

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 905 616**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2008 E 17168189 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.11.2021 EP 3252161**

54 Título: **Terapia génica para enfermedades de almacenamiento lisosómico**

30 Prioridad:

06.06.2007 US 924947 P

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

11.04.2022

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**DODGE, JAMES y
CHENG, SENG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 905 616 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

Terapia génica para enfermedades de almacenamiento lisosómico

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al área de las enfermedades de almacenamiento lisosómico.

5 COMPENDIO DE LA INVENCION

La terapia génica es una modalidad de tratamiento emergente para trastornos que afectan al sistema nervioso central (SNC). La terapia génica para el SNC se ha facilitado por medio del desarrollo de vectores víricos capaces de infectar de forma eficaz neuronas posmitóticas. El sistema nervioso central está compuesto por la médula espinal y el cerebro. La médula espinal conduce la información sensorial desde el sistema nervioso periférico hacia el cerebro y conduce la información motora desde el cerebro hacia diversos efectores. Para obtener una descripción de los vectores víricos para suministro génico al sistema nervioso central, véase Davidson et al. (2003) Nature Rev. 4:353-364.

Los vectores de virus adeno-asociado (VAA) se consideran útiles para la terapia génica del SNC debido a que tienen una toxicidad y un perfil de inmunogenicidad favorables, son capaces de transducir células neuronales y son capaces de medir la expresión a largo plazo en el SNC (Kaplitt et al. (1994) Nat. Genet. 8:148-154; Bartlett et al. (1998) Hum. Gene Ther. 9:1181-1186; y Passini et al. (2002) J. Neurosci. 22:6437-6446).

Una propiedad útil de los vectores de VAA se encuentra en la capacidad de algunos vectores de VAA para sufrir transporte retrógrado y/o anterógrado en células neuronales. Las neuronas en una región cerebral están interconectadas por medio de axones a regiones cerebrales distales, de esta forma se proporciona un sistema de transporte para el suministro de vectores. Por ejemplo, se puede administrar un vector de VAA a o cerca de porciones terminales del axón de las neuronas. Las neuronas internalizan el vector de VAA y los transportan de forma retrógrada a lo largo del axón hacia el cuerpo celular. Se ha demostrado que propiedades similares de adenovirus, HSV (siglas en inglés para «virus del herpes simple») y virus de la seudorrabia para suministrar genes a estructuras distales dentro del cerebro (Soudas et al. (2001) FASEB J. 15:2283-2285; Breakefield et al. (1991) New Biol. 3:203-218; y de Falco et al. (2001) Science, 291:2608-2613).

Varios grupos han informado que la transducción del cerebro mediante el serotipo 2 de VAA (VAA2) se limita al sitio de inyección intracraneana (Kaplitt et al. (1994) Nat. Genet. 8:148-154; Passini et al. (2002) J. Neurosci. 22:6437-6446; y Chamberlin et al. (1998) Brain Res. 793:169-175). Informes recientes sugieren que el transporte axonal retrógrado de vectores víricos neurotróficos también se puede producir en circuitos seleccionados del cerebro de rata normal (Kaspar et al. (2002) Mol. Ther. 5:50-56 (vector de VAA); Kasper et al. (2003) Science 301:839-842 (vector lentivírico) y Azzouz et al. (2004) Nature 429:413-417 (vector lentivírico). Roaul et al. (2005) Nat. Med. 11(4):423-428 y Ralph et al. (2005) Nat. Med. 11(4):429-433 informaron que la inyección intramuscular de lentivirus que expresa ARN que interfiere con la Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1) humana de silenciamiento retardó la aparición de la enfermedad esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en un modelo roedor de ELA terapéuticamente relevante.

Las células transducidas por vectores de VAA pueden expresar un producto transgénico terapéutico, tal como una enzima para mediar efectos beneficiosos de forma intracelular. Estas células también pueden secretar el producto transgénico terapéutico, que posteriormente pueden absorber las células distales en las que mediar sus efectos beneficiosos. Este proceso se ha descrito como corrección cruzada (Neufeld et al. (1970) Science 169:141-146).

Un grupo de trastornos metabólicos conocido como enfermedades de almacenamiento lisosómico (EAL) incluye más de cuarenta trastornos genéricos, muchos de estos se relacionan con defectos genéticos en diversas hidrolasas lisosómicas. Las enfermedades de almacenamiento lisosómico representativas y las enzimas defectuosas asociadas se indican en la Tabla 1.

TABLA 1

Enfermedad de almacenamiento lisosómico	Enzima defectuosa
Aspartilglucosaminuria	Aspartilglucosaminidasa
Fabry	alfa.-Galactosidasa A
Enfermedad de Batten infantil* (CNL1)	Palmitoil proteína tioesterasa
Enfermedad de Batten infantil tardía clásica* (CNL2)	Tripeptidil peptidasa
Enfermedad de Batten juvenil* (CNL3)	Proteína transmembranaria lisosómica

Enfermedad de almacenamiento lisosómico	Enzima defectuosa
Batten, otras formas* (CNL4-CNL8)	Múltiples productos génicos
Cistinosis	Transportador de cisteína
Farber	Ceramidasa ácida
Fucosidosis	.alfa.-L-fucosidasa ácida
Galactosidosialidosis	Proteína protectora/catepsina A
Gaucher tipos 1, 2* y 3*	.beta.-Glucosidasa ácida
Gangliosidosis G.sub.M1*	.beta.-Galactosidasa ácida
Hunter*	Iduronato-2-sulfatasa
Hurler-Scheie*	alfa.-L-Iduronidasa
Krabbe*	Galactocerebrosidasa
alfa-Manosidosis*	.alfa.-Manosidasa ácida
beta-Manosidosis*	.beta.-Manosidasa ácida
Maroteaux-Lamy	Arilsulfatasa B
Leucodistrofia metacromática*	Arilsulfatasa A
Morquio A	N-Acetilgalactosamina-6-sulfato
Morquio B	.beta.-Galactosidasa ácida
Mucopolipidosis II/III*	N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa
Niemann-Pick A*, B	Esfingomielinasa ácida (Ema)
Niemann-Pick C*	NPC-1
Pompe* Ácido	.alfa.-glucosidasa
Sandhoff*	.beta.-hexosaminidasa B
Sanfilippo A*	Heparán N-sulfatasa
Sanfilippo B*	.alfa.-N-Acetilglucosaminidasa
Sanfilippo C*	Acetil-CoA: alfa.-glucosaminida
Sanfilippo D*	N-Acetilglucosamina-6-sulfato
Enfermedad de Schindler*	.alfa.-N-Acetilgalactosaminidasa
Schindler-Kanzaki.	Alfa.-N-Acetilgalactosaminidasa
Sialidosis	.alfa.-Neuramidasa

Enfermedad de almacenamiento lisosómico	Enzima defectuosa
Sly*	.beta.-Glucuronidasa
Tay-Sachs*	.beta.-hexosaminidasa A
Wolman*	Lipasa ácida
*Afectación del SNC	

5 El rasgo típico de la EAL es la acumulación anormal de metabolitos en los lisosomas que conduce a la formación de grandes cantidades de lisosomas distendidos en el pericarión. Uno de los principales desafíos en el tratamiento de EAL (a diferencia del tratamiento de una enzimopatía específica hepática) es la necesidad de revertir la patología del almacenamiento lisosómico en múltiples tejidos separados. Algunas EAL se pueden tratar de forma eficaz mediante infusión intravenosa de la enzima faltante, lo que se conoce como terapia de reemplazo enzimático (TRE). Por ejemplo, los pacientes con Gaucher tipo 1 tienen solo una enfermedad visceral y responden de forma favorable a la TRE con glucocerebrosidasa recombinante (Cerezyme™, Genzyme Corp.). Sin embargo, los pacientes con una enfermedad metabólica que afecta al SNC (por ejemplo, la enfermedad de Gaucher tipo 2 o 3) responden de forma parcial a la TRE intravenosa debido a que la barrera hematoencefálica (BHE) impide que la enzima de reemplazo ingrese al cerebro. Asimismo, los intentos de introducir una enzima de reemplazo en el cerebro mediante inyección directa se han visto limitados en parte debido a la citotoxicidad enzimática a concentraciones locales elevadas y a las tasas de difusión parenquimatosa limitadas en el cerebro (Partridge, Peptide Drug Delivery to the Brain, Raven Press, 1991).

15 Sands y Davidson (2006) Molecular Therapy 13(5):839-849 es un artículo de revisión que se refiere a estrategias de sustitución de genes para órganos diana afectados en muchas enfermedades de almacenamiento lisosómico y sistemas de vectores para examinar la mejor manera de lograr terapias de larga duración para estas enfermedades mortales.

20 Liu et al. (2005) The Journal of Neuroscience 25(41):9321-9327 se refiere a si los vectores de VAA4 podrían mediar la función global y mejoras patológicas en un modelo murino de mucopolisacaridosis de tipo VII causado por deficiencia de beta-glucuronidasa.

Karolewski y Wolfe (2006) Molecular Therapy 14(1):14-24 se refiere a los efectos de transferir un gen correctivo en el cerebro fetal antes del inicio de la patología en el ratón con mucopolisacaridosis de tipo VII.

25 Una EAL ilustrativa es la enfermedad de Niemann-Pick tipo A (NPA). Según UniProtKB/Swiss-Prot entrada P17405, defectos en el gen SMPD1, ubicado en el cromosoma 11, (11p15.4-p15.1), son la causa de la enfermedad de Niemann-Pick tipo A (NPA), también denominada forma infantil clásica. La enfermedad de Niemann-Pick es un trastorno recesivo clínica y genéticamente heterogéneo. Su causa es la acumulación en los lisosomas de esfingomielina y otros lípidos metabólicamente relacionados, que resulta en neurodegeneración que se inicia en los primeros años de vida. Los pacientes pueden presentar xantomas, pigmentación, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía y retardo mental. La enfermedad de Niemann-Pick aparece con más frecuencia en individuos con ascendencia judía Ashkenazi que en la población general. La NPA se caracteriza por un inicio muy temprano en la lactancia y por una evolución progresiva rápida que conduce a la muerte en tres años. La enzima esfingomielinasa ácida (EMa) convierte la esfingomielina en ceramida. La EMa también posee actividades de fosfolipasa C en relación con 1,2-diacilglicerolfosfolina y 1,2-diacilglicerolfosfoglicerol. La enzima convierte

$$\text{Esfingomielina} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{N-acilesfingosina} + \text{colina fosfato.}$$

35 Las enfermedades de almacenamiento lisosómico se pueden tratar utilizando suministro intraventricular de la enzima etiológicamente deficiente en la enfermedad. La administración se puede llevar a cabo lentamente para lograr el máximo efecto. Los efectos se observan en ambos lados de la barrera hematoencefálica, lo que lo convierte en un medio de suministro útil para enfermedades de almacenamiento lisosómico que afectan al cerebro y/u órganos viscerales.

40 Sin embargo, todavía existe la necesidad de composiciones y métodos adicionales para tratar enfermedades de almacenamiento lisosómico (EAL) en sujetos primates, incluidos pacientes humanos. Esta invención satisface esta necesidad y proporciona además ventajas relacionadas.

45 La presente descripción proporciona métodos y composiciones para suministrar un transgén al SCN y/u órganos viscerales afectados de un sujeto mediante administración intraventricular de un vector vírico neurotrófico recombinante que contiene un transgén que codifica para una enzima defectuosa en una enfermedad de almacenamiento lisosómico. El suministro vírico puede hacerse en condiciones que favorecen la expresión del transgén en endimocitos.

La descripción proporciona métodos y composiciones para suministrar un transgén al SNC y/u órganos viscerales afectados de un sujeto mediante administración intraventricular de un vector vírico neurotrófico recombinante que comprende un transgén que codifica para una o más enzimas seleccionados del grupo que consiste en aspartilglucosaminidasa, alfa.-galactosidasa A, palmitoil proteína tioesterasa, tripeptidil peptidasa, proteína transmembranaria lisosómica, múltiples productos génicos, transportador de cisteína, ceramidasa ácida, .alfa.-L-fucosidasa ácida, proteína protectora/catepsina A, .beta.-glucosidasa ácida, .beta.-galactosidasa ácida, iduronato-2-sulfatasa, alfa.-L-iduronidasa, galactocerebrosidasa, .alfa.-manosidasa ácida, .beta.-manosidasa ácida, arilsulfatasa B, arilsulfatasa A, N-acetilgalactosamina-6-sulfato, .beta.-galactosidasa ácida, N-acetilglucosamina-1-, esfingomielinasa ácida, NPC-1, .alfa.-glucosidasa, .beta.-hexosaminidasa B, heparán N-sulfatasa, .alfa.-N-acetilglucosaminidasa, acetil-CoA: alfa.-glucosaminida, N-acetilglucosamina-6-sulfato, alfa.-N-Acetilgalactosaminidasa, alfa.-N-Acetilgalactosaminidasa, .alfa.-neuramidasa, .beta.-glucuronidasa, .beta.-hexosaminidasa A y lipasa ácida. El suministro vírico puede hacerse en condiciones que favorecen la expresión del transgén en endimocitos.

En una instancia adicional, la descripción proporciona composiciones y método para mejorar los síntomas de una enfermedad de almacenamiento lisosómico en un sujeto mediante la administración de un vector vírico neurotrófico recombinante que contiene el transgén terapéutico al cerebro del sujeto y en condiciones que favorecen la expresión del transgén en una cantidad terapéuticamente eficaz. La presente invención proporciona un vector de VAA recombinante que comprende un transgén que codifica la beta glucosidasa ácida para usar en un método para tratar la enfermedad de Gaucher en un sujeto, en el que el método comprende administrar el vector de VAA recombinante a al menos un ventrículo del cerebro, de modo que dicho transgén se expresa en una cantidad terapéuticamente eficaz, en el que el vector de VAA recombinante es un vector de VAA4 o VAA5, en el que la beta glucosidasa ácida expresada es suministrada al sistema nervioso central y órganos viscerales afectados y en el que el sujeto es un mamífero.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra la expresión de la proteína verde fluorescente (PVF) en ratones tratados con VAA4-PVF. La PVF se distribuye por la capa de endimocitos del sistema ventricular tras el suministro intraventricular de VAA4-PVF.

La figura 2 muestra la expresión de la proteína verde fluorescente (PVF) en ratones tratados con VAA4-PVF. La PVF se distribuye por la capa de endimocitos del canal central de la médula espinal tras el suministro intraventricular de VAA4-PVF.

La figura 3 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier que demuestra los datos de supervivencia de ratones K2 tratados con VAA-GC (VAA2/5GC; representados por triángulos) y el grupo testigo de la camada natural de referencia tratados con VAA-GC (NR; representados por triángulos invertidos). Los datos de supervivencia históricos de los ratones K2 en la colonia de ratones se agregaron a la curva de supervivencia de Kaplan-Meier (No tratados; representados por cuadrados). La diferencia entre el tiempo de supervivencia media de los ratones K2 no tratados y el tiempo de supervivencia media de los ratones K2 tratados con VAA-GC es estadísticamente significativa ($p < 0,0001$).

La figura 4 presenta la actividad de GC en el cerebro e hígado de ratones K2 tratados con VAA-GC (inyectados según se describió anteriormente) en comparación con diversos grupos testigo. El primer grupo testigo contenía el grupo de ratones «naturales de referencia», que no poseían alteraciones en el gen GC y, por lo tanto, presentaban expresión de GC endógena normal. Este grupo se trató con VAA-GC de la misma manera que los ratones K2 tratados (etiquetados como VAA5 NR en la figura 4). El segundo grupo testigo contenía el grupo de ratones «heterocigóticos» que poseen una copia alterada del gen GC y una copia no alterada del gen GC y, por lo tanto, expresan cierto nivel endógeno de GC. Estos ratones también se trataron con VAA-GC (etiquetados como VAA5 Het en la figura 4). El grupo testigo final también contenía el grupo de ratones «naturales de referencia», pero estos ratones no se trataron con VAA-GC (etiquetados como NR en la figura 4).

La figura 5 represente el crecimiento de los ratones K2 tratados con VAA-GC con el tiempo (medido por el peso) en comparación con el crecimiento con el tiempo de los ratones naturales de referencia tratados con VAA-GC. En este modelo de ratón e independientemente del genotipo, las crías de ratón de las camadas más pequeñas tienden a ser más grandes que las crías de ratón de las camadas más grandes. Para compensar esta variación en el tamaño de las crías de ratón como una función del tamaño de la camada, el peso de las crías de los ratones K2 se normaliza como un porcentaje de las crías de su propia camada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Para que la presente descripción se pueda entender más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Las definiciones adicionales se establecen a lo largo de la descripción detallada.

La puesta en práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están dentro del conocimiento de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª edición (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (1987)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH

(M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL y ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney, ed. (1987)).

5 Como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas singulares «un/una» y «el/la» incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término «una célula» incluye una pluralidad de células, incluidas mezclas de estas.

10 Como se usa en la presente, la expresión «que comprende/n» significa que las composiciones y métodos incluyen los elementos indicados, pero no excluyen otros. «Que consiste/n esencialmente en», cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará que se excluyen otros elementos de cualquier significado esencial para la combinación. Por lo tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos según se definen en la presente memoria no excluiría contaminantes traza del método de aislamiento y purificación y vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como disolución salina tamponada con fosfato, conservantes y similares. «Que consiste/n en» significará que se excluyen más que elementos traza de otros ingredientes y etapas del método sustanciales para administrar las composiciones de la presente descripción. Las instancias definidas mediante cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de la presente descripción.

15 Todas las designaciones numéricas, *p. ej.*, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluidos intervalos, son aproximaciones que varían (+) o (-) en incrementos de 0,1. Se entenderá, aunque no se indique siempre de forma explícita, que todas las designaciones numéricas están precedidas por la expresión «alrededor de». También se entenderá, aunque no se indique siempre de forma explícita, que los reactivos descritos en la presente memoria son meramente ilustrativos y que se conocen equivalentes de estos en la técnica.

20 El término «transgén» hace referencia a un polinucleótido que se introduce en una célula de y es capaz de transcribirse en ARN y opcionalmente, traducirse y/o expresarse en condiciones adecuadas. En un aspecto, confiere una propiedad deseada a una célula en la cual se introdujo o, de otra forma, conduce a un resultado terapéutico o de diagnóstico deseado.

25 Las expresiones «partículas genómicas (pg)» o «equivalentes genómicos» o «copias genómicas» (cg), como se usan en referencia a un título vírico, hacen referencia a la cantidad de viriones que contienen el genoma de ADN de VAA recombinante, independientemente de la infectividad o funcionalidad. La cantidad de partículas genómicas en una preparación de vector específica se puede medir mediante procedimientos tales como los descritos en los Ejemplos en la presente memoria o, por ejemplo, en Clark et al. (1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) Mol. Ther., 6:272-278.

30 Las expresiones «unidad de infección (ui)», «partícula infecciosa» o «unidad de replicación», como se usan en referencia a un título vírico, hacen referencia a la cantidad de partículas de vector de VAA recombinante infecciosas y competentes para replicación según se mide mediante el ensayo de centro infeccioso, también conocido como ensayo de centro de replicación, según se describe, por ejemplo, en McLaughlin et al. (1988) J. Virol., 62:1963-1973.

35 La expresión «unidad transductora (ut)», como se usa en referencia a un título vírico, hace referencia a la cantidad de partículas de vector de VAA recombinante infecciosas que resultan en la producción de un producto transgénico funcional, según se mide en ensayos funcionales según se describen en los Ejemplos en la presente memoria o, por ejemplo, en Xiao et al. (1997) Exp. Neurobiol., 144:113-124; o en Fisher et al. (1996) J. Virol., 70:520-532 (ensayo LFU).

40 Las expresiones «terapéutico», «cantidad terapéuticamente eficaz» y sus cognados hacen referencia a tal cantidad de un ARN, ADN o producto de expresión de ADN y/o ARN que resulta en la prevención o el retardo de la aparición o mejora de los síntomas en un sujeto o un logro de un resultado biológico deseado, tal como corrección de la patología de almacenamiento, *p. ej.*, patología celular asociada con la acumulación de sustrato en un paciente con una enfermedad de almacenamiento lisosómico. La expresión «corrección terapéutica» hace referencia a tal grado de corrección que resulta en la prevención o retardo de la aparición o mejora de los síntomas en un sujeto. La cantidad eficaz se puede determinar mediante métodos empíricos conocidos.

50 Una «composición» también pretende abarcar una combinación de agente activo y otro vehículo, por ejemplo, compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente detectable o etiqueta) o activo, tal como un adyuvante, diluyente, aglutinante, estabilizador, tampones, sales, disolventes lipófilos, conservante, adyuvante o similares. Los vehículos también incluyen excipientes farmacéuticos y proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos y carbohidratos de adición (*p. ej.*, azúcares, incluidos monosacáridos, di, tri, tetra y oligosacáridos; azúcares derivados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros del azúcar), que pueden estar presentes solos o en combinación y comprender solos o en combinación 1-99,99 % en peso o volumen. Los excipientes proteicos ilustrativos incluyen seroalbúmina tal como seroalbúmina humana (SAH), albúmina humana recombinante (AHR), gelatina, caseína y similares. Los componentes de aminoácidos/anticuerpos representativos, que también pueden funcionar en calidad de tampones, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartato y similares. Los excipientes de carbohidratos también están comprendidos en el alcance de la presente invención, sus ejemplos incluyen, pero no se limitan a, monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y

similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y mioinositol.

5 El término vehículo incluye además un tampón o un agente para ajustar el pH; típicamente, el tampón es una sal elaborada a partir de un ácido o base orgánico. Los tampones representativos incluyen sales de ácido orgánico tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; Tris, clorhidrato de trometamina o tampones de fosfato. Los vehículos adicionales incluyen excipientes/aditivos poliméricos tales como polivinilpirrolidonas, ficoles (un azúcar polimérico), dextratos (p. ej., ciclodextrinas, tales como 2-hidroxiopropil-.cuadratura.-ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes saborizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestático, tensioactivos (p. ej., polisorbatos tales como «TWEEN 20» y «TWEEN 80»), lípidos (p. ej., fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (p. ej., colesterol) y agentes quelantes (p. ej., EDTA).

15 Como se usa en la presente, el término «vehículo farmacéuticamente aceptable» abarca cualquier de los vehículos farmacéuticos estándares, tales como disolución salina tamponada con fosfato, agua y emulsiones, tales como emulsión de aceite/agua o agua/aceite y diversos tipos de agentes humectantes. Las composiciones pueden incluir, además, estabilizadores y conservantes y cualquiera de los vehículos indicados anteriormente con la condición adicional de que sean aceptables para uso in vivo. Para obtener ejemplos de vehículos, estabilizadores y adyuvantes, véase Martin REMINGTON'S PHARM. SCI., 15ª Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) y Williams & Williams, (1995), y en "PHYSICIAN'S DESK REFERENCE", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998). Los vehículos también pueden comprender líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa).

20 «Sujeto», «individuo» o «paciente» se utilizan de manera intercambiable en la presente memoria y hacen referencia a un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, murinos, ratas, simios, humanos, animales de granja, animales para el deporte y mascotas.

25 Un «testigo» es un sujeto o muestra alternativo que se usa en un experimento con fines comparativos. Un testigo puede ser «positivo» o «negativo». Por ejemplo, cuando el objetivo del experimento es determinar una correlación entre un nivel de expresión alterado de un gen y un tipo de patología específico, en general es preferible utilizar un testigo positivo (un sujeto o una muestra de un sujeto, que lleva dicha alteración y exhibe síntomas característicos de dicha enfermedad) y un testigo negativo (un sujeto o una muestra de un sujeto que carece de la expresión alterada y síntomas clínicos de dicha enfermedad).

30 Como se usa en la presente memoria, el término «modular» significa variar la cantidad o intensidad de un efecto o resultado, p. ej., potenciar, aumentar, disminuir o reducir.

Como se usa en la presente memoria, el término «mejorar» es sinónimo de «aliviar» y significa reducir o aligerar. Por ejemplo, se puede mejorar el síntoma de una enfermedad o trastorno al hacerlo más tolerable.

35 Para la identificación de las estructuras del cerebro humano, véase, p. ej., The Human Brain: Surface, Three-Dimensional Sectional Anatomy With MRI, and Blood Supply, 2ª ed., eds. Deuteron et al., Springer Vela, 1999; Atlas of the Human Brain, eds. Mai et al., Academic Press; 1997; y Co-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging, eds. Tamarack et al., Thyme Medical Pub., 1988. Para la identificación de las estructuras del cerebro de ratón, véase, p. ej., The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2ª ed., Academic Press, 2000.

40 En aspectos donde la transferencia génica se media a través de un vector vírico de ADN, tal como un adenovirus (Ad) o virus adeno-asociado (VAA), una construcción de vector hace referencia al polinucleótido que comprende el genoma vírico o parte de este y un transgén. Los adenovirus (Ad) son un grupo homogéneo de virus relativamente bien caracterizado que incluye más de 50 serotipos. Véase, p. ej., la solicitud PCT internacional n.º WO 95/27071. Los Ad se cultivan con facilidad y no requieren integración en el genoma de la célula hospedadora. También se han construido vectores derivados de Ad recombinantes, particularmente aquellos que reducen el potencial de recombinación y generación de virus natural. Véase, las solicitudes internacionales PCT n.ºs WO 95/00655 y WO 95/11984. El VAA natural posee infectividad y especificidad de integración elevada en el genoma de la célula hospedadora. Véase, Hermonat and Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470 y Lebkowski, et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996.

50 En una instancia, la descripción proporciona un método para suministrar un transgén al cerebro de un sujeto mediante administración intraventricular de un vector vírico neurotrófico recombinante que contiene un transgén que codifica para una enzima defectuosa en una EAL. El suministro se hace en condiciones que favorecen la expresión del transgén en ependimocitos.

55 En otra instancia, la descripción proporciona un método para suministrar un producto transgénico terapéutico al SNC de un mamífero que padece una enfermedad de almacenamiento lisosómico, donde el transgén puede codificar para una enzima lisosómica. El transgén se puede administrar a través de un virus neurotrófico. El virus se puede administrar a través de los ventrículos. Los ependimocitos se pueden transducir para expresar el transgén y secretar el producto proteico codificado.

En una instancia alternativa, la descripción es un método para tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico en un sujeto mediante administración intraventricular de un vector vírico neurotrófico recombinante al cerebro del sujeto que contiene un transgén terapéutico, en el que el transgén se expresa en una cantidad terapéuticamente eficaz en el sujeto.

- 5 Esta descripción también se refiere a un método para mejorar los síntomas de una enfermedad de almacenamiento lisosómico en un sujeto mediante administración intraventricular de un vector vírico neurotrófico recombinante al cerebro que contiene un transgén terapéutico, en el que dicho transgén se expresa en una cantidad terapéuticamente eficaz en el sujeto.

10 Los vectores víricos neurotróficos para poner en práctica la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, vectores víricos adeno-asociados (VAA), vectores víricos de herpes simple (patente estadounidense n.º 5.672.344) y vectores lentivíricos. Según la invención, el vector es un vector de VAA recombinante.

15 En los métodos de la descripción, se puede utilizar un VAA de cualquier serotipo. El serotipo del vector vírico utilizado en ciertas instancias de la descripción se selecciona del grupo que consiste en VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7 y VAA8 (véase, p. ej., Gao et al. (2002) PNAS, 99:11854-11859; y Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003). Se pueden utilizar otros serotipos además de los indicados en la presente memoria. Asimismo, también se pueden utilizar vectores de VAA seudotipificados en los métodos descritos en la presente memoria. Los vectores de VAA seudotipificados son aquellos que contienen el genoma de un serotipo de VAA en la cápside de un segundo serotipo de VAA; por ejemplo, un vector de VAA que contiene la cápside de VAA2 y el genoma de VAA1 o un vector de VAA que contiene la cápside de VAA5 y el genoma de VAA2 (Auricchio et al., (2001) Hum. Mol. Genet., 10(26):3075-81). Según la invención, el vector de VAA recombinante es un vector de VAA4 o VAA5.

20 Los vectores de VAA derivan de parvovirus de ADN monocatenario (mc) que no son patógenos para mamíferos (reseñado en Muzyscka (1992) Curr. Top. Microb. Immunol., 158:97-129). De forma resumida, los vectores basados en VAA recombinantes tienen los genes víricos *rep* y *cap* que representan el 96 % del genoma vírico extraído, se dejan las dos repeticiones terminales invertidas (RTI) flanqueadoras de 145 pares de bases (pb), que se utilizan para iniciar la replicación, el empaquetamiento y la integración del ADN vírico. En la ausencia de virus auxiliar, el VAA natural integra el genoma de la célula hospedadora humana con especificidad preferencial para el sitio en el cromosoma 19q 13.3 o se puede mantener episómicamente. Una única partícula de VAA puede alojar hasta 5 kb de ADNmc, por lo tanto, se deja alrededor de 4,5 kb para un transgén y elementos reguladores, que típicamente es suficiente. Sin embargo, los sistemas de transempalme según se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.544.785, puede casi duplicar este límite.

25 En una realización ilustrativa, VAA es VAA4. El virus adeno-asociado de muchos serotipos, especialmente VAA2 se ha estudiado exhaustivamente y caracterizado como vector para terapia génica. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con la preparación de vectores para terapia génica basados en VAA funcionales. Se pueden encontrar numerosas referencias a diversos métodos de producción de VAA, purificación y preparación para administración a sujeto humanos en el amplio conjunto de la literatura publicada (véase, p. ej., Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003). Además, la terapia génica basada en VAA orientada a células del SNC se ha descrito en las patentes estadounidenses n.ºs 6.180.613 y 6.503.888. Los ejemplos adicionales de vectores de VAA son los vectores de serotipo VAA2/1, VAA2/2, VAA2/5, VAA2/7 y VAA2/8 que codifican proteína humana.

30 En determinados métodos de la descripción, el vector comprende un transgén enlazado funcionalmente con un promotor. El transgén codifica para una molécula biológicamente activa, cuya expresión en el SNC resulta en al menos una corrección parcial de la patología de almacenamiento y/o estabilización de la evolución de la enfermedad. El transgén puede codificar para una o más de aspartilglucosaminidasa, alfa.-galactosidasa A, palmitoil proteína tioesterasa, tripeptidil peptidasa, proteína transmembranaria lisosómica, múltiples productos génicos, transportador de cisteína, ceramidasa ácida, .alfa.-L-fucosidasa ácida, proteína protectora/catepsina A, .beta.-glucosidasa ácida, .beta.-galactosidasa ácida, iduronato-2-sulfatasa, alfa.-L-iduronidasa, galactocerebrosidasa, .alfa.-manosidasa ácida, .beta.-manosidasa ácida, arilsulfatasa B, arilsulfatasa A, N-acetilgalactosamina-6-sulfato, .beta.-galactosidasa ácida, N-acetilglucosamina-1-, esfingomielinasa ácida, NPC-1, .alfa.-glucosidasa, .beta.-hexosaminidasa B, heparán N-sulfatasa, .alfa.-N-acetilglucosaminidasa, acetil-CoA: alfa.-glucosaminida, N-acetilglucosamina-6-sulfato, alfa.-N-Acetilgalactosaminidasa, alfa.-N-Acetilgalactosaminidasa, .alfa.-neuramidasa, .beta.-glucuronidasa, .beta.-hexosaminidasa A y lipasa ácida.

35 Una enzima particularmente útil para tratar la enfermedad de Niemann-Pick A o B es esfingomielinasa ácida (EMA), tal como la que se muestra en SEQ ID N.º: 1. (Los residuos 1-46 constituyen la secuencia señal que se escinde tras la secreción). Una enzima particularmente útil para tratar la enfermedad de Gaucher es glucocerebrosidasa. Una enzima particularmente útil para tratar la enfermedad MPS (siglas para «mucopolisacaridosis») I es alfa-L-iduronidasa. Una enzima particularmente útil para tratar la enfermedad MPS II es iduronato-2-sulfatasa. Una enzima particularmente útil para tratar la enfermedad de Pompe o enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (EAGII), también denominada deficiencia de maltasa ácida (DMA) es alfa-glucosidasa ácida. Una enzima particularmente útil para tratar la enfermedad de Batten infantil tardía clásica (CLN2) es tripeptidil peptidasa. Estas

enzimas con frecuencia son formas recombinantes de las enzimas producidas utilizando métodos conocidos en la técnica. En una instancia, la enzima es una enzima humana recombinante.

Aunque se muestra una secuencia de aminoácidos específica en SEQ ID N.º: 1, también se pueden utilizar variantes normales en la población humana que conservan la actividad. Típicamente, estas variantes normales difieren en solo uno o dos residuos con respecto a la secuencia que se muestra en SEQ ID N.º: 1. Las variantes a utilizar deberían ser al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la SEQ ID N.º: 1. Las variantes que se asocian con enfermedad o actividad reducida no se deberían utilizar. Típicamente, se suministrará la forma madura de la enzima. Esta comienza con el residuo 47 como se muestra en SEQ ID N.º: 1. De forma similar, las variantes normales en la población humana de dichas enzimas de EAL como glucocerebrosidasa, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, alfa- glucosidasa ácida y tripeptidil peptidasa que conservan la actividad enzimática se pueden utilizar también.

Las poblaciones tratadas mediante los métodos de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, pacientes que padecen o están en riesgo de desarrollar un trastorno neurometabólico, p. ej., una EAL, tal como las enfermedades indicadas en la Tabla 1, particularmente, si dicha enfermedad afecta al SNC y órganos viscerales. En una instancia ilustrativa, la enfermedad es enfermedad de Niemann-Pick, tipo A, B o C, enfermedad de Gaucher, Mucopolisacaridosis (MPS), enfermedad de Pompe o enfermedad de Batten. Según la invención, la enfermedad es la enfermedad de Gaucher.

Un transgén que codifica para EMA u otra enzima hidrolasa lisosómica se puede incorporar en una composición farmacéutica útil para tratar, p. ej., inhibir, atenuar, prevenir o mejorar, una afección caracterizada por un nivel insuficiente de una actividad de hidrolasa lisosómica. La composición farmacéutica se administrará a un sujeto que padece una deficiencia de hidrolasa lisosómica o a alguien que está en riesgo de desarrollar dicha deficiencia. Las composiciones deberían contener una cantidad terapéutica o profiláctica del transgén que codifica para una EMA u otra enzima hidrolasa lisosómica en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéutico puede ser cualquier sustancia no tóxica compatible adecuada para suministrar los polipéptidos al paciente. Se puede utilizar agua esterilizada, alcohol, grasas y ceras como el vehículo. También se pueden incorporar adyuvantes farmacéuticamente aceptables, agentes tampón, agentes dispersantes y similares en las composiciones farmacéuticas. El vehículo se puede combinar con la EMA u otra enzima hidrolasa lisosómica en cualquier forma adecuada para administración mediante inyección o infusión intraventricular (también posiblemente intravenosa o intratecal) o de otra forma. Los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, disolución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL.TM. (BASF, Parsippany, N.J.) o disolución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés), otras disoluciones salinas, disoluciones de dextrosa, disoluciones de glicerol, emulsiones de agua y aceites tales como las preparadas con aceites de petrolíferos, animales, vegetales o de origen sintético (aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral o aceite de sésamo). Se puede utilizar LCR artificial como vehículo. El vehículo preferiblemente será estéril y libre de pirógenos. La concentración del transgén que codifica para EMA u otra enzima hidrolasa lisosómica en la composición farmacéutica puede variar ampliamente.

El suministro intracerebroventricular o intraventricular de un vector vírico recombinante se puede llevar a cabo en uno cualquier o más de los ventrículos cerebrales que están llenos de líquido cefalorraquídeo (LCR). El LCR es un fluido transparente que llena los ventrículos, está presente en el espacio subaracnoideo y rodea al cerebro y a la médula espinal. El LCR se produce mediante los plexos coroides y a través de la excreción o transmisión de fluido tisular por parte del cerebro hacia los ventrículos. El plexo coroide es una estructura que recubre la parte inferior del ventrículo lateral y la parte superior del tercer y cuarto ventrículo. Ciertos estudios han indicado que estas estructuras son capaces de producir 400-600 cm³ de fluido por día que corresponden a la cantidad para llenar los espacios del sistema nervioso central cuatro veces en un día. En adultos, se ha calculado que el volumen de este fluido es de 125 a 150 ml (4-5 oz). El LCF está en formación, circulación y absorción continuas. Ciertos estudios han indicado que se pueden producir aproximadamente 430 a 450 ml (casi 2 tazas) de LCR por día. Ciertos cálculos estiman que la producción es igual a aproximadamente 0,35 ml por minuto en adultos y 0,15 por minuto en lactantes. Los plexos coroides de los ventrículos laterales producen la mayor parte del LCR. Fluye a través de los forámenes de Monro hacia el tercer ventrículo donde se suma a lo producido por el tercer ventrículo y continúa a través del acueducto de Sylvius hacia el cuarto ventrículo. El cuarto ventrículo suma más LCR; a continuación, el fluido se desplaza por el espacio subaracnoideo a través de los forámenes de Magendie y Luschka. Después circula a través de la base del cerebro, por abajo alrededor de la médula espinal y hacia arriba sobre los hemisferios cerebrales.

Sin ánimo de limitarnos a ninguna teoría ni mecanismo de funcionamiento, la administración al SNC de un sujeto afectado de un vector vírico neurotrófico que lleva un transgén que codifica para un producto terapéutico permite transportar el vector vírico y/o producto expresado a través del LCR a lo largo del SNC y/o hacia los órganos viscerales. El LCR se vacía en la sangre a través de las vellosidades aracnoideas y los senos vasculares intracraneanos, de esta forma se suministran las enzimas y/o los transgenes a los órganos viscerales que se sabe que se ven afectados en EAL. Los órganos viscerales que con frecuencia se ven afectados en la enfermedad de Niemann-Pick enfermedad son, por ejemplo, los pulmones, bazo, riñón e hígado. La terapia génica proporciona cantidades reducidas de sustrato en al menos el cerebro y potencialmente en órganos viscerales. La reducción en el sustrato acumulado en el cerebro, pulmones, bazo, riñón e/o hígado puede ser drástica. Se pueden lograr reducciones superiores al 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %. La reducción lograda no es necesariamente uniforme de paciente a paciente ni incluso de órgano a órgano dentro de un único paciente.

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico (EAL) incluye más de cuarenta trastornos genéricos, muchos de estos se relacionan con defectos genéticos en diversas hidrolasas lisosómicas. Las enfermedades de almacenamiento lisosómico representativas y las enzimas defectuosas asociadas se indican en la Tabla 1.

5 La enfermedad de Gaucher resulta como consecuencia de una deficiencia hereditaria de la hidrolasa lisosómica glucocerebrosidasa (GC) y conduce a la acumulación de su sustrato, glucosilceramida (GL-1), en los lisosomas de histiocitos. La acumulación progresiva de GL-1 en macrófagos tisulares (células de Gaucher) se produce en varios tejidos. La extensión de la acumulación depende en parte del genotipo. Clínicamente, se reconocen tres fenotipos de Gaucher diferentes, el tipo 1 no neuropático, que es el más común y se puede presentar desde la primera infancia hasta la adultez, y los tipos 2 y 3 neuropáticos, que se presentan en la lactancia y primera infancia, respectivamente.

10 Las principales manifestaciones clínicas comunes a todas las formas de la enfermedad de Gaucher son hepatoesplenomegalia, citopenia, fracturas óseas patológicas y, ocasionalmente, insuficiencia pulmonar. Se puede encontrar una descripción detallada de la enfermedad de Gaucher en *Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, Parte 16, Capítulo 146 y 146.1 (2007). En pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 2 y tipo 3 que presentan una afectación del sistema nervioso central significativa, el suministro intraventricular de la enzima de EAL defectuosa conduce a un estado metabólico mejorado del cerebro y posiblemente los órganos viscerales (fuera del SNC) afectados. El suministro intraventricular de la enzima de EAL defectuosa en sujeto con enfermedad de Gaucher tipo 1 conduce a un estado metabólico mejorado de los órganos viscerales (fuera del SNC) afectados. Existen modelos animales de la enfermedad de Gaucher que se derivaron de modelos de ratón creados mediante la alteración orientada del gen de ratón correspondiente. Por ejemplo, existe el modelo de ratón de Gaucher que aloja la mutación D409V en el locus de GC de ratón (Xu, Y-H et al. (2003). *Am. J. Pathol.* 163:2093-2101). El ratón heterocigótico, gbaD409V/completa, exhibe \approx 5 % de la actividad de GC normal en tejidos viscerales y desarrolla macrófagos (células de Gaucher) llenos de lípidos en el hígado, bazo, pulmón y médula ósea a los 4 meses de edad. Otros ejemplos de modelos de ratón de la Enfermedad de Gaucher son los modelos de enfermedad de Gaucher neuronopática aguda desarrollados por Enquist et al. 2007 *PNAS* 104(44): 17483-17488. Estos ratones exhiben una gran similitud, tanto en signos anatomopatológicos como en manifestaciones clínicas, con pacientes humanos con enfermedad de Gaucher neuronopática grave. Por consiguiente, todos los modelos descritos anteriormente son sistemas adecuados para evaluar los beneficios del suministro intraventricular de un vector neurotrófico vírico que codifica para la enzima de EAL defectuosa en sujetos con enfermedad de Gaucher.

30 La enfermedad de Niemann-Pick (ENP) es una enfermedad de almacenamiento lisosómico y es un trastorno neurometabólico hereditario que se caracteriza por una deficiencia genética de esfingomielinasa ácida (EMA; esfingomielina colinafosfohidrolasa, EC 3.1.3.12). La falta de proteína EMA funcional resulta en la acumulación de sustrato esfingomielina dentro de los lisosomas de neuronas y glía en todo el cerebro. Esto conduce a la formación de grandes cantidades de lisosomas distendidos en el pericarión, que son un rasgo característico y el principal fenotipo celular de la ENP tipo A. La presencia de lisosomas distendidos se correlaciona con la pérdida de la función celular normal y una evolución neurodegenerativa progresiva que conduce a la muerte del individuo afectado en la primera infancia (*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, eds. Scriver et al., McGraw-Hill, Nueva York, 2001, págs. 3589-3610). Los fenotipos celulares secundarios (p. ej., alteraciones metabólicas secundarias) también se asocia con esta enfermedad, en especial el nivel elevado de acumulación de colesterol en el compartimento lisosómico. La esfingomielina tiene una gran afinidad por el colesterol, que resulta en el secuestro de grandes cantidades de colesterol en los lisosomas de ratones aSMKO y pacientes humanos (Leventhal et al. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276:44976-44983; Slotte (1997) *Subcell. Biochem.*, 28:277-293; y Viana et al. (1990) *J. Med. Genet.*, 27:499-504.) Se puede encontrar una descripción detallada de la enfermedad ENP en *Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, Parte 16, Capítulo 144 (2007). Existen modelos animales de ENP. Por ejemplo, los ratones aSMKO son un modelo aceptado de los tipos A y B de la enfermedad de Niemann-Pick (Horinouchi et al. (1995) *Nat. Genetics*, 10:288-293; Jin et al. (2002) *J. Clin. Invest.*, 109:1183-1191; y Otterbach (1995) *Cell*, 81:1053-1061). El suministro intraventricular de un transgén que codifica para la enzima de EAL defectuosa conduce a un estado metabólico mejorado del cerebro y de los órganos viscerales (fuera del SNC) afectados.

50 Las mucopolisacaridosis (MPS) son un grupo de trastornos de almacenamiento lisosómico provocados por la deficiencia de enzimas que catalizan la degradación de glucosaminoglucanos (mucopolisacáridos). Existen 11 deficiencias enzimáticas conocidas que provocan 7 MPS distintas, incluidas MPS I (Síndromes de Hurler, Scheie y Hurler-Scheie) y MPS II (Síndrome de Hunter). Se puede encontrar una descripción detallada de MPS en *Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, Parte 16, Capítulo 136 (2007). Existen varios modelos animales de MPS que se derivaron de modelos de mutaciones de origen natural en perros, gatos, ratas, ratones y cabras, así como también modelos de ratón creados mediante la alteración orientada del gen de ratón correspondiente. Los rasgos bioquímicos y metabólicos de estos modelos animales en general son bastante similares a los que se encuentran en humanos; sin embargo, las presentaciones clínicas pueden ser más leves. Por ejemplo, los modelos aceptados para MPS I incluye un modelo murino [Clark, LA et al., *Hum. Mol. Genet.* (1997), 6:503] y un modelo canino [Menon, KP et al., *Genomics* (1992), 14:763. Por ejemplo, los modelos aceptados para MPS II incluye un modelo de ratón [Muenzer, J. et al., (2002), *Acta Paediatr. Suppl.*;91(439):98-9]. En la MPS que tiene afectación del sistema nervioso central, tal como la que se encuentra en pacientes con MPS I y MPS II, el suministro intraventricular de un transgén que codifica para la enzima de EAL defectuosa conduce a un estado metabólico mejorado del cerebro y posiblemente de los órganos viscerales (fuera del SNC) afectados.

La enfermedad de Pompe o enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (EAGII), también denominada deficiencia de maltasa ácida (DMA), es un trastorno hereditario del metabolismo del glucógeno que resulta de defectos en la actividad de la hidrolasa lisosómica alfa-glucosidasa ácida en todos los tejidos de los individuos afectados. La deficiencia enzimática resulta en acumulación intralisosómica de glucógeno de estructura normal en numerosos tejidos. La acumulación se produce con mayor intensidad en el músculo cardíaco y esquelético y en tejidos hepáticos de lactantes con el trastorno generalizado. En EAGII de inicio tardío, la acumulación intralisosómica de glucógeno prácticamente se limita al músculo esquelético y es de menor magnitud. Las alteraciones electromiográficas que sugieren el diagnóstico incluyen descargas pseudomiótónicas e irritabilidad, pero en pacientes con inicio juvenil y adulto las alteraciones pueden variar en diferentes músculos. Las tomografías axiales computarizadas pueden revelar el o los sitios de músculos afectados. La mayoría de los pacientes presenta niveles elevados de creatina cinasa (CK) en el plasma sanguíneo y se pueden encontrar elevaciones en las enzimas hepáticas, particularmente en paciente con inicio en la edad adulta. Existen varios modelos animales de origen natural de la enfermedad con inicio en la lactancia y tardío. Existe un modelo de ratón con genes inactivados [Bijvoet AG et al., *Hum. Mol. Genet.* (1998); 7:53-62.]. Los efectos de mejora de la terapia enzimática se han descrito en ratones con genes inactivados [Raben, N et al., *Mol. Genet. Metab.* (2003); 80:159-69] y en un modelo de codorniz. El suministro intraventricular de un transgén que codifica para la enzima de EAL defectuosa conduce a un estado metabólico mejorado del cerebro y posiblemente de los órganos viscerales (fuera del SNC) afectados.

Las lipofuscinosis ceroides neuronales (LCN) son un grupo de trastornos neurodegenerativos que se diferencian de otros trastornos neurodegenerativos por la acumulación de material autofluorescente («pigmento de la edad avanzada») en el cerebro y otros tejidos. Los principales rasgos clínicos incluyen convulsiones, deterioro psicomotor, ceguera y muerte prematura. Se han reconocido distintos subgrupos de LCN que difieren en la edad de inicio de los síntomas y la aparición del material de almacenamiento mediante microscopía de electrones. Tres grupos principales -infantil (LCNI), infantil tardío clásico (LCNIT) y juvenil (LCNJ, también denominado enfermedad de Batten) son causados por mutaciones autosómicas recesivas en los genes CLN1, CLN2 y CLN3, respectivamente. Los productos proteicos de los genes CLN1 (palmitoil-proteína tioesterasa) y CLN2 (tripeptidil peptidasa o pepinasa) son enzimas lisosómicas solubles, mientras que la proteína de CLN3 (battenina) es una proteína membranaria lisosómica, como lo es (provisoriamente) la proteína de CLN5. La identificación de mutaciones en genes que codifican para proteínas lisosómicas en varias formas de LCN condujo al reconocimiento de las lipofuscinosis como verdaderos trastornos de almacenamiento lisosómico. Se puede encontrar una descripción detallada de la enfermedad LCN en *Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, Parte 16, Capítulo 154 (2007). Se han descritos trastornos LCN de origen natural en ovejas, perros y se han derivado modelos de ratón mediante alteración orientada de un gen de ratón correspondiente [véase, p. ej., Katz, ML et al., *J. Neurosci. Res.* (1999); 57:551-6; Cho, SK et al., *Glycobiology* (2005); 15:637-48.] El suministro intraventricular de un transgén que codifica para la enzima de EAL defectuosa conduce a un estado metabólico mejorado del cerebro y posiblemente de los órganos viscerales (fuera del SNC) afectados.

Una descripción detallada de trastornos de almacenamiento lisosómico adicionales descritos en la Tabla 1, en los que el suministro intraventricular de la enzima EAL defectuosa en la enfermedad, se puede encontrar en *Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*, Parte 16 (2007).

El nivel de expresión transgénica en células eucariontes se determina en gran medida mediante el promotor transcripcional dentro del casete de expresión transgénica. Los promotores que exhiben actividad a largo plazo y que son específicos para el tejido e incluso específicos para la célula se usan en algunas realizaciones. Los ejemplos no limitantes de promotores incluyen, pero no se limitan a, el promotor del citomegalovirus (CMV) (Kaplitt et al. (1994) *Nat. Genet.* 8:148-154), el promotor de CMV/ β 3-globina humana (Mandel et al. (1998) *J. Neurosci.* 18:4271-4284), el promotor GFAP (Xu et al. (2001) *Gene Ther.* 8:1323-1332), el promotor de enolasa específico para neuronas (NSE) de 1,8 kb (Klein et al. (1998) *Exp. Neurol.* 150:183-194), el promotor de beta actina de pollo (CBA) (Miyazaki (1989) *Gene* 79:269-277), el promotor de β -glucuronidasa (GUSB) (Shiple et al. (1991) *Genetics* 10:1009-1018), y promotores de ubiquitina tales como los aislados a partir de ubiquitina A humana, ubiquitina B humana y ubiquitina C humana según se describen en la patente estadounidense n.º 6.667.174. Para prolongar la expresión, además se pueden enlazar funcionalmente otros elementos reguladores con el transgén, tales como, p. ej., el elemento posregulador del virus de la hepatitis de Woodchuck (WPRE, por sus siglas en inglés) (Donello et al. (1998) *J. Virol.* 72:5085-5092) o el sitio de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (HCB).

Para algunas aplicaciones de terapia génica en el SNC, puede ser necesario controlar la actividad transcripcional. Con este fin, se pueden obtener la regulación farmacológica de la expresión génica con vectores víricos mediante la inclusión de diversos elementos reguladores y promotores sensibles a fármaco como se describen, por ejemplo, en Haberman et al. (1998) *Gene Ther.* 5:1604-16011; y Ye et al. (1995) *Science* 283:88-91.

En determinadas instancias, la concentración o título del vector en la composición es de al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 50 ($\times 10^{12}$ pg/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 50 ($\times 10^9$ ut/ml); o (c) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 50 ($\times 10^{10}$ ui/ml).

En una instancia, el transgén codifica para una molécula biológicamente activa, cuya expresión en el SNC resulta en al menos una corrección parcial de la patología de almacenamiento y/o estabilización de la evolución de la enfermedad.

En algunas instancias, el producto transgénico terapéutico es una proteína EMa que alivia y/o previene los síntomas de Niemann-Pick A y B. Véanse Roaul et al. (2005) *Nat. Med.* 11(4):423-428 y Ralph et al. (2005) *Nat. Med.* 11(4):429-

433. En otras instancias, los transgenes que codifican las enzimas defectuosas en otras EAL se suministran, según sea apropiado para el paciente específico. Según la invención, el transgén codifica la beta glucosidasa ácida.

En una instancia, cuando se llevan a cabo estos métodos, el transgén expresa una cantidad terapéutica de una enzima seleccionada del grupo que consiste en aspartilglucosaminidasa, alfa.-galactosidasa A, palmitoil proteína tioesterasa, tripeptidil peptidasa, proteína transmembranaria lisosómica, múltiples productos génicos, transportador de cisteína, ceramidasa ácida, .alfa.-L-fucosidasa ácida, proteína protectora/catepsina A, .beta.-glucosidasa ácida o .beta.-galactosidasa ácida, iduronato-2-sulfatasa, alfa.-L-iduronidasa, galactocerebrosidasa, .alfa.-manosidasa ácida, .beta.-manosidasa ácida, arilsulfatasa B, arilsulfatasa A, N-acetilgalactosamina-6-sulfato, .beta.-galactosidasa ácida, N-acetilglucosamina-1-, esfingomielinasa ácida, NPC-1, .alfa.-glucosidasa, .beta.-hexosaminidasa B, heparán N-sulfatasa, .alfa.-N-acetilglucosaminidasa, acetil-CoA: alfa.-glucosaminida, N-acetilglucosamina-6-sulfato, alfa.-N-Acetilgalactosaminidasa, alfa.-N-Acetilgalactosaminidasa, .alfa.-neuramidasa, .beta.-glucuronidasa, .beta.-hexosaminidasa A y lipasa ácida. Según la invención, el transgén expresa una cantidad terapéutica de beta glucosidasa.

Para la identificación de las estructuras del cerebro humano, véase, p. ej., *The Human Brain: Surface, Three-Dimensional Sectional Anatomy With MRI, and Blood Supply*, 2ª ed., eds. Deuteron et al., Springer Vela, 1999; *Atlas of the Human Brain*, eds. Mai et al., Academic Press; 1997; y *Co-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging*, eds. Tamarack et al., Thyme Medical Pub., 1988. Para la identificación de las estructuras del cerebro de ratón, véase, p. ej., *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2ª ed., Academic Press, 2000.

Para suministrar la disolución u otra composición que contiene el vector vírico específicamente a una región específica del sistema nervioso central, tal como un ventrículo específico, p. ej., a los ventrículos laterales o al cuarto ventrículo del cerebro, se puede administrar mediante microinyección estereotáxica. Por ejemplo, el día de la cirugía, se colocará la base del marco estereotáxico a los pacientes (atornillada al cráneo). Se obtendrán imágenes del cerebro con la base del marco estereotáxico (compatible con MRI con marcas fiduciarias) utilizando resonancia magnética nuclear de alta resolución MRI. Las imágenes de MRI después se transferirán a una computadora que ejecuta el programa informático estereotáxico. Se utilizará una serie de imágenes coronales, sagitales y axiales para determinar el sitio diana de la inyección del vector y la trayectoria. El programa informático traduce directamente la trayectoria a coordenadas tridimensionales adecuadas para el marco estereotáxico. Se perforarán agujeros de trepanación por encima del sitio de entrada y se localizará el aparato estereotáxico con la aguja implantada en la profundidad dada. A continuación, se inyectará la disolución de vector en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se pueden utilizar vías de administración adicionales, por ejemplo, aplicación cortical superficial con visualización directa u otra aplicación no estereotáxica.

Un modo para suministrar el vector vírico es utilizar una bomba. Dichas bombas se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo, de Alzet (Cupertino, CA) o Medtronic (Minneapolis, MN). La bomba puede ser implantable. Otro modo conveniente para administrar el vector es utilizar una cánula o un catéter.

La descripción objeto proporciona métodos para modular, corregir o reducir los síntomas en un sujeto que padece una enfermedad de almacenamiento lisosómico, mediante la reducción de la acumulación de sustrato en el SNC o los órganos viscerales afectados. Con fines ilustrativos solamente, el sujeto puede padecer uno o más aspartilglucosaminuria, Fabry, enfermedad de Batten infantil (CNL1), enfermedad de Batten infantil tardía clásica (CNL2), enfermedad de Batten juvenil (CNL3), Batten, otras formas (CNL4-CN18), cistinosis, Farber, fucosidosis, galactosidosis, Gaucher tipos 1, 2 y 3, gangliosidosis G.sub.M1, Hunter, Hurler-Scheie, Krabbe, alfa.-manosidosis, beta.-manosidosis, Maroteaux-Lamy, leucodistrofia metacromática, Morquio A, Morquio B, mucopolisidosis II/III, Niemann-Pick A, B, Niemann-Pick C, Pompe ácido, Sandhoff, Sanfilippo A, Sanfilippo B, Sanfilippo C, Sanfilippo D, Schindler Disease, Schindler-Kanzaki, Sialidosis, Sly, Tay-Sachs y enfermedad de Wolman.

Si se desea, la estructura cerebral humana se puede correlacionar con estructuras similares en el cerebro de otro mamífero. Por ejemplo, la mayoría de los mamíferos, incluidos humanos y roedores, exhiben una organización topográfica similar de las proyecciones entorrinales y del hipocampo, con neuronas en la parte lateral de la corteza entorrinal lateral y medial que se proyectan hacia la parte dorsal o polo septal del hipocampo, mientras que la proyección hacia el hipocampo ventral se origina principalmente a partir de neuronas en las partes medias de la corteza entorrinal (*Principles of Neural Science*, 4ª ed., eds. Kandel et al., McGraw-Hill, 1991; *The Rat Nervous System*, 2ª ed., ed. Paxinos, Academic Press, 1995). Además, las células de la capa II de la corteza entorrinal se proyectan hacia el giro dentado y terminan en los dos tercios externos de la capa molecular del giro dentado. Los axones de las células de la capa III se proyectan de forma bilateral hacia las áreas del cornu ammonis CA1 y CA3 del hipocampo y terminan en la capa molecular estrato lacunoso.

En una instancia, los métodos descritos incluyen administrar al SNC de un sujeto afectado un vector vírico neurotrófico que lleva un transgén que codifica para un producto terapéutico y permitir que el transgén se exprese dentro del SNC y/u órganos viscerales a un nivel suficiente para ejercer un efecto terapéutico a medida que la proteína expresada se transporta por medio del LCR a lo largo del SNC y/u órganos viscerales. Además, el vector puede comprender un polinucleótido que codifica para una molécula biológicamente activa eficaz para tratar el trastorno del SNC. Dichas moléculas biológicamente activas pueden comprender péptidos que incluyen, pero no se limitan a, versiones naturales

o mutadas de proteínas de longitud completa, versiones naturales o mutadas de fragmentos de proteína, polipéptidos sintéticos.

5 En una realización ilustrativa, la administración se logra mediante inyección directa de una disolución de vector en título elevado en uno o más de los espacios ventriculares del cerebro, tal como el ventrículo lateral de un sujeto o paciente. Por ejemplo, la administración se hace mediante inyección de bolo directa en uno o más de los espacios ventriculares del cerebro, tales como el ventrículo lateral y el cuarto.

10 En algunas instancias, los métodos comprenden la administración de un vector neurotrófico en título elevado que lleva un transgén terapéutico, de manera que el producto transgénico se exprese a un nivel terapéutico en un primer sitio dentro del SNC distal hasta el sitio de acción definitivo del producto expresado. En algunas instancias, el título vírico de la composición es de al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 50 ($\times 10^{12}$ pg/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 50 ($\times 10^9$ ut/ml); o (c) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 50 ($\times 10^{10}$ ui/ml).

15 En ratones experimentales, el volumen total de disolución de VAA inyectado es, por ejemplo, entre 1 y 20 μ l. Para otros mamíferos, incluido el cerebro humano, se aumentan los volúmenes y tasas de suministro según sea adecuado. Por ejemplo, se ha demostrado que se pueden inyectar volúmenes de 150 μ l de forma segura en el cerebro primate (Janson et al. (2002) Hum. Gene Ther. 13:1391-1412). El tratamiento puede consistir en una única inyección por sitio diana o puede repetirse en uno o más ventrículos. Los ventrículos adecuados incluyen los ventrículos laterales, el tercer ventrículo y el cuarto ventrículo. Se pueden utilizar múltiples sitios de inyección. Por ejemplo, en algunas instancias, además del primer sitio de administración, una composición que contiene un vector vírico que lleva un transgén se administra a otro sitio que puede ser contralateral o ipsilateral con respecto al primer sitio de administración. Las inyecciones pueden ser simples o múltiples, unilaterales o bilaterales.

20 Se pueden producir preparaciones de VAA con título elevado utilizando técnicas conocidas en la técnica, p. ej., según se describen en la patente estadounidense n.º 5.658.776 y en *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Humana Press, 2003.

Ejemplos

25 Titulación de vectores recombinantes

Se miden los títulos de vector de VAA según la cantidad de copias de genoma (partículas de genoma por mililitro). Las concentraciones de partículas de genoma se basan en la PCR Taqman® del ADN del vector informada con anterioridad (Clark et al. (1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) Mol. Ther., 6:272-278).

30 Los vectores que llevan un gen marcador que se puede someter a ensayo tal como β -galactosidasa (Lac Z) o gen de proteína verde fluorescente (PVF) se pueden someter a titulación utilizando un ensayo de infectividad. Se transducen células susceptibles (p. ej., células HeLa o COS) con el VAA y se lleva a cabo un ensayo para determinar la expresión génica tal como la tinción de células transducidas con vector β -galactosidasa con X-gal (5-bromo-4cloro- 3-indolil- β -D-galactopiranosido) o microscopía fluorescente para las células transducidas con PVF. Por ejemplo, el ensayo se lleva a cabo de la siguiente forma: se colocan 4 $\times 10^4$ de células HeLa en pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos utilizando medios de cultivo normales. Después del acoplamiento, es decir, alrededor de 24 horas después, las células se infectan con Ad tipo 5 a una multiplicidad de infección (MDI) de 10 y se transducen con diluciones en serie del vector empaquetado e incubado a 37 °C. De uno a tres días después, antes de que se observen efectos citopáticos extensos, se lleva a cabo un ensayo adecuado con las células (p. ej., tinción con X-gal o microscopía fluorescente). Si se utiliza un gen reportero tal como β -galactosidasa, las células se fijan en paraformaldehído al 2 %, glutaraldehído al 0,5 % y se tiñen para determinar la actividad de β -galactosidasa utilizando X-gal. Se cuentan las diluciones de vector que proporcionan células bien separadas. Cada célula positiva representa 1 unidad de transducción (ut) de vector.

Modelo animal

45 Los ratones ASMKO son un modelo aceptado de los tipos A y B de la enfermedad de Niemann-Pick (Horinouchi et al. (1995) Nat. Genetics, 10:288-293; Jin et al. (2002) J. Clin. Invest., 109:1183-1191; y Otterbach (1995) Cell, 81:1053-1061). La enfermedad de Niemann-Pick (ENP) se clasifica como una enfermedad de almacenamiento lisosómico y es un trastorno neurometabólico hereditario que se caracteriza por una deficiencia genética de esfingomielinasa ácida (EMA; esfingomielina colinafosfohidrolasa, EC 3.1.3.12). La falta de proteína EMA funcional resulta en la acumulación de sustrato esfingomielina dentro de los lisosomas de neuronas y glía en todo el cerebro. Esto conduce a la formación de grandes cantidades de lisosomas distendidos en el pericarión, que son un rasgo característico y el principal fenotipo celular de la ENP tipo A. La presencia de lisosomas distendidos se correlaciona con la pérdida de la función celular normal y una evolución neurodegenerativa progresiva que conduce a la muerte del individuo afectado en la primera infancia (*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, eds. Scriver et al., McGraw-Hill, Nueva York, 2001, págs. 3589-3610). Los fenotipos celulares secundarios (p. ej., alteraciones metabólicas secundarias) también se asocian con esta enfermedad, en especial el nivel elevado de acumulación de colesterol en el compartimento lisosómico. La esfingomielina tiene una gran afinidad por el colesterol, que resulta en el secuestro de grandes cantidades de colesterol en los lisosomas de ratones ASMKO y pacientes humanos (Leventhal et al. (2001) J. Biol. Chem., 276:44976-44983; Slotte (1997) Subcell. Biochem., 28:277-293; y Viana et al. (1990) J. Med. Genet., 27:499-504.) Otros modelos para otras EAL se describieron anteriormente y se pueden utilizar según sea adecuado.

La visualización de la expresión de la proteína verde fluorescente (PVF) en ratones que se trataron con VAA4-PVF indicó que la PVF se distribuyó por toda la capa de endotelios del sistema ventricular. Por ejemplo, se visualizó la PVF en los ventrículos laterales anteriores, los ventrículos laterales, el tercer ventrículo y el cuarto ventrículo (figura 1). También se visualizó la PVF en el plexo coroide del sistema ventricular y la capa de endotelios del canal central de la médula espinal (incluidas las regiones cervicales, torácicas y lumbares) (figura 2).

Inyección intracerebroventricular de VAA recombinante que codifica para glucocerebrosidasa en un modelo de ratón neuronopático de enfermedad de Gaucher

Existen modelos animales de la enfermedad de Gaucher que se derivan mediante la alteración orientada del gen de ratón correspondiente. Por ejemplo, hay modelos de enfermedad de Gaucher neuronopática aguda desarrollados por Enquist et al. 2007 PNAS 104(44): 17483-17488. Estos ratones exhiben una gran similitud, tanto en signos anatomopatológicos como en manifestaciones clínicas, con pacientes humanos con enfermedad de Gaucher neuronopática grave. Se llevó a cabo un experimento en uno de los dos modelos, el K14-Inl/Inl (también denominado en la presente ratón «K2»). El modelo K2 es la forma más grave de los modelos descritos por Enquist et al. ya que el ratón manifiesta una evolución clínica y patológica de los síntomas más rápida.

En el primer día tras el nacimiento, se inyectó de forma bilateral al ratón K2 neonato utilizando inyección intracerebroventricular en los ventrículos laterales un virus adeno-asociado recombinante que codificaba para glucocerebrosidasa humana (GC) a una dosis de $1,2 \times 10^6$ copias de genoma total por cerebro suministrada en un volumen de 2 microlitros por ventrículo lateral. El virus VAA comprendía una cápside de VAA5, RT1 de VAA2 y codificaba para GC humana (VAA-GC). Los ratones K2 presentaban alteraciones en ambas copias del gen GC y no deberían tener expresión endógena de GC en sus tejidos. En el primer día tras el nacimiento, también recibieron inyecciones con el virus dos grupos testigo de ratones K2 de la camada. El primer grupo testigo contenía el grupo de ratones «naturales de referencia», que no poseían alteraciones en el gen GC y, por lo tanto, presentaban expresión de GC endógena normal. El segundo grupo testigo contenía el grupo de ratones «heterocigóticos» que poseen una copia alterada del gen GC y una copia no alterada del gen GC y, por lo tanto, expresan cierto nivel endógeno de GC.

Los grupos de ratones se evaluaron para determinar la actividad enzimática de GC total en el cerebro e hígado como órgano periférico representativo; retroceso de la patología; peso como medición indirecta de la salud general; extensión del tiempo de vida a través de la curva de supervivencia de Kaplan-Meier; y expansión de la enzima dentro del sistema nervioso central. Para determinar la mortalidad de forma confiable y compasiva, se utilizó un criterio de valoración artificial según se define por el momento cuando se observa parálisis de etapa terminal en los ratones.

La figura 3 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier que demuestra los datos de supervivencia de ratones K2 tratados con VAA-GC (VAA2/5GC; representados por triángulos) y el grupo testigo de la camada natural de referencia tratados con VAA-GC (NR; representados por triángulos invertidos). Los datos de supervivencia históricos de los ratones K2 en la colonia de ratones se agregaron a la curva de supervivencia de Kaplan-Meier (No tratados; representados por cuadrados). Como indicaron los datos de supervivencia, los ratones K2 tratados con VAA-GC exhibieron tiempos de supervivencia media significativamente más prolongados (supervivencia media = 21 días) en comparación con el tiempo de supervivencia media histórico para los ratones K2 no tratados (supervivencia media = 13,5 días). La diferencia entre el tiempo de supervivencia media histórico y el tiempo de supervivencia media de los ratones K2 tratados con VAA-GC es estadísticamente significativa ($p < 0,0001$). El grupo testigo de ratones de la camada naturales de referencia VAA-GC sobrevivió hasta el final del estudio. El grupo testigo de ratones de la camada heterocigóticos tratados con VAA-GC también sobrevivió hasta el final del estudio (no se muestran los datos en la figura).

La figura 4 presenta la actividad de GC en el cerebro e hígado de ratones K2 tratados con VAA-GC (inyectados según se describió anteriormente) en comparación con diversos grupos testigo. El primer grupo testigo contenía el grupo de ratones «naturales de referencia», que no poseían alteraciones en el gen GC y, por lo tanto, presentaban niveles expresión de GC endógenos normales. Este grupo se trató con VAA-GC de la misma manera que los ratones K2 tratados (etiquetados como VAA5 NR en la figura 4). El segundo grupo testigo contenía el grupo de ratones «heterocigóticos» que poseen una copia alterada del gen GC y una copia no alterada del gen GC y, por lo tanto, expresan cierto nivel de GC endógena. Estos ratones también se trataron con VAA-GC (etiquetados como VAA5 Het en la figura 4). El grupo testigo final también contenía el grupo de ratones «naturales de referencia», pero estos ratones no se trataron con VAA-GC (etiquetados como NR en la figura 4). Como se demuestra en la Figura 4, la inyección intracerebroventricular de VAA que codifica para GC resultó en actividad enzimática de GC en el cerebro de los ratones K2. En estos ratones K2 tratados, la actividad de GC en el hígado no estuvo significativamente por encima del valor de referencia.

La figura 5 represente el crecimiento de los ratones K2 tratados con VAA-GC con el tiempo (medido por el peso) en comparación con el crecimiento con el tiempo de los ratones naturales de referencia tratados con VAA-GC. En este modelo de ratón e independientemente del genotipo, las crías de ratón de las camadas más pequeñas tienden a ser más grandes que las crías de ratón de las camadas más grandes. Para compensar esta variación en el tamaño de las crías de ratón como una función del tamaño de la camada, el peso de las crías de los ratones K2 se normaliza como un porcentaje de las crías de su propia camada. No hay diferencia significativa entre el crecimiento con el tiempo de ratones K2 en comparación con los ratones de la camada heterocigóticos (no se muestran los datos). En teoría, la

curva de peso para los ratones K2 no tratados debería ser diferente de la curva de los ratones K2 tratados con VAA-GC representada en la figura 5. En función de los datos de supervivencia históricos de la colonia K2, los K2 no tratados mueren alrededor de 12-15 días después del nacimiento, que es cuando los animales K2 tratados con VAA-GC comienzan a perder peso.

- 5 La memoria descriptiva se entenderá de forma más completa teniendo en cuenta las enseñanzas de las referencias mencionadas dentro de la memoria descriptiva.

La mención de cualquier referencia en la presente memoria no es una admisión de que dichas referencias constituyen técnica anterior con respecto a la presente invención.

Referencias

- 10 1. Lindsay, R.M. Neurotrophic growth factors and neurodegenerative diseases: therapeutic potential of the neurotrophins and ciliary neurotrophic factor. *Neurobiol Aging* 15, 249-51 (1994).
14. Matsushita, M. Projections from the lowest lumbar and sacral-caudal segments to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* 404, 21-32 (1999).
- 15 17. Matsushita, M. & Gao, X. Projections from the thoracic cord to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* 386, 409-21 (1997).
18. Matsushita, M. & Xiong, G. Projections from the cervical enlargement to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* 377, 251-61 (1997).
19. Matsushita, M. & Yaginuma, H. Afferents to the cerebellar nuclei from the cervical enlargement in the rat, as demonstrated with the Phaseolus vulgaris leucoagglutinin method. *Neurosci Lett* 113, 253-9 (1990).
- 20 20. Matsushita, M. & Yaginuma, H. Projections from the central cervical nucleus to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* 353, 234-46 (1995).
21. Voogd, J. The cerebellar nuclei and their efferent pathways. in *The rat nervous system* (ed. Paxinos, G.) 208-215 (Elsevier Academic Press, San Diego, 2004).
22. Dodge, J.C. et al. Gene transfer of human acid sphingomyelinase corrects neuropathology and motor deficits in a mouse model of Niemann-Pick type A disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17822-7 (2005).
23. Kasarskis, E.J. et al. A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). *Neurology* 52, 1427-33 (1999).
26. Chirmule, N. et al. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* 6, 1574-83 (1999).
- 30 37. High, K.A. Clinical gene transfer studies for hemophilia B. *Semin Thromb Hemost* 30, 257-67 (2004).
38. Maheshri, N., Koerber, J.T., Kaspar, B.K. & Schaffer, D.V. Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors. *Nat Biotechnol* 24, 198-204 (2006).
40. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P, Moreau T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group*. *N Engl J Med*. 1998 Jul 30;339(5):285-91.
- 35 42. Gensert JM, Goldman JE (1997) Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS. *Neuron* 19:197—203.
43. Gregg C, Shikar V, Larsen P, Mak G, Chojnacki A, Yong VW, Weiss S. White matter plasticity and enhanced remyelination in the maternal CNS. *J Neurosci*. 2007 Feb 21;27(8):1812-23.
- 40 44. Handwerger S, Freemark M. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2000 Abr;13(4):343-56.
45. Lesniak MA, Gorden P, Roth J. Reactivity of non-primate growth hormones and prolactins with human growth hormone receptors on cultured human lymphocytes. *Clin Endocrinol Metab*. 1977 May;44(5):838-49.
46. Levison SW, Young GM, Goldman JE (1999) Cycling cells in the adult rat neocortex preferentially generate oligodendroglia. *J Neurosci Res* 57:435- 446.
- 45 47. Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A (2006) Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26:7907-7918.

48. Pelton EW, Grindeland RE, Young E, Bass NH. Effects of immunologically induced growth hormone deficiency on myelinogenesis in developing rat cerebrum. *Neurology*. 1977 Mar;27(3):282-8.
49. Peters A, Sethares C (2004) Oligodendrocytes, their progenitors and other neuroglial cells in the aging primate cerebral cortex. *Cereb Cortex* 14:995-1007.
- 5 50. Polito A, Reynolds R (2005) NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat* 207:707—716.
51. Selenkow HA, Saxena BN, Dana CL. Measurement and pathophysiologic significance of human placental lactogen. In Pecile A, Finzi C (eds). *The Feto-Placental Unit*. Amersterdam, Excerpta Medica, 1969, p340.
- 10 52. van Walderveen MA, Tas MW, Barkhof F, Polman CH, Frequin ST, Hommes OR, Valk J (1994) Magnetic resonance evaluation of disease activity during pregnancy in multiple sclerosis. *Neurology* 44:327-329.
53. Voskuhl RR (2003) Hormone-based therapies in MS. *Int MS J* 10:60—66.
54. Zumkeller W. Current topic: the role of growth hormone and insulin-like growth factors for placental growth and development. *Placenta*. 2000 Jul-Ago;21(5-6):451-67.
- 15 55. Belichenko PV, Dickson PI, Passage M, Jungles S, Mobley WC, Kakkis ED. Penetration, diffusion, and uptake of recombinant human alpha-l-iduronidase after intraventricular injection into the rat brain. *Mol Genet Metab*. 2005;86(1-2):141-9.
56. Kakkis E, McEntee M, Vogler C, Le S, Levy B, Belichenko P, Mobley W, Dickson P, Hanson S, Passage M. Intrathecal enzyme replacement therapy reduces lysosomal storage in the brain and meninges of the canine model of MPS L. *Mol Genet Metab*. 2004;83(1-2):163-74.
- 20 57. Bembi B, Ciana G, Zanatta M, et al. Cerebrospinal-fluid infusion of alglucerase in the treatment for acute neuronopathic Gaucher's disease. *Pediatr Res* 1995;38:A425.
58. Looser RR, Walbridge S, Murray GJ, Aizenberg MR, Vortmeyer AO, Aerts JM, Brady RO, Oldfield EH. Convection perfusion of glucocerebrosidase for neuronopathic Gaucher's disease. *Ann Neurol*. 2005 Abr;57(4):542-8.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GENZYME CORPORATION

<120> TERAPIA GÉNICA PARA ENFERMEDADES DE ALMACENAMIENTO LISOSÓMICO

<130> P34472EP-D1-PCT

5 <140> No asignada todavía
<141> 2008-06-02

<150> EP08756596.6
<151> 2008-06-02

10

<160> 2

<170> PatenIn Versión 3.5

<210> 1

< 211> 153

15 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Lys Ile Ser Ser Leu Pro Thr Gln Leu Phe Lys Cys Cys Phe
1 5 10 15

Cys Asp Phe Leu Lys Val Lys Met His Thr Met Ser Ser Ser His Leu
20 25 30

Phe Tyr Leu Ala Leu Cys Leu Leu Thr Phe Thr Ser Ser Ala Thr Ala
35 40 45

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
50 55 60

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
65 70 75 80

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
85 90 95

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
100 105 110

Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp
115 120 125

Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly
130 135 140

Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg Met
145 150

<210> 2

ES 2 905 616 T3

< 211 > 195

< 212 > PRT

< 213 > Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Lys Ile Ser Ser Leu Pro Thr Gln Leu Phe Lys Cys Cys Phe
1 5 10 15

Cys Asp Phe Leu Lys Val Lys Met His Thr Met Ser Ser Ser His Leu
20 25 30

Phe Tyr Leu Ala Leu Cys Leu Leu Thr Phe Thr Ser Ser Ala Thr Ala
35 40 45

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
50 55 60

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
65 70 75 80

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
85 90 95

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
100 105 110

Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp
115 120 125

Met Pro Lys Thr Gln Lys Tyr Gln Pro Pro Ser Thr Asn Lys Asn Thr
130 135 140

Lys Ser Gln Arg Arg Lys Gly Trp Pro Lys Thr His Pro Gly Gly Glu
145 150 155 160

Gln Lys Glu Gly Thr Glu Ala Ser Leu Gln Ile Arg Gly Lys Lys Lys
165 170 175

Glu Gln Arg Arg Glu Ile Gly Ser Arg Asn Ala Glu Cys Arg Gly Lys
180 185 190

Lys Gly Lys
195

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de VAA recombinante que comprende un transgén que codifica la beta glucosidasa ácida para uso en un método para tratar la enfermedad de Gaucher en un sujeto, en el que el método comprende administrar el vector de VAA recombinante a al menos un ventrículo del cerebro, de modo que dicho transgén se expresa en una cantidad terapéuticamente eficaz, en el que el vector de VAA recombinante es un vector de VAA4 o VAA5, en el que la beta glucosidasa ácida expresada se suministra al sistema nervioso central y órganos viscerales afectados, y en el que el sujeto es un mamífero.
2. El vector de VAA recombinante para uso según la reivindicación 1, en el que dicho vector de VAA recombinante comprende una cápside de VAA5 y un genoma de VAA2.
- 10 3. El vector de VAA recombinante para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el método comprende administrar el vector mediante inyección directa en: (i) un ventrículo del cerebro; (ii) un ventrículo lateral del cerebro; o (iii) el cuarto ventrículo del cerebro.
4. El vector de VAA recombinante para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el sujeto es un paciente humano.
- 15 5. El vector de VAA recombinante para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la beta glucosidasa ácida está modificada por TAT.
6. El vector de VAA recombinante para uso según la reivindicación 5, en el que la beta glucosidasa ácida comprende un motivo de 11 aminoácidos del dominio de transducción de proteínas de la proteína TAT de VIH.

Figura 1

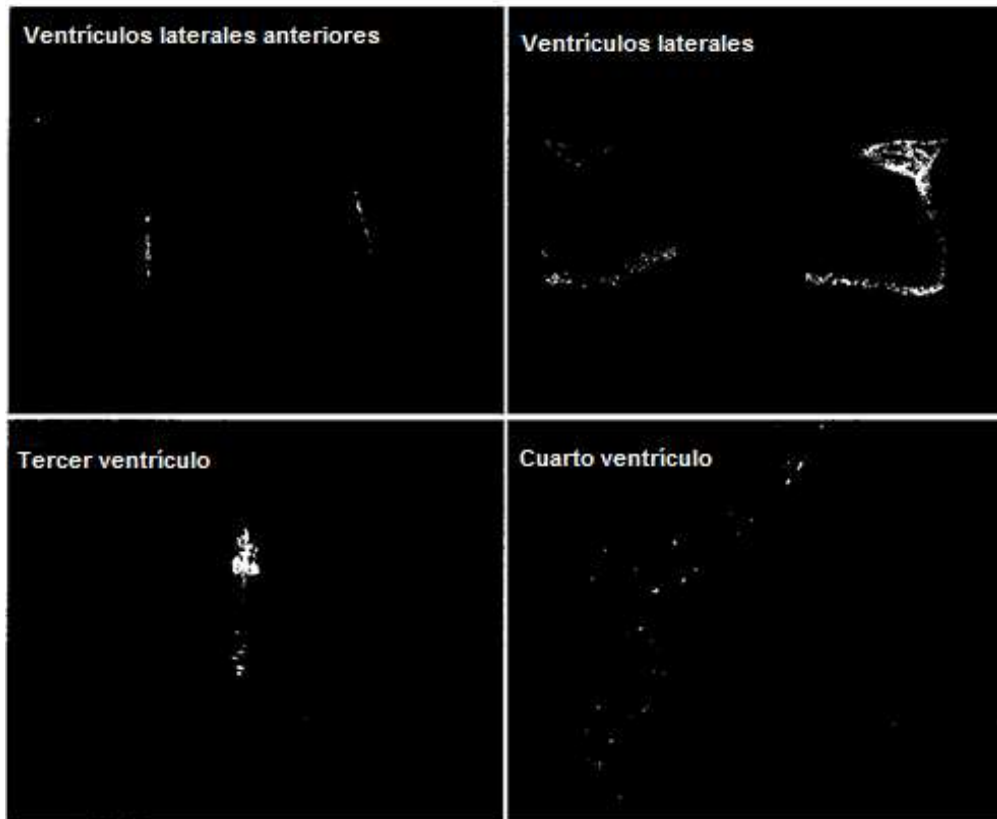


Figura 2

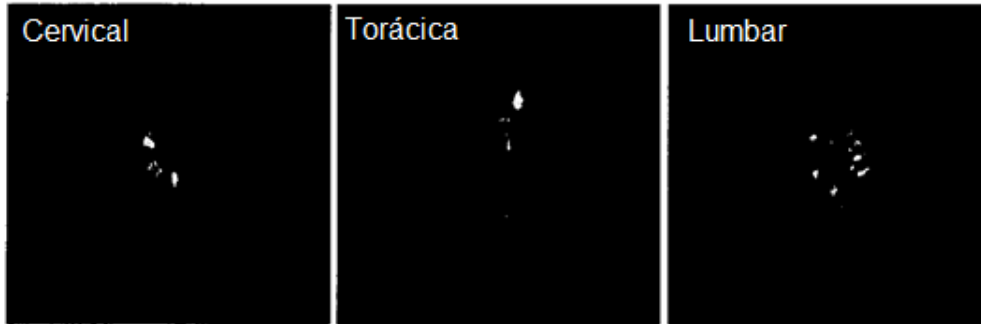


Figura 3

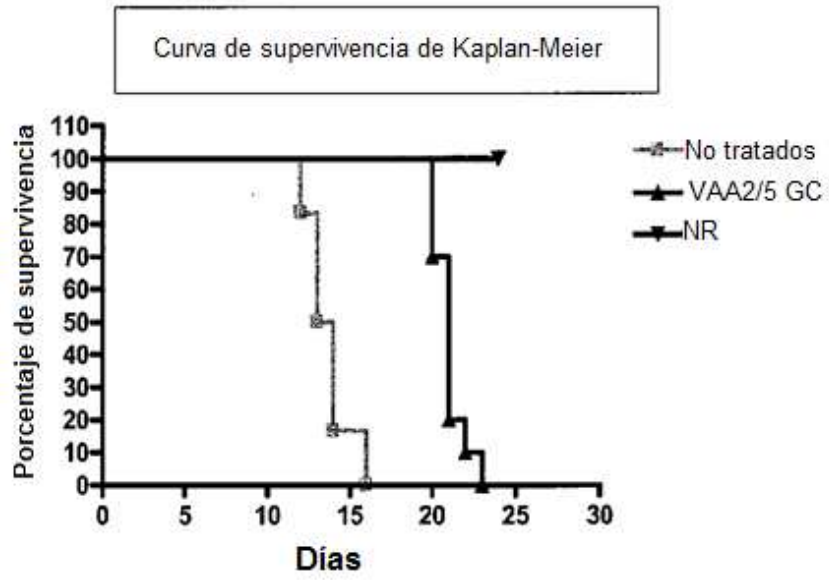


Figura 4

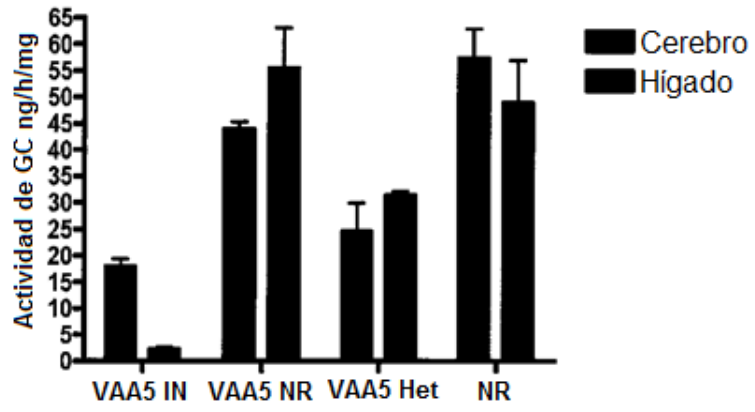


Figura 5

