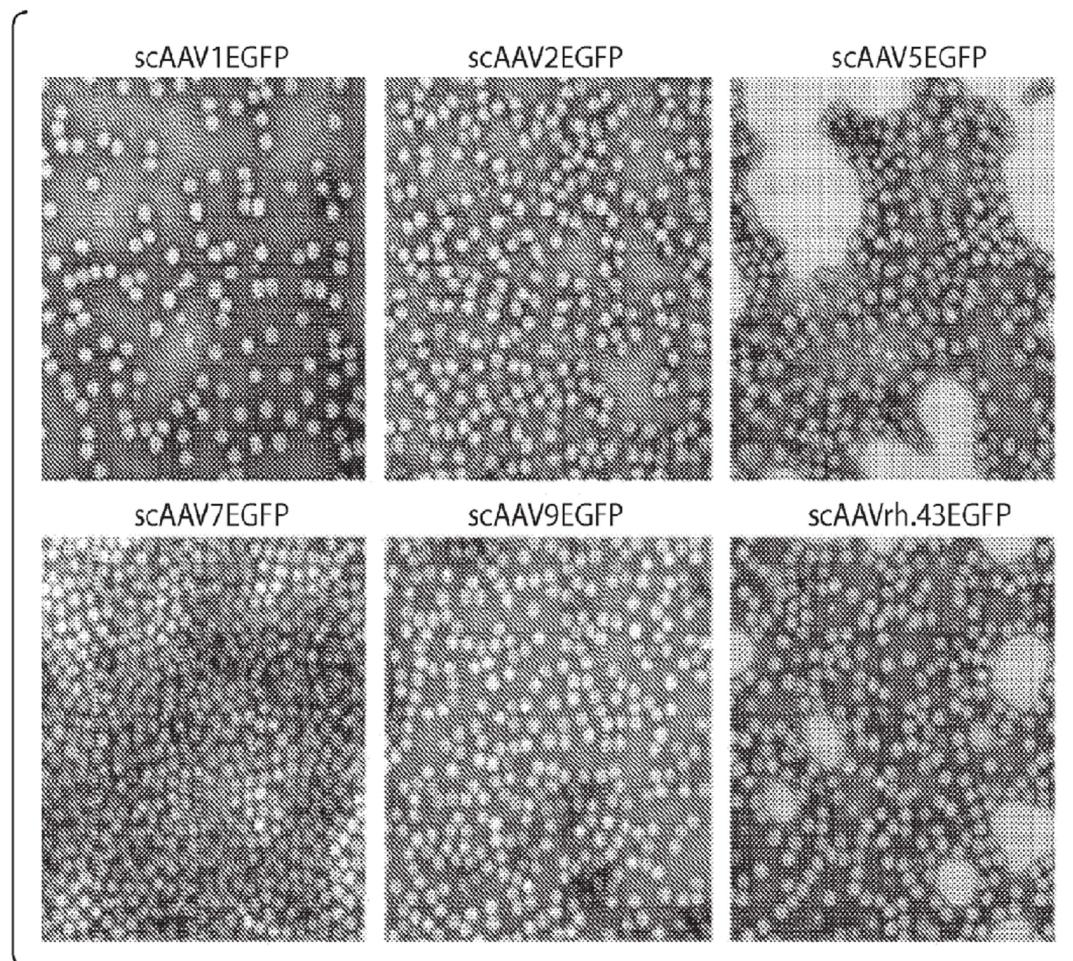


Fig. 25B

ES 2 698 203 T3

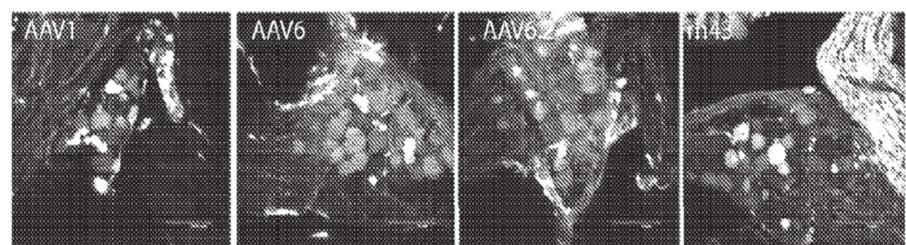


Fig. 26

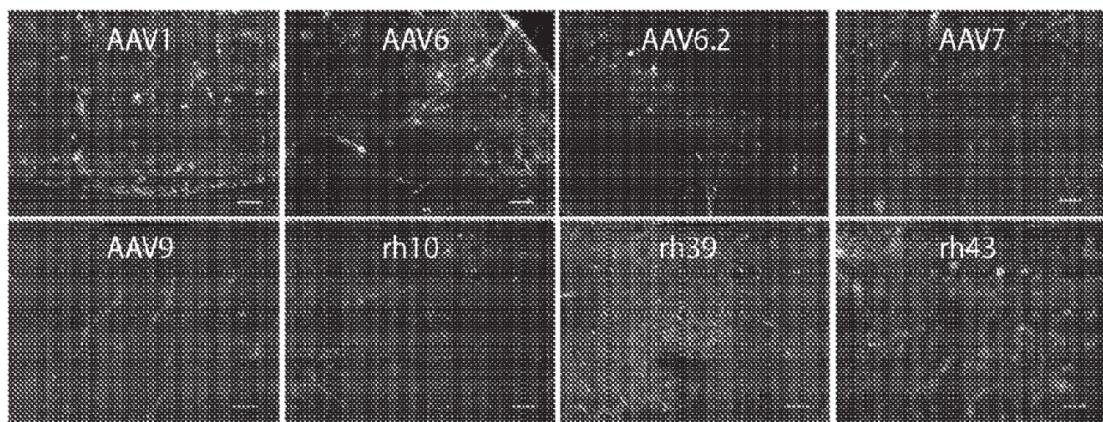


Fig. 27A

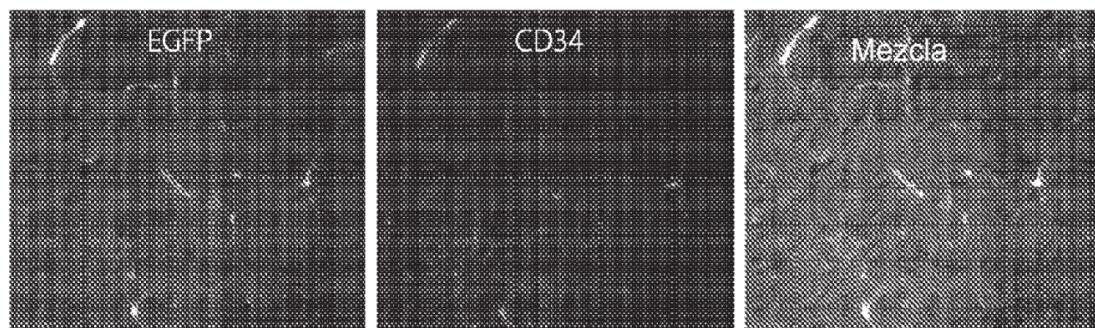


Fig. 27B

ES 2 698 203 T3

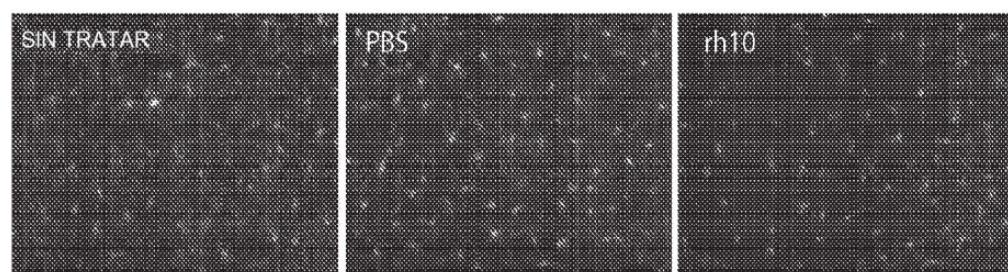


Fig. 28

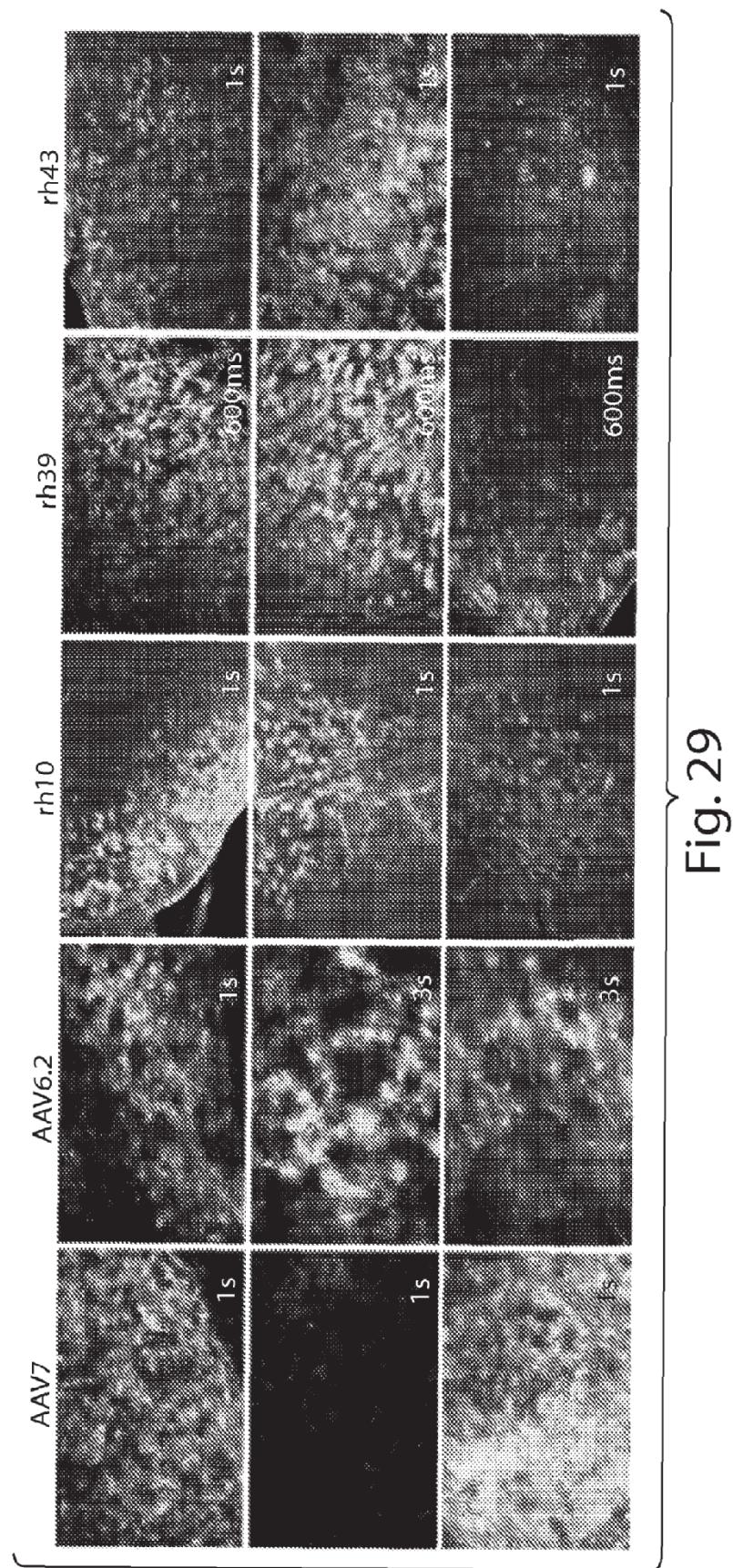


Fig. 29

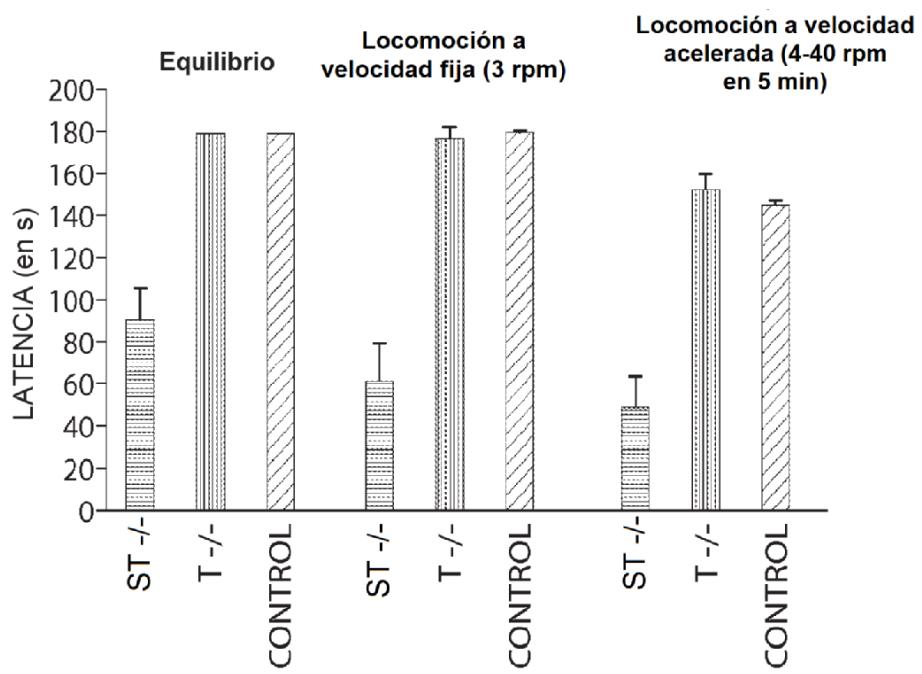
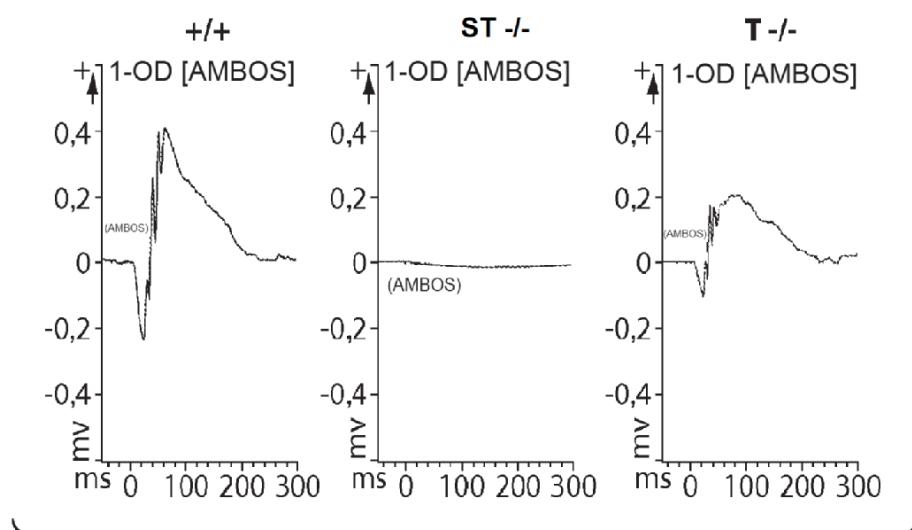


Fig. 30A



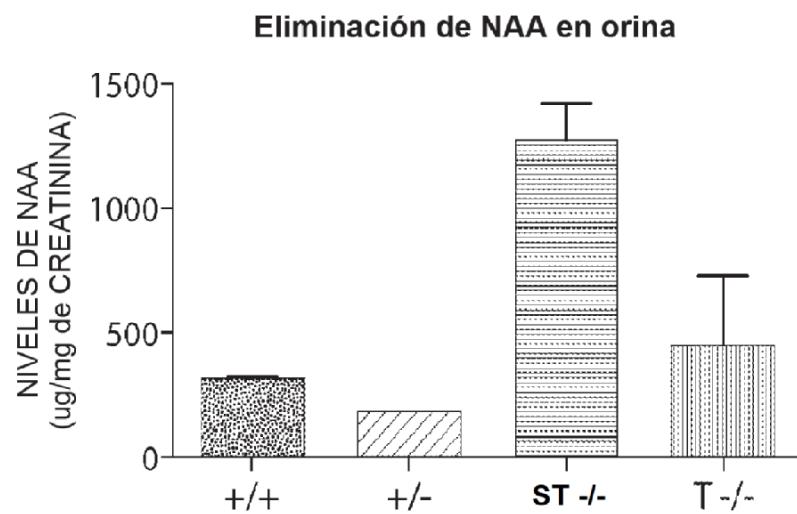


Fig. 30C

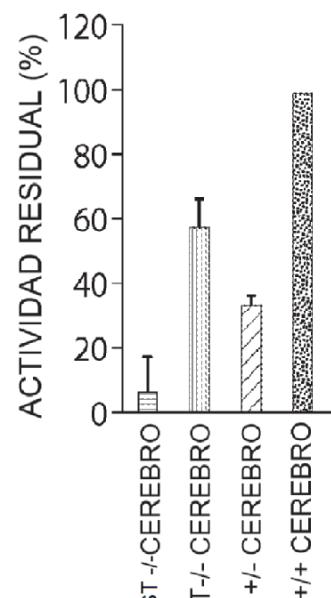


Fig. 30D

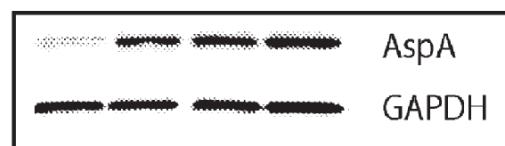


Fig. 30E

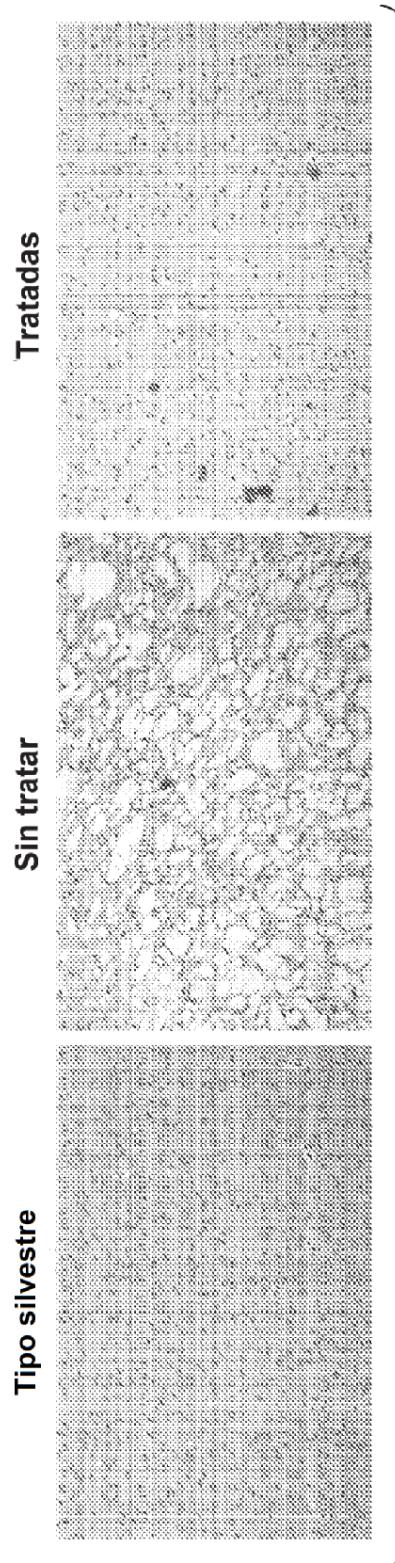


Fig. 31 A

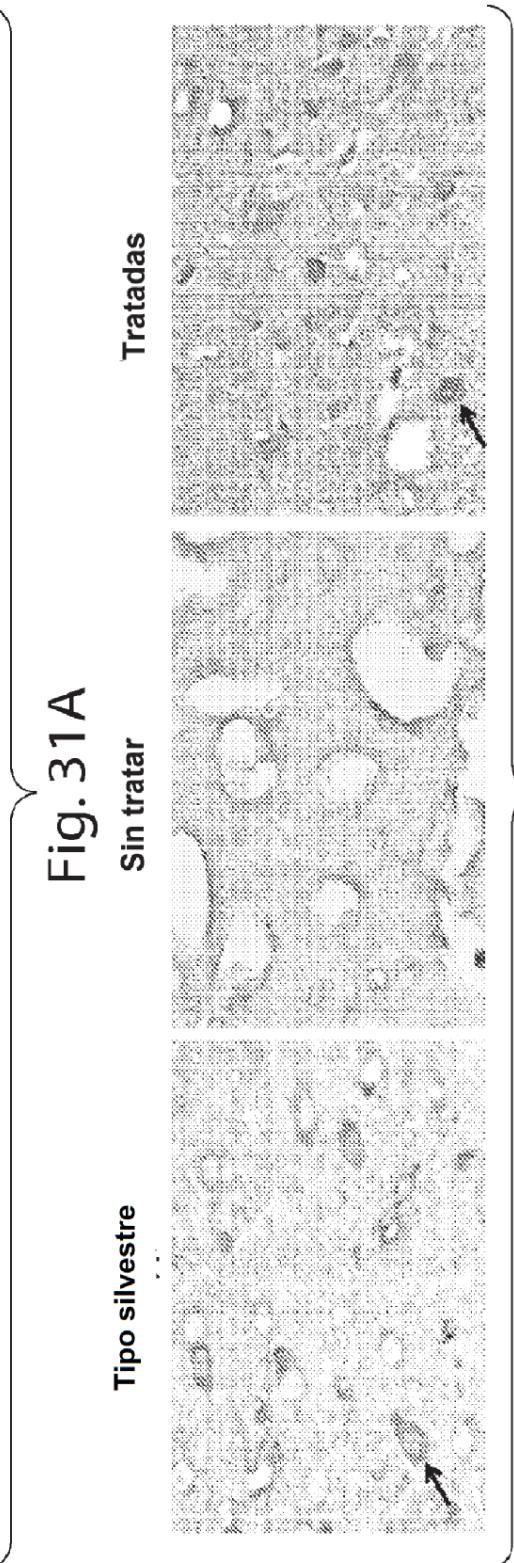


Fig. 31 B

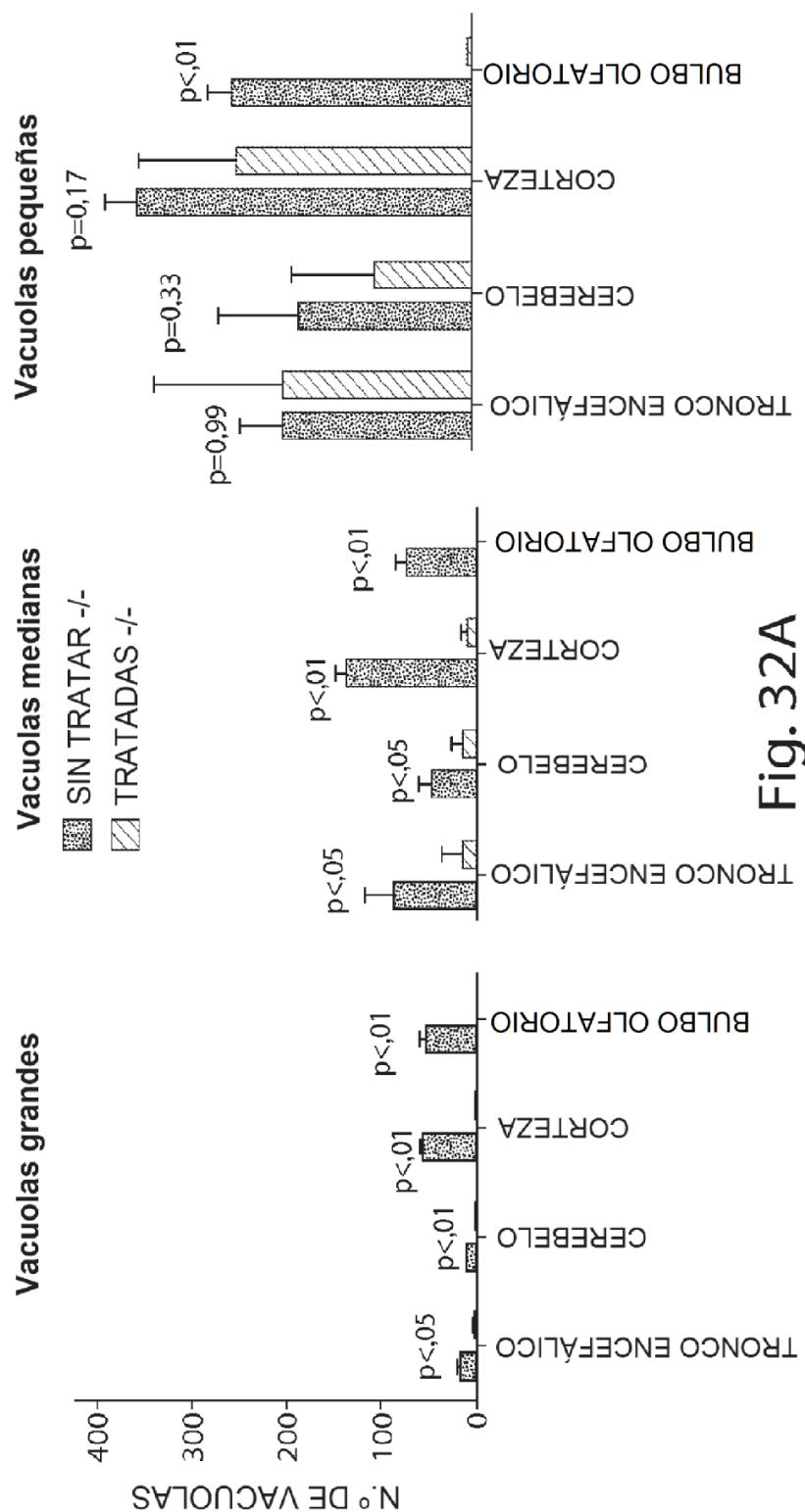
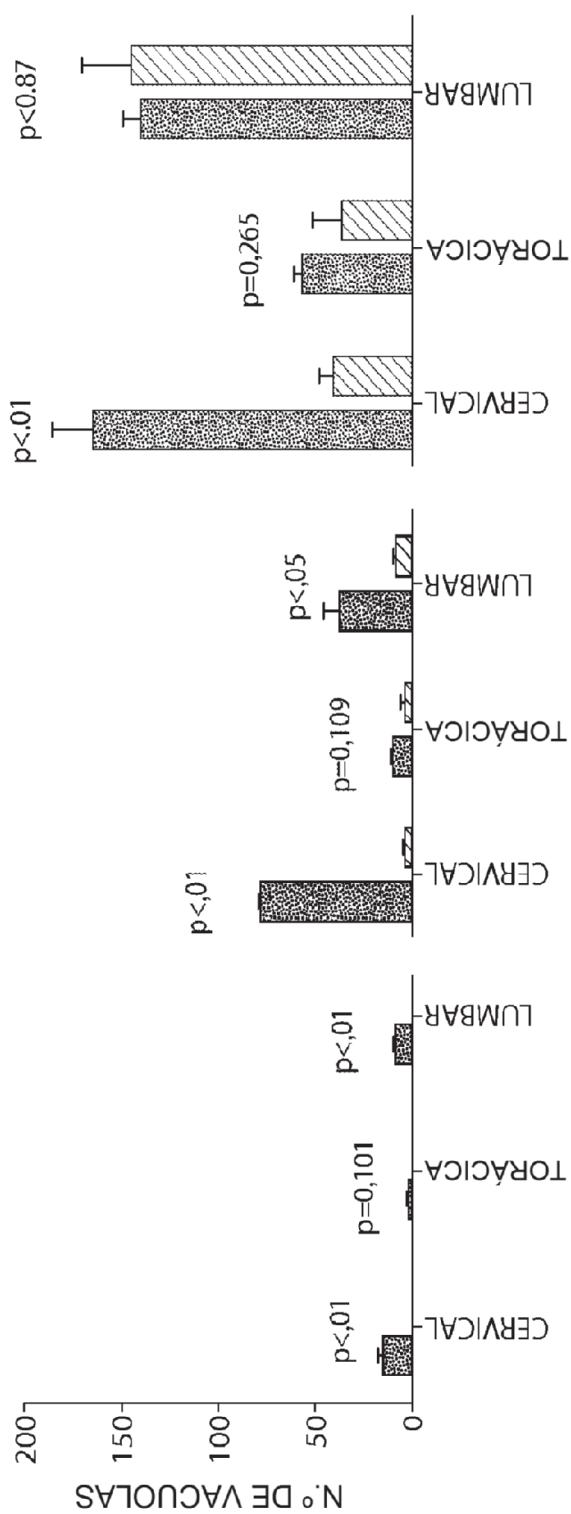


Fig. 32A

Fig. 32B



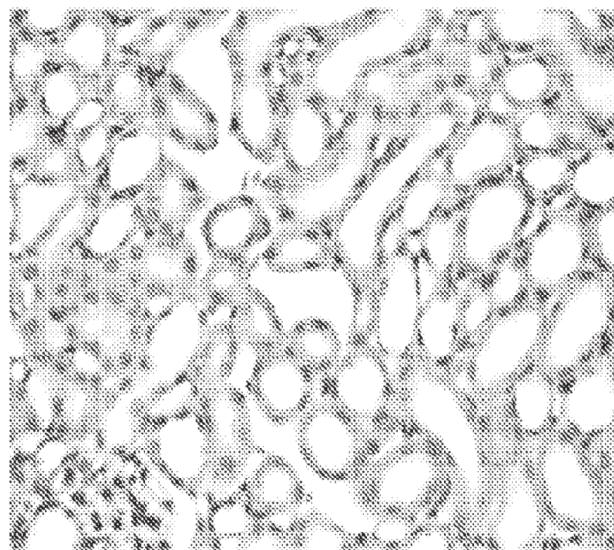


Fig. 33A

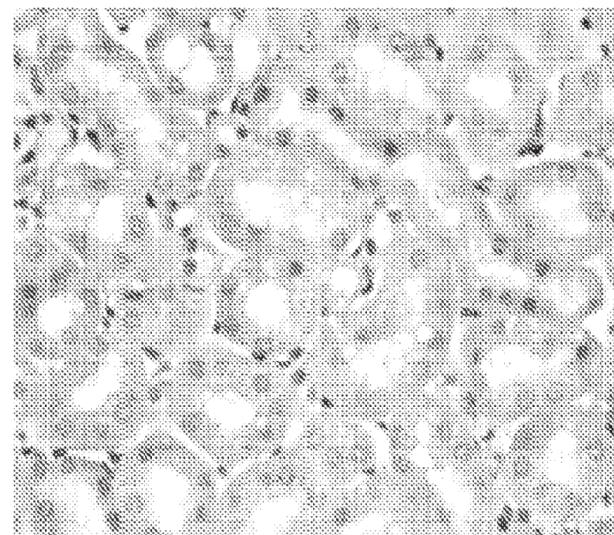


Fig. 33B

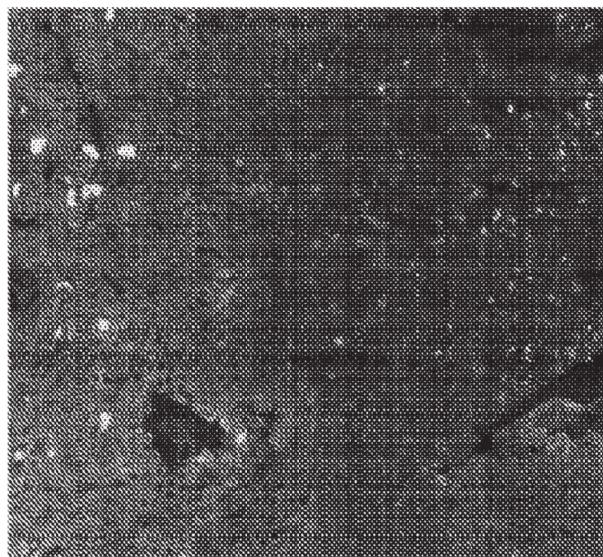


Fig. 33C

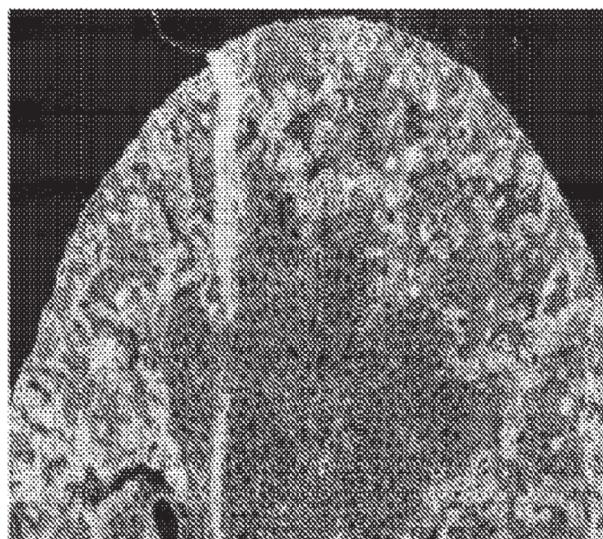


Fig. 33D