

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 917**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 21/04 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C12N 15/864 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2013** **E 18181263 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2024** **EP 3415167**

54 Título: **Administración intratecal de virus adenoasociado 9 recombinante**

30 Prioridad:

01.08.2012 US 201261678458 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
07.11.2024

73 Titular/es:

NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL (50.0%)
700 Children's Hospital Drive Room W172
Columbus, OH 43205, US y
OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION (50.0%)

72 Inventor/es:

KASPAR, BRIAN K.;
PORENSKY, PAUL y
BURGHES, ARTHUR

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

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

ES 2 985 917 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

Administración intratecal de virus adenoasociado 9 recombinante

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos y materiales con virus adenoasociado de tipo 9 útiles para la administración intratecal (es decir, la administración en el espacio bajo la membrana aracnoide del cerebro o de la médula espinal) de polinucleótidos. La utilización de los métodos y materiales está indicada, por ejemplo, para el tratamiento de trastornos del almacenamiento lisosómico, tal como enfermedad de CLN.

Antecedentes

Los fármacos de molécula grande no cruzan la barrera hematoencefálica (BHE) y el 98% de las moléculas pequeñas no pueden penetrar en esta barrera, limitando de esta manera los esfuerzos para desarrollar fármacos para muchos trastornos del SNC [Partridge W.M., Nat. Rev. Drug Discov. 1: 131-139, 2002]. Se ha propuesto recientemente la administración génica como método para evitar la HE [Kaspar et al., Science 301: 839-842, 2003]; sin embargo, la administración generalizada en el cerebro y médula espinal ha constituido un reto. El desarrollo de terapias génicas exitosas para las enfermedades de las neuronas motoras probablemente requerirá la transducción generalizada en la médula espinal y córtex motor. Dos de las enfermedades de las neuronas motoras más comunes son la atrofia muscular espinal (AME) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), ambas trastornos debilitantes en niños y adultos, respectivamente, sin terapias eficaces hasta hoy. Trabajos recientes en modelos de roedor de AME y ELA implican la administración génica utilizando virus que son transportados retrógradamente tras la inyección intramuscular [Kaspar et al., Science 301: 839-842, 2003]; Azzouz et al., J. Clin. Invest. 114: 1726-1731, 2004; Azzouz et al., Nature 429: 413-417, 2004; Ralph et al., Nat Med 11: 429-433, 2005]. Sin embargo, el desarrollo clínico puede resultar difícil dado las numerosas inyecciones requeridas para el tratamiento focalizado de la región de neurodegeneración extendida por toda la médula espinal, tallo cerebral y córtex motor con el fin de tratar con eficacia estas enfermedades. Los vectores VAA también han sido utilizados en varios ensayos clínicos recientes para trastornos neurológicos, demostrando la expresión sostenida de los trasngenes, un perfil relativamente seguro y respuestas funcionales prometedoras, aunque han requerido inyecciones intraparenquimales quirúrgicas [Kapliitt et al., Lancet 369: 2097-2105, 2007; Marks et al., Lancet Neurol. 7: 400-408, 2008; Worgall et al., Hum. Gene Ther., 2008].

La AME es un trastorno neurodegenerativo pediátrico temprano que se caracteriza por parálisis flácida dentro de los primeros seis meses de vida. En los casos más graves de la enfermedad, la parálisis conduce a la parada respiratoria y a la muerte, habitualmente antes de los dos años de edad. La AME es la segunda causa más común de trastorno recesivo autosómico pediátrico después de la fibrosis quística con una incidencia de 1 de cada 6.000 nacimientos vivos. La AME es un trastorno genético caracterizado por la pérdida de las neuronas motoras inferiores (NMI) que residen a lo largo de toda la médula espinal. La AME está causada por una reducción de la expresión de la proteína de supervivencia de las neuronas motoras (SMN, por sus siglas en inglés) que resulta en la denervación del músculo esquelético y en una atrofia muscular significativa. La SMN es una proteína de expresión ubicua que funciona en la biogénesis de las proteínas ribonucleoproteínas nucleares pequeñas U.

En el ser humano existen dos copias muy similares del gen SMN denominadas SMN1 y SMN2. La secuencia de aminoácidos codificada por los dos genes es idéntica. Sin embargo, se produce un único cambio de nucleótido silencioso en SMN2, en el exón 7, que resulta en que el exón 7 resulta excluido en 80% a 90% de los transcritos de SMN2. La proteína truncada resultante, denominada SMN Δ 7, es menos estable y resulta rápidamente degradada. El 10% a 20% restante del transcrito a partir de SMN2 codifica la proteína SMN de longitud completa. La enfermedad resulta cuando se pierden todas las copias de SMN1, dejando sólo SMN2 para generar la proteína SMN de longitud completa. De acuerdo con lo anterior, SMN2 actúa como modificador fenotípico en la AME, de manera que los pacientes con un número de copia de SMN2 más alto generalmente muestran una enfermedad de aparición más tardía y menos severa.

Los enfoques terapéuticos de la AME se han centrado principalmente en el desarrollo de fármacos para incrementar los niveles de SMN o en potenciar la función residual de SMN. A pesar de los años de cribado, ningún fármaco ha resultado totalmente eficaz para incrementar los niveles de SMN como terapia restauradora. Se han desarrollado varios modelos de ratón para la AME. Ver Hsieh-Li et al., Nature Genetics 24(1):66-70, 2000; Le et al., Hum. Mol. Genet. 14 (6):845-857, 2005; Monani et al., J. Cell. Biol. 160(1):41-52, 2003 y Monani et al., Hum. Mol. Genet. 9(3): 333-339, 2000. En un estudio reciente se ha expresado un ADNc de SMN de longitud completa en un modelo de ratón y los autores concluyeron que la expresión de SMN en neuronas podía presentar un impacto significativo sobre los síntomas de la AME. Ver Gavrilina et al., Hum. Mol. Genet. 17(8):1063-1075, 2008.

La ELA es otra enfermedad que resulta en la pérdida de músculo y/o de la función muscular. Caracterizada por primera vez por Charcot en 1869, es una enfermedad neurodegenerativa prevalente de aparición en la adultez que afecta a prácticamente 5 de cada 100.000 individuos. La ELA también se produce en el caso de que las células nerviosas específicas en el cerebro y en la médula espinal que controlan el movimiento voluntario degeneren gradualmente. En dos a cinco años tras la aparición clínica, la pérdida de dichas neuronas motoras conduce a atrofia progresiva de los músculos esqueléticos, resultando en la pérdida de la función muscular, que resulta en parálisis, déficits del habla y muerte debido a parada respiratoria.

Los defectos genéticos que causan o predisponen a la aparición de la ELA no se conocen, aunque las mutaciones de sentido erróneo en el gen SOD-1 se producen en aproximadamente el 10% de los casos de ELA hereditario, de los que hasta 20% presentan mutaciones en el gen codificante de la Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1), situado en el cromosoma 21. La SOD-1 funciona normalmente en la regulación del estrés oxidativo mediante conversión de los aniones radicales libre superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Hasta hoy, se han identificado más de 90 mutaciones que cubren todos los exones del gen SOD-1. Algunas de dichas mutaciones han sido utilizadas para generar líneas de ratones transgénicos que expresan SOD-1 humano mutante para modelar la enfermedad progresiva de las neuronas motoras de la ELA.

La AME y la ELA son dos de las enfermedades más comunes de las neuronas motoras. Trabajos recientes en modelos de roedor de AME y ELA han examinado el tratamiento mediante administración génica utilizando virus que son transportados retrógradamente tras la inyección intramuscular. Ver Azzouz et al., *J. Clin. Invest.* 114: 1726-1731, 2004; Kaspar et al., *Science* 301: 839-842, 2003; Azzouz et al., *Nature* 429: 413-417, 2004 y Ralph et al., *Nature Medicine* 11: 429-433, 2005. La utilización clínica de dichos tratamientos puede resultar difícil dadas las numerosas inyecciones requeridas para el tratamiento focalizado de la neurodegeneración en toda la médula espinal, tallo cerebral y córtex motor.

El virus adenoasociado (VAA) es un parvovirus deficiente en replicación, el genoma de ADN monocatenario del cual presenta una longitud aproximada de 4,7 kb, incluyendo repeticiones terminales invertidas (RTI) de 145 nucleótidos. La secuencia de nucleótidos del genoma del VAA serotipo 2 (VAA2) se presenta en Srivastava et al., *J. Virol.* 45: 555-564, 1983, corregida por Ruffing et al., *J. Gen. Virol.* 75: 3385-3392, 1994. Las secuencias de acción en cis que dirigen la replicación del ADN vírico (rep), la encapsidación/empaquetamiento y la integración del cromosoma de la célula huésped se encuentran contenidas dentro de las RTI. Tres promotores de VAA (denominados p5, p19 y p40 por sus localizaciones relativas en el mapa) controlan la expresión de los dos marcos internos de lectura abierta de VAA codificantes de los genes rep y cap. Los dos promotores rep (p5 y p19), acoplados con el procesamiento diferencial del intrón único de VAA (en los nucleótidos 2.107 y 2.227), resultan en la producción de cuatro proteínas rep (rep78, rep68, rep52 y rep40) a partir del gen rep. Las proteínas Rep poseen múltiples propiedades enzimáticas que son responsables en última instancia de replicar el genoma vírico. El gen cap se expresa a partir del promotor p40 y codifica las tres proteínas de cápside VP1, VP2 y VP3. El corte y empalme alternativo y los sitios de inicio traduccional no de consenso son responsables de la producción de las tres proteínas de cápside relacionadas. Un único sitio de poliadenilación de consenso se encuentra situado en el mapa en la posición 95 del genoma del VAA. El ciclo vital y genética del VAA se revisan en Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 158: 97-129, 1992.

El VAA posee características únicas que lo hacen atractivo como vector para administrar ADN foráneo en las células, por ejemplo, en la terapia génica. La infección por el VAA de las células en cultivo es no citopática y la infección natural en el ser humano y en otros animales es silenciosa y asintomática. Además, el VAA infecta muchas células de mamífero, proporcionando la posibilidad del tratamiento dirigido a muchos tejidos diferentes in vivo. Además, el VAA transduce células de división lenta y células que no se dividen y puede persistir esencialmente durante el tiempo vital de dichas células en forma de un episoma nuclear transcripcionalmente activo (elemento extracromosómico). El genoma provírico del VAA es infeccioso como ADN clonado en plásmidos, lo que permite que la construcción de genomas recombinantes resulte viable. Además, debido a que las señales que dirigen la replicación del VAA, la encapsidación e integración del genoma se encuentran contenidos dentro de las RTI del genoma del VAA, puede sustituirse parte o la totalidad de los aproximadamente 4,3 kb del genoma (codificantes de proteínas de replicación y estructurales de cápside, rep-cap) por ADN foráneo, tal como un casete génico que contiene un promotor, un ADN de interés y una señal de poliadenilación. Las proteínas rep y cap pueden proporcionarse in trans. Otra característica significativa del VAA es que es un virus extremadamente estable y robusto. Resiste con facilidad las condiciones utilizadas para inactivar los adenovirus (56°C a 65°C durante varias horas), de manera que la conservación en frío de los VAA resulta menos crítica. Los VAA incluso pueden liofilizarse. Finalmente, las células infectadas por VAA no son resistentes a la superinfección.

Existen múltiples serotipos de VAA y ofrecen un tropismo de tejidos variado. Entre los serotipos conocidos se

incluyen, por ejemplo, VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAA10 y VAA11. VAA9 se describen en la patente US nº 7.198.951, y en Gao et al., J. Virol. 78: 6381-6388, 2004. Los avances en la administración de VAA6 y VAA8 han hecho posible la transducción por estos serotipos de músculo esquelético y cardíaco tras simples inyecciones intravenosas o intraperitoneales sistémicas. Ver Pacak et al., Circ. Res. 99(4):3-9, 2006) y Wang et al., Nature Biotech. 23(3):321-8, 2005. La utilización de VAA para reconocer los tipos celulares del sistema nervioso central, sin embargo, ha requerido la inyección intraparenquimal quirúrgica. Ver Kaplitt et al., supra; Marks et al., supra y Worgall et al., supra.

De esta manera, sigue existiendo una necesidad en la técnica de métodos y vectores para administrar polinucleótidos en el sistema nervioso central.

Breve descripción

La invención es como se define en las reivindicaciones anexas.

Por lo tanto, la invención proporciona una composición para usarse en el tratamiento de una enfermedad neurológica en un paciente en necesidad de esto, en donde la composición comprende un AAV9 recombinante (VAA9r), y el uso comprende administrar la composición al paciente por inyección intratecal, intracisternal o intracerebroventricular en combinación con un agente de contraste no iónico, de baja osmolaridad, en donde el VAA9r comprende un genoma de VAA9r que incluye un polinucleótido terapéutico, en donde el genoma de VAA9r es un genoma monocatenario y/o el genoma de VAA9r es un genoma autocomplementario y en donde la enfermedad neurológica es enfermedad de CLN1, enfermedad de CLN2, enfermedad de CLN3, enfermedad de CLN4, enfermedad de CLN5, enfermedad de CLN6, o enfermedad de CLN8.

La invención proporciona además una combinación para usarse en el tratamiento de una enfermedad neurológica en un paciente en necesidad de esto, en donde la combinación comprende un VAA9r y un agente de contraste no iónico, de baja osmolaridad, y el uso comprende administrar la combinación al paciente por inyección intratecal, intracisternal o intracerebroventricular, en donde el VAA9r comprende un genoma de VAA9r que incluye un polinucleótido terapéutico, en donde el genoma de VAA9r es un genoma monocatenario y/o el genoma de VAA9r es un genoma autocomplementario y en donde la enfermedad neurológica es enfermedad de CLN1, enfermedad de CLN2, enfermedad de CLN3, enfermedad de CLN4, enfermedad de CLN5, enfermedad de CLN6, o enfermedad de CLN8.

Las realizaciones preferentes son las definidas en las reivindicaciones dependientes.

La presente exposición proporciona métodos y materiales útiles para la administración intratecal de polinucleótidos en el sistema nervioso central utilizando un VAA9 recombinante (VAA9r) como vector.

Más específicamente, la exposición proporciona métodos de administración de un polinucleótido en el sistema nervioso central de un paciente que lo necesita, comprendiendo la administración intratecal de VAA9r y un agente de contraste no iónico de baja osmolaridad en el paciente, en el que el VAA9r comprende un genoma autocomplementario que incluye el polinucleótido. El polinucleótido se administra en, por ejemplo, el cerebro, la médula espinal, una célula glial, un astrocito y/o una neurona motora inferior. El agente de contraste no iónico de baja osmolaridad se selecciona de entre yohexol, yomeprol, yopamidol, yopentol, yopromida, yoversol o yoxilán. En algunas realizaciones, el polinucleótido es un polinucleótido de supervivencia de las neuronas motoras (SMN, por sus siglas en inglés).

La exposición proporciona además métodos de tratamiento de una enfermedad neurológica en un paciente que lo necesita, comprendiendo la administración intratecal de VAA9r y un agente de contraste no iónico de baja osmolaridad en el paciente, en el que el VAA9r comprende un genoma autocomplementario que incluye un polinucleótido terapéutico. La enfermedad neurológica es, por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa, tal como la atrofia muscular espinal o la esclerosis lateral amiotrófica. El polinucleótido terapéutico es, por ejemplo, un polinucleótido de SMN. El polinucleótido de SMN se administra en, por ejemplo, el cerebro, la médula espinal, una célula glial, un astrocito y/o una neurona motora inferior. El agente de contraste no iónico de baja osmolaridad se selecciona de entre yohexol, yomeprol, yopamidol, yopentol, yopromida, yoversol o yoxilán.

Descripción detallada

La invención es tal como se define en las reivindicaciones anexas.

En la presente se divulga un método para la administración intratecal de un polinucleótido en el sistema nervioso central de un paciente, que comprende administrar un VAA9r con un genoma que incluye el polinucleótido. Según la invención, también se administra en el paciente un agente de contraste no iónico de

baja osmolaridad. El agente de contraste no iónico de baja osmolaridad incrementa la transducción de células diana en el sistema nervioso central del paciente. Según la invención, el genoma de VAA9r es un genoma autocomplementario y/o es un genoma monocatenario.

- 5 En algunas realizaciones, el polinucleótido se administra en el cerebro. Entre las zonas del cerebro contempladas para la administración se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, el córtex motor y el tallo cerebral. En algunas realizaciones, el polinucleótido se administra en la médula espinal. En algunas realizaciones, el polinucleótido se administra en las neuronas motoras inferiores. Realizaciones de la invención utilizan VAA9r para administrar polinucleótidos en las células nerviosas y gliales. En algunas realizaciones, la célula glial es una célula microglial, un oligodendrocito o un astrocito. En algunas realizaciones, el VAA9r se utiliza para administrar un polinucleótido en una célula de Schwann.

La utilización de materiales de la invención está indicada, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades de las neuronas motoras inferiores, tales como la AME y la ELA, así como la enfermedad de Pompe, los trastornos del almacenamiento lisosómico, el glioblastoma multiforme y la enfermedad de Parkinson. Entre los trastornos del almacenamiento lisosómico se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, deficiencia de activador/gangliosidosis de GM2, alfa-manosidosis, aspartilglucosaminuria, enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterilo, deficiencia crónica de hexosaminidasa A, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis, enfermedad de Gaucher (tipo I, tipo II, tipo III), gangliosidosis GM1 (infantil, infantil tardía/juvenil, adulta/crónica), enfermedad de las células I/mucopolipidosis II, enfermedad de almacenamiento infantil de ácido siálico libre/ISSD, deficiencia juvenil en hexosaminidasa A, enfermedad de Krabbe (de aparición infantil, de aparición tardía), leucodistrofia metacromática, trastornos mucopolisacaridosis (polidistrofia pseudo-Hurler/mucopolipidosis IIIA, síndrome MPSI de Hurler, síndrome MPSI de Scheie, síndrome MPS I de Hurler-Scheie, síndrome MPS II de Hunter, síndrome de Sanfilippo tipo A/MPS III A, síndrome de Sanfilippo tipo B/MPS III B, síndrome de Sanfilippo tipo C/MPS III C, síndrome de Sanfilippo tipo D/MPS III D, Morquio de tipo A/MPS IVA, Morquio de tipo B/MPS IVB, MPS IX deficiencia de hialuronidasa, MPS VI Maroteaux-Lamy, MPS VII síndrome de Sly, mucopolipidosis I/sialidosis, mucopolipidosis IIIC, mucopolipidosis tipo IV), deficiencia de sulfatasa múltiple, enfermedad de Niemann-Pick (tipo A, tipo B, tipo C), lipofuscinosis ceroides neuronal (enfermedad de CLN6 (infantil tardía atípica, variante de aparición tardía, juvenil temprana), Batten-Spielmeyer-Vogt/enfermedad juvenil NCL/CLN3, CLN5 infantil tardía variante finlandesa, enfermedad de Jansky-Bielschowsky/CLN2 infantil tardía/enfermedad de TPP1, enfermedad de Kufs/NCL de aparición adulta/CLN4, CLN8 variante infantil tardía/epilepsia septentrional, enfermedad de Santavuori-Haltia/CLN1 infantil/PPT, beta-manosidosis, enfermedad de Pompe/enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II, picnodisostosis, enfermedad de Sandhoff/aparición adulta/gangliosidosis de GM2, enfermedad de Sandhoff/gangliosidosis de GM2 - Infantil, enfermedad de Sandhoff/gangliosidosis GM2 - Juvenil, enfermedad de Schindler, enfermedad de Salla/enfermedad de almacenamiento de ácido siálico, Tay-Sachs/gangliosidosis de GM2 y enfermedad de Wolman.

40 En realizaciones adicionales, la utilización de los materiales está indicada para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso tales como el síndrome de Rett, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington o para el tratamiento de daños en el sistema nervioso, incluyendo los traumatismos/lesiones en la médula espinal y cerebro y los cánceres de cerebro.

45 También se divulgan en la presente genomas del VAAr. Los genomas del VAAr comprenden uno o más RTI del VAA flanqueando un polinucleótido codificante de un polipéptido (incluyendo, aunque sin limitación, un polipéptido SMN) o codificante de ARNip, ARNhp, antisentido y/o ARNmi dirigido a proteínas o secuencias de control mutadas de sus genes. El polinucleótido se encuentra operativamente ligando a ADN de control transcripcional, específicamente ADN de promotor y ADN de secuencias de poliadenilación que son funcionales en las células diana para formar un casete génico. El casete génico puede incluir además secuencias de intrón para facilitar el procesamiento de un transcrito de ARN al expresarse en células de mamífero.

55 En algunas realizaciones, el genoma del VAA9r codifica un factor trófico o protector para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, incluyendo, aunque sin limitación, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, junto con daños en el sistema nervioso, incluyendo los traumatismos/daños en la médula espinal y cerebro, los accidentes cerebrovasculares y los cánceres de cerebro. Entre los ejemplos no limitativos de factores de crecimiento conocidos del sistema nervioso se incluyen el factor de crecimiento nervioso (NFG, por sus siglas en inglés), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3), la neurotrofina-4/5 (NT-4/5), la neurotrofina-6 (NT-6), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), la familia del factor de crecimiento fibroblástico (por ejemplo, los FGF1-15), el factor inhibidor de la leucemia (LIF), determinados elementos de la familia del factor de crecimiento similar a la insulina (por ejemplo, IGF-1), las neurturinas, la persefina, las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), las inmunofilinas, la familia de factores de crecimiento del factor de crecimiento transformante (TGF), las neuregulinas, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el

factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (por ejemplo, VEGF 165), folistatina, Hif1 y otros. También se encuentran generalmente contemplados los factores de transcripción de dedo de cinc que se regulan cada uno de los factores tróficos o protectores contemplados en la presente memoria. En realizaciones adicionales, la composición o combinación está destinada a la utilización en métodos para modular la función neuroinmunológica, incluyendo, aunque sin limitación, la inhibición de la activación microglial y astrogial mediante, por ejemplo, la inhibición de NFkB o NFkB para la neuroprotección (doble acción de NFkB y rutas asociadas en diferentes tipos celulares) por ARNip, ARNhp, antisentido o ARNmi. En realizaciones todavía adicionales, el genoma de VAA9r codifica un inhibidor apoptótico (por ejemplo, bcl2, bclxL). La utilización de un VAA9r codificante de un factor trófico o proteína moduladora de la lesión medular espinal o un supresor de un inhibidor del crecimiento axonal (por ejemplo, un supresor de Nogo [Oertle et al., The Journal of Neuroscience 23(13):5393-5406, 2003] también se encuentra contemplada para el tratamiento de las lesiones en la médula espinal.

Para el tratamiento de los trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Parkinson, el genoma del VAA9r codifica en diversas realizaciones la ácido aromático dopa descarboxilasa (AADC, por sus siglas en inglés), la tirosina hidroxilasa, la GTP-ciclohidrolasa 1 (gtpch1), los inhibidores apoptóticos (por ejemplo, bcl2, bclxL), el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), el neurotransmisor inhibidor-ácido aminobutírico (GABA) o los enzimas que participan en la biosíntesis de la dopamina. En realizaciones adicionales, el genoma del VAA9r puede codificar, por ejemplo, codificadores de la parquína y/o sinucleína.

Para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer, en algunas realizaciones, la composición o combinación está destinada a la utilización en métodos para incrementar la producción de acetilcolina. En algunas realizaciones, la composición o combinación es para la utilización en métodos de incremento del nivel de una colina acetiltransferasa (ChAT) o de inhibición de la actividad de una acetilcolina esterasa (AChE).

El genoma del VAA9r codifica en algunas realizaciones, ARNip, ARNhp, ARN antisentido y/o ARNmi para la utilización en métodos para reducir la expresión de la proteína Huntington mutante (htt) para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, tal como la enfermedad de Huntington.

El genoma del VAA9r codifica en diversas realizaciones, ARNip, ARNhp, ARN antisentido y/o ARNmi para la utilización en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos tales como la ELA. El tratamiento resulta en una reducción de la expresión de marcadores moleculares de enfermedad, tales como TNF α , óxido nítrico, peroxinitrito y/o óxido nítrico sintasa (NOS, por sus siglas en inglés).

En algunas realizaciones, los vectores codifican ARN de horquilla cortos dirigidos a proteínas mutadas, tales como la superóxido dismutasa para la ELA, o factores neurotróficos, tales como GDNF o IGF1 para la ELA o la enfermedad de Parkinson.

En algunas realizaciones, la utilización de materiales de la invención está indicada para el tratamiento de trastornos del desarrollo neurológico, tales como la enfermedad de Rett. Para realizaciones relacionadas con el síndrome de Rett, el genoma del VAA9r puede codificar, por ejemplo, la proteína 2 de unión a metilcitosina (MeCP2, por sus siglas en inglés).

El término "tratamiento" comprende la etapa de administrar por vía intratecal una dosis eficaz, o múltiples dosis eficaces, de una composición según la invención en un animal (incluyendo un ser humano) que lo necesita. En el caso de que la dosis se administre antes del desarrollo de un trastorno/enfermedad, la administración es profiláctica. En el caso de que la dosis se administre después del desarrollo de un trastorno/enfermedad, la administración es terapéutica. En realizaciones de la invención, una dosis eficaz es una dosis que alivia (elimina o reduce) por lo menos un síntoma asociado al trastorno/estado de enfermedad bajo tratamiento, que enlentece o evita el avance a un trastorno/estado de enfermedad, que enlentece o evita el avance de un trastorno/estado de enfermedad, que reduce la extensión de la enfermedad, que resulta en la remisión (parcial o total) de la enfermedad y/o que prolonga la supervivencia. Los ejemplos de estados de enfermedad contemplados para el tratamiento mediante composiciones de la invención se explicado anteriormente.

Las terapias de combinación también se encuentran contempladas por la invención. La combinación tal como se utiliza en la presente memoria incluye tanto el tratamiento simultáneo como los tratamientos secuenciales. Las combinaciones de una composición para la utilización según la invención con tratamientos médicos estándares (por ejemplo, riluzol en la ELA) se encuentran específicamente contempladas, al igual que las combinaciones con nuevas terapias.

Aunque se encuentra contemplada la administración en un individuo que lo necesita después del nacimiento, también se encuentra contemplada la administración intrauterina en el feto.

La transducción con VAAr también puede llevarse a cabo in vitro. En una realización, las células diana deseadas se extraen del sujeto, se transducen con VAAr y se reintroducen en el sujeto. Alternativamente, las células singénicas o xenogénicas pueden utilizarse en el caso de que las células no generen una respuesta inmunológica inapropiada en el sujeto.

Los métodos adecuados para la transducción y reintroducción de células transducidas en un sujeto son conocidos de la técnica. En una realización, pueden transducirse células in vitro mediante la combinación de VAAr con las células, por ejemplo, en medios apropiados y el cribado de aquellas células que alojan el ADN de interés, utilizando técnicas convencionales, tales como transferencias southern y/o PCR, o mediante la utilización de marcadores seleccionables. A continuación, las células transducidas pueden formularse en composiciones farmacéuticas, y la composición puede introducirse en el sujeto mediante diversas técnicas, tales como mediante inyección en la médula espinal.

Los genomas del VAAr divulgados en la presente no poseen ADN rep y cap de VAA. El ADN del VAA en los genomas del VAAr (por ejemplo, las RTI) pueden proceder de cualquier serotipo de VAA para el que puede derivarse un virus recombinante, incluyendo, aunque sin limitación, los serotipos de VAA, VAA-1, VAA-2, VAA-3, VAA-4, VAA-5, VAA-6, VAA-7, VAA-8, VAA-9, VAA-10 y VAA-11. Las secuencias de nucleótidos de los genomas de los serotipos de VAA son conocidas de la técnica. Por ejemplo, el genoma completo del VAA-1 se proporciona en GenBank nº de acceso NC_002077; el genoma completo del VAA-2 se proporciona en GenBank nº de acceso NC_001401 y Srivastava et al., J. Virol. 45:555-564, 1983; el genoma completo de VAA-3 se proporciona en GenBank nº de acceso NC_1829; el genoma completo de VAA-4 se proporciona en GenBank nº de acceso NC_001829; el genoma de VAA-5 se proporciona en GenBank nº de acceso AF085716; el genoma completo de VAA-6 se proporciona en GenBank nº de acceso NC_001862; por lo menos partes de los genomas de VAA-7 y VAA-8 se proporcionan en los nº de acceso de GenBank AX753246 y AX753249, respectivamente; el genoma de VAA-9 se proporciona en Gao et al., J. Virol. 78: 6381-6388, 2004; el genoma de VAA-10 se proporciona en Mol. Ther. 13(1):67-76, 2006; el genoma de VAA-11 se proporciona en Virology 330(2):375-383, 2004.

En la presente se divulgan plásmidos de ADN que comprenden genomas de VAAr. Los plásmidos de ADN se transfieren a células permisibles a la infección con un virus ayudante de VAA (por ejemplo, adenovirus, adenovirus o herpesvirus con delección de E1) para el ensamblaje del genoma de VAAr formando partículas víricas infecciosas con proteínas de cápside de VAA9. Las técnicas para producir partículas de VAAr, en las que un genoma de VAA que debe empaquetarse, los genes rep y cap, y las funciones de virus ayudante se proporcionan a una célula, son estándares de la técnica. La producción de VAAr requiere que los componentes siguientes se encuentren presentes dentro de una sola célula (indicada en la presente memoria como célula empaquetadora): un genoma de VAAr, genes rep y cap del VAA separados de (es decir, no contenidos en) el genoma de VAAr, y funciones de virus ayudante. La producción de VAAr pseudotipado se da a conocer en, por ejemplo, el documento nº WO01/83692.

En diversas realizaciones, las proteínas de cápside del VAA pueden modificarse para potenciar la administración del vector recombinante. Las modificaciones de las proteínas de cápside son generalmente conocidas de la técnica. Ver, por ejemplo, los documentos US 2005/0053922 y US 2009/0202490.

Un método para agenerar una célula empaquetadora es crear una línea celular que exprese establemente todos los componentes necesarios para la producción de partículas de VAA. Por ejemplo, un plásmido (o múltiples plásmidos) que comprende un genoma de VAAr que no presenta los genes rep y cap de VAA, los genes rep y cap del VAA separados del genoma del VAAr, y un marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia a neomicina, se integran en el genoma de una célula. Los genomas del VAA se introducen en los plásmidos bacterianos mediante procedimientos tales como la extensión terminal con GC ('GC tailing') (Samulski et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:2077-2081, 1982), adición de conectores sintéticos que contienen sitios de corte de endonucleasa de restricción (Laughlin et al., Gene 23:65-73, 1983) o mediante ligación de extremos romos directa (Senapathy y Carter, J. Biol. Chem. 259:4661-4666, 1984). A continuación, la línea celular de empaquetamiento se infecta con un virus ayudante, tal como un adenovirus. Las ventajas de dicho método son que las células son seleccionables y resultan adecuadas para la producción a gran escala de VAAr. Otros ejemplos de métodos adecuados utilizan adenovirus o baculovirus y no plásmidos para introducir genomas de VAAr y/o genes rep y cap en las células empaquetadoras.

Los principios generales de producción de VAAr se revisan en, por ejemplo, Carter, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539, 1992, y Muzyczka, Curr. Topics in Microbial. and Immunol. 158:97-129, 1992. Se describen diversos enfoques en Ratschin et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072, 1984; Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466, 1984; Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251, 1985; McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963, 1988; y Lebkowski et al., Mol. Cell. Biol. 7:349, 1988. Samulski et al., J. Virol., 63:3822-3828, 1989; patente US nº 5.73.414; documento nº WO 95/13365 y la patente US correspondiente nº 5.658.776; los documentos nº WO 95/13392; nº WO 96/17947; nº PCT/US98/18600; nº WO 97/09441 (PCT/US96/14423); nº

WO 97/08298 (PCT/US96/13872); n° WO 97/21825 (PCT/US96/20777); n° WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); n° WO 99/11764; Perrin et al. Vaccine 13:1244-1250, 1995; Paul et al. Human Gene Therapy 4:609-615, 1993; Clark et al. Gene Therapy 3:1124-1132, 1996; patente US n° 5.786.211; patente USn° 5.871.982 y patente US n° 6.258.595.

En la presente se divulgan células empaquetadoras que producen VAAr infecciosos. Como se divulga además en la presente las células empaquetadoras pueden ser células de cáncer establemente transformadas, tales como células HeLa, células 293 y células PerC.6 (una línea 293 afín). Como se describe en la presente, las células empaquetadoras son células que no son células de cáncer transformadas, tales como células 293 de pase bajo (células renales de feto humano transformadas con E1 de adenovirus), células MRC-5 (fibroblastos fetales humanos), células WI-38 (fibroblastos fetales humanos), células Vero (células renales de mono) y células FRhL-2 (células pulmonares de feto de mono Rhesus).

En la presente se divulga VAA9r (es decir, partículas de VAA9r encapsidadas infecciosas) que comprende un genoma de VAAr. En una realización de la invención, el genoma de VAAr es un genoma autocomplementario.

En otro aspecto, se proporcionan VAAr, tal como un VAA9r denominado "SMN de VAAr". El genoma de SMN de VAAr (nucleótidos 980 a 3.336 de SEC ID n° 1) presenta dentro de la secuencia un RTI de VAA2, el promotor β -actina de pollo con un intensificador de citomegalovirus, un intrón de SV40, el ADN codificante de SMN explicado en GenBank número de acceso NM_000344.2), una secuencia de señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina y otro RTI de VAA2. Las sustituciones de nucleótidos conservadoras de ADN de SMN también se encuentran contempladas (por ejemplo, un cambio de guanina a adenina en la posición 625 de GenBank número de acceso NM_000344.2). El genoma no presenta ADN de rep y cap de VAA, es decir, no hay ADN de rep o cap de VAA entre los RTI del genoma. Entre los polipéptidos SMN contemplados se incluyen, aunque sin limitación, el polipéptido SMN1 humano indicado en la base de datos de proteínas del NCBI número NP_000335.1. También se encuentra contemplado el polipéptido modificador de SMN1, plastina-3 (PLS3) (Oprea et al., Science 320(5875): 524-527, 2008). Las secuencias codificantes de otros polipéptidos pueden sustituirse por el ADN de SMN.

El VAAr puede purificarse mediante métodos estándares de la técnica, tales como la cromatografía de columna o los gradientes en cloruro de cesio. Los métodos para purificar los vectores VAAr respecto de los virus ayudante son conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen los métodos dados a conocer en, por ejemplo, Clark et al., Hum. Gene Ther. 10(6): 1031-1039, 1999; Schenpp y Clark, Methods Mol. Med. 69: 427-443, 2002; patente US n° 6.566.118 y documento n° WO 98/09657.

En otro aspecto, la invención contempla composiciones tales como las indicadas en la reivindicaciones, que comprenden VAAr de la presente exposición. En una realización, las composiciones de la invención comprenden un VAAr codificante de un polipéptido SMN. En otras realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden incluir dos o más VAAr codificantes de polipéptidos de interés diferentes.

Las composiciones de la invención comprenden VAAr en un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden comprender además otros ingredientes, tales como diluyentes y adyuvantes. Los portadores, diluyentes y adyuvantes aceptables resultan no tóxicos para los receptores y preferentemente son inertes a las dosis y concentraciones utilizadas, y entre ellos se incluyen tampones, tales como fosfato, citrato u otros ácidos orgánicos; antioxidantes, tales como ácidos ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal, tales como sodio, y/o surfactantes no iónicos, tales como Tween, compuestos plurónicos o polietilenglicol (PEG).

Los títulos de VAAr que deben administrarse en métodos de la invención variarán dependiendo de, por ejemplo, el VAAr particular, el modo de administración, el objetivo del tratamiento, el individuo y el tipo o tipos de células que son la diana, y pueden determinarse mediante métodos estándares de la técnica. Los títulos de VAAr pueden estar comprendidos entre aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} y aproximadamente 1×10^{14} o más partículas resistentes a ADNasa (DRP, por sus siglas en inglés) por ml. Las dosis pueden expresarse además en unidades de genomas víricos (gv). Las dosis pueden variar además basándose en el tiempo de administración en el ser humano. Las dosis de VAAr pueden encontrarse comprendidas entre aproximadamente 1×10^{11} vg/kg, aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} , aproximadamente 1×10^{14} , aproximadamente 1×10^{15} , aproximadamente 1×10^{16} o más genomas víricos por kilogramo de peso corporal en un adulto. Para un neonato, las dosis de VAAr pueden encontrarse comprendidas entre aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 3×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} , aproximadamente 3×10^{13} ,

aproximadamente 1×10^{14} , aproximadamente 3×10^{14} , aproximadamente 1×10^{15} , aproximadamente 3×10^{15} , aproximadamente 1×10^{16} , aproximadamente 3×10^{16} o más genomas víricos por kilogramo de peso corporal.

En otro aspecto, una composición o combinación de la invención es para la utilización en métodos de transducción de células diana (incluyendo, aunque sin limitación, células nerviosas o gliales) con VAAr.

El término "transducción" se utiliza para referirse a la administración/transporte de un polinucleótido a una célula diana in vivo o in vitro, mediante un VAAr deficiente en replicación de la exposición que resulta en la expresión de un polipéptido funcional por parte de la célula receptora.

La transducción de células con VAAr de la exposición resulta en la expresión sostenida de polipéptido o ARN codificado por el VAAr. De esta manera, la presente invención proporciona composiciones y combinaciones según se reivindican para la utilización en métodos de administración/transporte de VAAr (por ejemplo, codificantes de proteína SMN) de la exposición en un animal o paciente humano. Entre dichos métodos se incluyen transducir células nerviosas y/o gliales con uno o más AAr de la presente exposición. La transducción puede llevarse a cabo con casetes génicos que comprenden elementos de control específicos de tejido. Por ejemplo, promotores que permiten la expresión específicamente dentro de neuronas o específicamente dentro de astrocitos. Entre los ejemplos se incluyen enolasa específica neuronal y promotores de proteína ácida fibrilar glial. También pueden desarrollarse promotores inducibles bajo el control de un fármaco ingerido.

Según la invención, la transducción de células se encuentra incrementada en el caso de que se utilice un vector de la exposición en combinación con un agente de contraste tal como se indica en la presente memoria en comparación con la transducción de un vector de la exposición en el caso de que no se utilice en combinación con un agente de contraste. En diversas realizaciones, la transducción de células se encuentra incrementada en por lo menos aproximadamente 1%, o en por lo menos aproximadamente 5%, en por lo menos aproximadamente 10%, en por lo menos aproximadamente 20%, en por lo menos aproximadamente 30%, en por lo menos aproximadamente 40%, en por lo menos aproximadamente 50%, en por lo menos aproximadamente 60%, en por lo menos aproximadamente 70%, en por lo menos aproximadamente 80%, en por lo menos aproximadamente 90%, en por lo menos aproximadamente 100%, en por lo menos aproximadamente 120%, en por lo menos aproximadamente 150%, en por lo menos aproximadamente 180%, en por lo menos aproximadamente 200%, en por lo menos aproximadamente 250%, en por lo menos aproximadamente 300%, en por lo menos aproximadamente 350%, en por lo menos aproximadamente 400%, en por lo menos aproximadamente 450%, en por lo menos aproximadamente 500% o más en el caso de que se utilice un vector de la exposición en combinación con un agente de contraste tal como se indica en la presente memoria, respecto a la transducción de un vector de la exposición en el caso de que no se utilice en combinación con un agente de contraste. En realizaciones adicionales, la transducción de células se encuentra incrementada en aproximadamente 10% a aproximadamente 50%, en aproximadamente 10% a aproximadamente 100%, o en aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, en aproximadamente 5% a aproximadamente 50%, o en aproximadamente 1%, a aproximadamente 500%, o en aproximadamente 10% a aproximadamente 200%, o en aproximadamente 10% a aproximadamente 300%, o en aproximadamente 10% a aproximadamente 400%, o en aproximadamente 100% a aproximadamente 500%, o en aproximadamente 150% a aproximadamente 300%, o en aproximadamente 200% a aproximadamente 500% en el caso de que se utilice un vector de la exposición en combinación con un agente de contraste tal como se indica en la presente memoria, respecto a la transducción de un vector de la exposición en el caso de que no se utilice en combinación con un agente de contraste.

En algunos aspectos, se encuentra contemplado que la transducción de células se encuentre adicionalmente incrementada en el caso de que se utilice un vector de la exposición en combinación con un agente de contraste y en el caso de que el paciente se coloque en posición de Trendelenberg (posición cabeza abajo). En algunas realizaciones, por ejemplo, el paciente se inclina en la posición de cabeza abajo entre aproximadamente 1 grado y aproximadamente 30 grados, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 grados, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 60 grados, entre aproximadamente 60 y aproximadamente 90 grados o entre aproximadamente 90 hasta aproximadamente 180 grados) durante o después de la infusión intratecal de vector. En diversas realizaciones, la transducción de células se encuentra incrementada en por lo menos aproximadamente 1%, o en por lo menos aproximadamente 5%, en por lo menos aproximadamente 10%, en por lo menos aproximadamente 20%, en por lo menos aproximadamente 30%, en por lo menos aproximadamente 40%, en por lo menos aproximadamente 50%, en por lo menos aproximadamente 60%, en por lo menos aproximadamente 70%, en por lo menos aproximadamente 80%, en por lo menos aproximadamente 90%, en por lo menos aproximadamente 100%, en por lo menos aproximadamente 120%, en por lo menos aproximadamente 150%, en por lo menos aproximadamente 180%, en por lo menos aproximadamente 200%, en por lo menos aproximadamente 250%, en por lo menos aproximadamente 300%, en por lo menos aproximadamente 350%, en por lo menos aproximadamente 400%, en por lo menos aproximadamente 450%, en por lo menos aproximadamente 500% o más en el caso de que se utilice un vector de la exposición en combinación con un agente de contraste y la posición de

Trendelenberg tal como se indica en la presente memoria, respecto a la transducción de un vector de la exposición en el caso de que no se utilice en combinación con un agente de contraste y en posición de Trendelenberg. En realizaciones adicionales, la transducción de células se encuentra incrementada en aproximadamente 10% a aproximadamente 50%, en aproximadamente 10% a aproximadamente 100%, o en aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, en aproximadamente 5% a aproximadamente 50%, o en aproximadamente 1%, a aproximadamente 500%, o en aproximadamente 10% a aproximadamente 200%, o en aproximadamente 10% a aproximadamente 300%, o en aproximadamente 10% a aproximadamente 400%, o en aproximadamente 100% a aproximadamente 500%, o en aproximadamente 150% a aproximadamente 300%, o en aproximadamente 200% a aproximadamente 500% en el caso de que se utilice un vector de la exposición en combinación con un agente de contraste y posición de Trendelenberg tal como se indica en la presente memoria, respecto a la transducción de un vector de la exposición en el caso de que no se utilice en combinación con un agente de contraste y posición de Trendelenberg.

La exposición proporciona además aspectos en los que la administración intratecal de un vector de la exposición y un agente de contraste en el sistema nervioso central de un paciente que lo necesita resulta en un incremento de la supervivencia del paciente respecto a la supervivencia del paciente en el caso de que se administre un vector de la exposición en ausencia del agente de contraste. En diversas realizaciones, la administración de un vector de la exposición y un agente de contraste en el sistema nervioso central de un paciente que lo necesita resulta en un incremento de la supervivencia del paciente de por lo menos aproximadamente 1%, de por lo menos aproximadamente 5%, de por lo menos aproximadamente 5%, de por lo menos aproximadamente 10%, de por lo menos aproximadamente 20%, de por lo menos aproximadamente 30%, de por lo menos aproximadamente 40%, de por lo menos aproximadamente 50%, de por lo menos aproximadamente 60%, de por lo menos aproximadamente 70%, de por lo menos aproximadamente 80%, de por lo menos aproximadamente 90%, de por lo menos aproximadamente 100%, de por lo menos aproximadamente 150%, de por lo menos aproximadamente 200% más respecto a la supervivencia del paciente en el caso de que se administre un vector de la exposición en ausencia del agente de contraste.

La exposición proporciona además aspectos en los que la administración intratecal de un vector de la exposición y un agente de contraste en el sistema nervioso central de un paciente que lo necesita colocado en la posición de Trendelenberg resulta en un incremento adicional de la supervivencia del paciente respecto a la supervivencia del paciente en el caso de que se administre un vector de la exposición en ausencia del agente de contraste y en la posición de Trendelenberg. En diversas realizaciones, la administración de un vector de la exposición y un agente de contraste en el sistema nervioso central de un paciente que lo necesita colocado en posición de Trendelenberg resulta en un incremento de la supervivencia del paciente de por lo menos aproximadamente 1%, de por lo menos aproximadamente 5%, de por lo menos aproximadamente 5%, de por lo menos aproximadamente 10%, de por lo menos aproximadamente 20%, de por lo menos aproximadamente 30%, de por lo menos aproximadamente 40%, de por lo menos aproximadamente 50%, de por lo menos aproximadamente 60%, de por lo menos aproximadamente 70%, de por lo menos aproximadamente 80%, de por lo menos aproximadamente 90%, de por lo menos aproximadamente 100%, de por lo menos aproximadamente 150%, de por lo menos aproximadamente 200% más respecto a la supervivencia del paciente en el caso de que se administre un vector de la exposición en ausencia del agente de contraste y en la posición de Trendelenberg.

El experto ordinario en la materia entenderá que un polinucleótido administrado utilizando los materiales de la invención puede someterse a control regulador utilizando sistemas conocidos de la técnica. A modo de ejemplo no limitativo, se entiende que pueden utilizarse sistemas tales como el sistema de tetraciclina (TET, on/off) [ver, por ejemplo, Urlinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(14):7963-7968, 2000] para mejoras recientes del sistema TET] y sistema regulable de receptor de ecdisona [Palli et al., Eur. J. Biochem. 270: 1308-1315, 2003] para proporcionar una expresión de polinucleótido inducible. El experto en la materia también entenderá que pueden utilizarse combinaciones de cualquiera de los métodos y materiales contemplados en la presente memoria para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

La presente invención se ilustra mediante los ejemplos siguientes, en los que el Ejemplo 1 describe la producción de un VAA9r ejemplar; el Ejemplo 2 describe la administración intratecal de VAA9r; el Ejemplo 3 describe el incremento de supervivencia de los ratones mutantes para SMN tras la inyección intracerebroventricular (ICV) de SMN de VAA9r con agente de contraste, y el Ejemplo 4 describe la transducción de neuronas motoras con un VAA9r en monos *Cynomolgus*.

Ejemplo 1

La capacidad de VAA9r de reconocer y expresar proteína en el sistema nervioso central se evaluó en un sistema modelo in vivo. El genoma de VAAr incluía en secuencia un RTI de VAA2, el promotor de β -actina de pollo con un intensificador de citomegalovirus, un intrón de SV40, ADN de proteína fluorescente verde (PFV),

una secuencia de señal de poliadenilación de hormona del crecimiento bovina y otro RTI de VAA2 tal como se ha indicado anteriormente en Bevan et al., Molecular Therapy 19(11): 1971-1980, 2011.

Se produjo VAA9 autocomplementario (PFV de VAA9) mediante procedimientos de transfección transitoria utilizando un vector CB-GFP basado en RTI de VAA2 de doble cadena con un plásmido codificante de secuencia de Rep2Cap9 tal como se ha indicado anteriormente [Gao et al., J. Virol. 78: 6381-6388, 2004]] junto con un plásmido ayudante adenovirico pHelper (Stratagene, Santa Clara, CA) en células 293. Se verificó la secuencia de serotipo 9 mediante secuenciación y era idéntica a la descrita anteriormente. Se produjo virus en tres lotes separados para los experimentos y se purificó mediante dos etapas de purificación en gradiente de densidad de cloruro de cesio, se dializó frente a PBS y se formuló con Pluronic-F68 al 0,001% para evitar la agregación del virus y se almacenó a 4°C. Todas las preparaciones de virus se titularon mediante PCR cuantitativa utilizando tecnología Taq-Man. Se evaluó la pureza de los vectores mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-acrilamida al 4-12% y tinción de plata (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Ejemplo 2

Aunque algunos trastornos neurológicos están causados por defectos en proteínas de expresión ubicua, en otros trastornos la expresión génica sólo en el SNC puede presentar un impacto sustancial. La invención contempla que la administración génica en el CSF pueda producir la transducción junto con la neuraxis con el beneficio añadido de reducir potencialmente la dosis requerida. De esta manera, para llevar a cabo una administración en el SNC más localizada, se llevaron a cabo inyecciones intratecales y/o intracisternales de $5,2 \times 10^{12}$ vg/kg de PFV de VAA9 y un agente de contraste de baja osmolaridad no iónico en cerdos de 5 días (n=3 cada uno), y se examinaron sus cerebros y médulas espinales para la expresión de PFV.

Inyección intratecal. Se obtuvieron cerdas de granja (*Sus scrofa domestica*) de una granja regional. Lechones de cinco días (P5) recibieron 0,5 cm³/kg de anestesia de inducción con quetamina y después se mantuvieron mediante cámara de inhalación con isoflurano al 5% en oxígeno. Se monitorizó la temperatura corporal, electrocardiograma y tasa respiratoria durante todo el procedimiento. Para la punción lumbar, los lechones se colocaron boca abajo y se flexionó la columna para ensanchar los espacios intervertebrales. Se palparon las espinas ilíacas anterior-superior y se visualizó una línea que conectaba los dos puntos. El espacio intervertebral rostral con respecto a dicha línea es L5-L6. La fluoroscopia intraoperatoria confirmó las trayectorias rostral-caudal y mediolateral. Utilizando la técnica estéril, se insertó una aguja de calibre 25 unida a una jeringa de 1 ml. Se aplicó una presión negativa suave en la jeringa a medida que pasaba la aguja hasta visualizar CSF transparente. Para la punción cisternal, se flexionó la cabeza del lechón, manteniendo simultáneamente la integridad de las vías respiratorias. La fluoroscopia nuevamente confirmó una trayectoria adecuada. Se inyectó una aguja de calibre 25 en posición inmediatamente caudal al hueso occipital y el CSF transparente confirmó la entrada en la cisterna magna.

Para la administración de vector o de control, se retiró la jeringa manteniendo la aguja en su sitio. Se fijó una segunda jeringa de 1 cm³ que contenía solución vírica ($5,2 \times 10^{12}$ vg/kg) o PBS y la solución se inyectó en el espacio intratecal a una tasa lenta y constante. Tras la administración, se pasaron ~0,25 ml de PBS estéril por la aguja espinal con el fin de garantizar la administración completa del reactivo. Se utilizó un agente radioopaco yohexol [Omnipaque™ (yohexol, N,N'-Bis(2,3-dihidroxiopropil)-5-[N(2,3-dihidroxiopropil)-acetamido]-2,4,6-trioldo-isofthalamida), GE Healthcare, Waukesha, WI] y se registró la extensión intratecal mediante fluoroscopia continua en tiempo real.

Perfusión y procesamiento de los tejidos. Todos los sujetos se sacrificaron entre los 21 y 24 días después de la inyección. Los sujetos fueron anestesiados profundamente mediante inyección intramuscular de Telazol seguido de Propofol. Se llevó a cabo una toracotomía esternal medioventral y se insertó una cánula en la aorta a través del ventrículo izquierdo. Se abrió la aurícula derecha y se inyectaron 0,5-1 l de PBS a través de la cánula mediante flujo de gravedad, seguido de la perfusión con 1 l de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (pH 7,4). Se extrajeron los órganos y se post-fijaron durante 48 horas en paraformaldehído al 4% antes del procesamiento posterior para el corte histológico o se almacenaron a largo plazo en solución de PBS-NaN₃ al 0,1%.

Histología y microscopía. Se incluyeron segmentos de médula espinal en agarosa al 3% antes el corte en secciones horizontales de 40 µm utilizando un micrótopo vibratorio Leica VT1200 (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL). Las secciones se transfirieron en solución salina tamponada con Tris y se almacenaron a 4°C hasta el procesamiento. Los cerebros se crioprotegieron mediante incubación sucesiva en soluciones de sacarosa al 10%, al 20% y al 30%. Una vez suficientemente crioprotegidos (habiendo sedimentado en solución de sacarosa al 30%), se congelaron los cerebros y se montaron completos en un micrótopo deslizante Leica SM 2000R modificado (Leica Microsystems) en OCT (Tissue-Tek, Torrance, CA) y se cortaron en secciones coronales de 40 µm.

Para la determinación inmunofluorescente de los tipos celulares transducidos, se sumergieron secciones flotantes en solución de bloqueo (suero de burro al 10%, Triton-X100 al 1% en solución salina tamponada con Tris) durante 1 hora, seguido de la incubación durante la noche en solución de anticuerpo primario a 4°C. Se utilizaron los anticuerpos primarios siguientes en este estudio: anticuerpo de conejo anti-GFP (1:500, Invitrogen), anticuerpo de cabra anti-ChAT (1:100, Millipore, Billerica, MA), anticuerpo de cobaya anti-GFAP (1:1.000, Advanced Immunochemical, Long Beach, CA) y anticuerpo de conejo anti-Ibal (1:500, Dako, Carpintería, CA). Los anticuerpos primarios se detectaron utilizando anticuerpos secundarios conjugados con Fitc, Cy3 o Cy5 (1:1.000, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) y se montaron en medio PVA-DABCO.

Para la tinción inmunohistoquímica, las secciones se incubaron a temperatura ambiente en solución de H₂O₂ al 0,5%/MeOH al 10% y posteriormente se bloquearon y se tñeron tal como anteriormente con anticuerpo de conejo anti-GFP durante la noche. Se detectaron los anticuerpos anti-GFP utilizando anticuerpo secundario de burro anticonejo biotinilado (1:200, Jackson ImmunoResearch) y se revelaron utilizando Vector NovaRed siguiendo el protocolo proporcionado (Vector Labs, Burlingame, CA). A continuación, se montaron las secciones en medio Cytoseal 60 (Thermo Fisher Scientific, Kalamazoo, MI).

Los tejidos no neurales se cortaron en bloques de ~1 cm³ y se crioprotegieron mediante incubación durante la noche en solución de sacarosa al 30%. A continuación, se incluyeron en goma tragacanto y se congelaron instantáneamente en isopentano enfriado con nitrógeno líquido. Las muestras se cortaron mediante criostato en secciones de 10 a 12 µm y los portaobjetos se almacenaron a -20°C. Se detectó la expresión de GFP mediante un protocolo de inmunofluorescencia similar tal como anteriormente, con la adición de DAP en solución de anticuerpo secundario (1:1.000, Invitrogen).

Se capturaron imágenes fluorescentes utilizando un microscopio confocal Zeiss 710 Meta (Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY) situado en TRINCH y se procesaron con software LSM.

Se escanearon secciones de cerebro completo hasta una resolución de x40 en el Biopathology Center in the Research Informatics Core del Research Institute at Nationwide Children's Hospital utilizando un escaneador automático de portaobjetos (Aperio, Vista, CA) y las imágenes resultantes se procesaron con el software ImageScope.

En todos los animales, se observó expresión de GFP en los ganglios de la raíz dorsal, así como en la materia gris y blanca de la médula espinal. Resulta importante que la inyección de GFP de VAA9 en el espacio cisternal en la base del cráneo o en el espacio intratecal en L5 resultó en una transducción extensiva de las neuronas motoras y glía en todos los niveles de la médula espinal según el examen realizado mediante hibridación in situ. Las neuronas del asta ventral grande también resultaron positivas para la expresión de GFP según la inmunohistoquímica en todos los niveles de la médula espinal. La inmunofluorescencia confirmó que las células GFP⁺ expresaban el marcador de neuronas motoras ChAT.

Finalmente, con el fin de caracterizar adicionalmente el patrón de expresión tras la inyección cisternal o intratecal de VAA9-GFP en cerdos de 5 días, se examinaron los cerebros para la expresión de transgenes nuevamente utilizando la inmunofluorescencia de GFP. Las regiones con los niveles más altos de expresión de GFP fueron las células de Purkinje cerebelares, las fibras nerviosas dentro de la médula, así como núcleos discretos, tales como el núcleo olivar. La expresión en el resto del cerebro se encontraba restringida a células dispersas próximas a las superficies meníngeas. El examen de la expresión de GFP en los órganos periféricos no rindió expresión de GFP visible, indicando que la mayor parte del virus se localizaba en el SNC.

De esta manera, la inyección de VAA9 en el líquido cefalorraquídeo de cerdos jóvenes se dirigió eficientemente a las neuronas motoras.

Ejemplo 3

Se sometieron a ensayo los efectos de la administración in vivo de SMN de VAA9r [ver Foust et al., Nature Biotechnology 28(3): 271-274, 2010) y la descripción anterior en la presente memoria, en la que la secuencia de la inserción de genoma del vector se muestra como nucleótidos 980 a 3.336 de SEC ID nº 1] y agente de contraste en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de ratones mutantes para SM.

Brevemente, se mezcló SMN de VAA9r con agente de contraste, seguido de la inyección ICV para introducir la composición en el LCR de ratones mutantes para SMN. A modo de experimento de control, se inyectó vector de SMN de VAA9r sin agente de contraste en un grupo separado de ratones mutantes para SMN.

Los resultados demostraron que la inyección de SMN de VAA9r a razón de ~10⁸ vg/kg con agente de contraste rindió una mediana de supervivencia de los ratones mutantes para SMN de 20 días, mientras que la

inyección de una cantidad equivalente de SMN de VAA9r en ausencia de agente de contraste condujo a una supervivencia nula.

- 5 La inyección de SMN de VAA9r a razón de $\sim 10^9$ vg/kg con agente de contraste rindió una mediana de supervivencia de los ratones mutantes para SMN de más de 70 días, frente a una supervivencia nula de ratones mutantes para SMN que habían sido inyectados con una cantidad equivalent de SMN de VAA9r en ausencia de agente de contraste.
- 10 Finalmente, la inyección de SMN de VAA9r a razón de $\sim 10^{10}$ vg/kg con agente de contraste rindió una mediana de supervivencia de los ratones mutantes para SMN de más de 100 días, frente a una mediana de supervivencia de 70 días en ratones mutantes para SMN que habían sido inyectados con una cantidad equivalente de SMN de VAA9r en ausencia de agente de contraste.
- 15 De esta manera, la supervivencia de los ratones mutantes para SMN se incrementa tras la inyección de SMN de VAA9r con agente de contraste, respecto a la supervivencia de ratones mutantes para SMN tras la inyección de SMN de VAA9r en ausencia de agente de contraste.

Ejemplo 4

- 20 Tres monos Cynomolgus de un año de edad recibieron inyecciones intratecales de 1×10^{13} vg/Kg de VAA9r codificante de ARNhp y GFP. La inyección se llevó a cabo mediante punción lumbar en el espacio subaracnoideo del saco tecal lumbar. Se resuspendió el VAA9r con omnipaque (yohexol), un compuesto yodado que se utiliza rutinariamente en el contexto clínico. Se utilizó yohexol para validar que se había
- 25 canulado con éxito el espacio subaracnoideo y se administró a una dosis de 100 mg/kg. El colocó el sujeto en posición de decúbito lateral y se identificó el sitio de inyección en la línea media posterior en el nivel $\sim L4/5$ identificado (bajo el cono de la médula espinal). Bajo condiciones estériles, se insertó una aguja espinal con estilete y se confirmó la canulación subaracnoidea con el flujo de LCR transparente por la aguja. Con el fin de reducir la presión en el espacio subaracnoideo, se drenaron 0,8 ml de LCR, seguido inmediatamente de la inyección con una mezcla que contenía 0,7 ml de yohexol (formulación de 300 mg/ml) mezclada con 2,1 ml
- 30 de virus (2,8 ml en total). Con el fin de investigar si la distribución del flujo rostral del virus podía mejorar la transducción celular en la zona cervical, se dejó que un sujeto se recuperase en la posición de decúbito lateral y el segundo y tercer sujetos se inclinaron en la posición de Trendelenberg (posición de cabeza abajo). Éste es un procedimiento rutinario al llevar a cabo mielogramas de TC en sujetos humanos.
- 35 Los monos Cynomolgus inyectados con virus se eutanizaron 2 semanas después de la inyección. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico a la dosis de 80 a 100 mg/kg por vía intravenosa y se perfundieron con solución salina. Se llevó a cabo una disección cerebral y de la médula espinal inmediatamente y los tejidos se procesaron para el aislamiento de los ácidos nucleicos (congelados instantáneamente) o se postfijaron en paraformaldehído al 4% y posteriormente se crioprotegieron con
- 40 sacarosa al 30% y se congelaron en isopentano a -65°C . Se recogieron secciones coronales de 12 μm de la médula lumbar utilizando un criostato para la inmunotinción en flotación libre con proteína fluorescente verde (GFP) a fin de identificar las células transducidas por el virus y colina acetiltransferasa (Chat, por sus siglas en inglés) para identificar las neuronas motoras. Se contaron las células doble positivas en 10 secciones de médula cervical, torácica y lumbar y se normalizó su número respecto al número total de células positivas
- 45 para Chat en el mismo segmento.
- Los recuentos celulares revelaron que la inclinación de los sujetos tras la infusión de virus resultaba en una mejora de dos veces (100%) de la transducción de las neuronas motoras en los niveles torácico y cervical.
- 50 Aunque la presente invención ha sido descrita en términos de diversas realizaciones y ejemplos, se entiende que el experto en la materia podrá concebir variaciones y mejoras. Por lo tanto, sólo limitaciones tales como las aparecidas en las reivindicaciones deben aplicarse a la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para usarse en el tratamiento de una enfermedad neurológica en un paciente en necesidad de esto, donde la composición comprende un AAV9 recombinante (VAA9r), y el uso comprende administrar la composición al paciente por inyección intratecal, intracisternal o intracerebroventricular en combinación con un agente de contraste no iónico, de baja osmolaridad, donde el VAA9r comprende un genoma de VAA9r que incluye un polinucleótido terapéutico, donde el genoma de VAA9r es un genoma monocatenario y/o el genoma de VAA9r es un genoma autocomplementario y donde la enfermedad neurológica es enfermedad de CLN1, enfermedad de CLN2, enfermedad de CLN3, enfermedad de CLN4, enfermedad de CLN5, enfermedad de CLN6, o enfermedad de CLN8.
2. Una combinación para usarse en el tratamiento de una enfermedad neurológica en un paciente en necesidad de esto, donde la combinación comprende un VAA9r y un agente de contraste no iónico, de baja osmolaridad, y el uso comprende administrar la combinación al paciente por inyección intratecal, intracisternal o intracerebroventricular, donde el VAA9r comprende un genoma de VAA9r que incluye un polinucleótido terapéutico, donde el genoma de VAA9r es un genoma monocatenario y/o el genoma de VAA9r es un genoma autocomplementario y donde la enfermedad neurológica es enfermedad de CLN1, enfermedad de CLN2, enfermedad de CLN3, enfermedad de CLN4, enfermedad de CLN5, enfermedad de CLN6, o enfermedad de CLN8.
3. La composición para usarse de la reivindicación 1 o la combinación para usarse de la reivindicación 2, donde la composición o combinación se administra al cerebro o médula espinal del paciente.
4. La composición o combinación para usarse de la reivindicación 3, donde la administración al cerebro o médula espinal comprende la administración a un tronco encefálico.
5. La composición o combinación para usarse de la reivindicación 3, donde la administración al cerebro o médula espinal comprende la administración a una corteza motora.
6. La composición o combinación para usarse de la reivindicación 3, donde la administración al cerebro o médula espinal comprende la administración a una célula nerviosa, una célula glial, o ambas.
7. La composición o combinación para usarse de la reivindicación 3, donde la administración al cerebro o médula espinal comprende la administración a una neurona, una neurona motora inferior, una célula microglial, un oligodendrocito, un astrocito o una célula de Schwann.
8. La composición para usarse o combinación para usarse de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde el agente de contraste no iónico, de baja osmolaridad es iobitridol, iohexol, iomeprol, iopamidol, iopentol, iopromida, ioversol, o ioxilano.
9. La composición para usarse o combinación para usarse de acuerdo con la reivindicación 8, donde el agente de contraste no iónico, de baja osmolaridad es iohexol.
10. La composición o combinación para usarse de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el paciente se coloca en la posición de Trendelenberg después de la administración intratecal del VAA9r.