

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 558**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2013 E 17184780 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3292875**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades**

30 Prioridad:

19.06.2012 US 201213527350

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

24.03.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, INC (100.0%)
223 Grinter Hall
Gainesville, FL 32611, US**

72 Inventor/es:

**BYRNE, BARRY, JOHN;
FALK, DARIN, J.;
PACAK, CHRISTINA;
DERUISSEAU, LARA, ROBERT;
MAH, CATHRYN y
FULLER, DAVID, D.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 813 558 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

Composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades

5 Campo de la invención

La invención se refiere generalmente a los campos de la biología molecular, terapia génica y medicina. En una realización, la invención proporciona un tratamiento basado en terapia génica para enfermedades neuromusculares y de almacenamiento lisosomal.

10

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Pompe es tanto un trastorno de almacenamiento lisosomal como de glucógeno resultante de la deficiencia de α -glucosidasa (GAA). La GAA normalmente es activa en el lisosoma en el que se degrada glucógeno en exceso mediante la escisión de los enlaces α -1,4 y α -1,6 glucosídicos. Sin actividad adecuada de GAA, se acumulan en todas las células cantidades masivas de glucógeno. A pesar de la acumulación sistémica de glucógeno lisosomal en la enfermedad de Pompe, la disfunción del músculo esquelético y cardíaco tradicionalmente se ha visto como la base principal de la debilidad muscular en este trastorno.

15

La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas y abarca las realizaciones de los siguientes párrafos enumerados:

20

1. Una composición para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Pompe, en la que la composición comprende un vector rAAV2/8, en la que el vector rAAV2/8 comprende una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica α -glucosidasa ácida, en la que el ácido nucleico heterólogo está unido de manera operativa a un promotor de desmina, un elemento potenciador factor potenciador específico al miocito 2, y un elemento potenciador de MyoD, en la que la composición se administra a un sujeto en necesidad de la misma por inyección intramuscular, intratorácica, intraespinal, intratecal, intracisternal o intravenosa.

25

2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al sujeto se administra además un inhibidor de acetilcolinesterasa.

30

3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el sujeto es un ser humano.

Sumario de la invención

La presente divulgación proporciona vectores rAAV para la administración de genes terapéuticos en diversos tejidos, órganos y células incluyendo el músculo esquelético, el corazón, y el SNC, para la restauración de la integridad de la unión neuromuscular, y/o para el tratamiento de enfermedades neuromusculares y enfermedades de almacenamiento de glucógeno. Ventajosamente, los vectores rAAV de la presente invención proporcionan expresión sostenida, a largo plazo del gen terapéutico de interés en un sujeto para el tratamiento de la enfermedad de Pompe.

35

40

También desvelado en el presente documento, la presente divulgación proporciona tratamiento para enfermedades neuromusculares incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Pompe, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal, esclerosis múltiple, enfermedad de almacenamiento de glucógeno Tipo 1a, distrofia muscular de cintura y extremidades, síndrome de Barth, y miastenia grave.

45

Las composiciones y los métodos para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal (por ejemplo, enfermedades de almacenamiento de glucógeno tales como Pompe) son como se describen en el presente documento.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

50

En una opción, un método como se describe en el presente documento incluye administrar a un sujeto mamífero que tiene una deficiencia de alfa-glucosidasa ácida una composición que incluye al menos un virión rAAV que incluye un polinucleótido que codifica alfa-glucosidasa ácida, el polinucleotídico interpuesto entre una primera repetición terminal invertida de AAV y una segunda repetición terminal invertida de AAV, en el que la administración de la composición da como resultado función incrementada de la neurona motora en el sujeto mamífero. El sujeto mamífero puede tener enfermedad de Pompe. La composición se puede administrar intravenosamente, intratecalmente o intramuscularmente. En una opción, el al menos un virión rAAV puede incluir las proteínas de la cápside serotipo 1, 8, 9 y/o rh10. La composición se puede administrar al diafragma del sujeto mamífero y viajar a al menos una neurona motora por transporte retrógrado o se puede administrar directamente al sistema nervioso central.

55

60

Otro método descrito en el presente documento incluye administrar a un sujeto mamífero que tiene enfermedad de Pompe una composición que incluye al menos un vector viral que codifica alfa-glucosidasa ácida, en el que la administración de la composición da como resultado función incrementada de la neurona motora en el sujeto mamífero y trata la enfermedad de Pompe. El al menos un vector viral puede ser un vector rAAV. La composición se puede

65

administrar por vía intratecal, intravenosa, intramuscular o parenteral. En una realización, el vector rAAV puede estar dentro de un virión rAAV que incluye proteínas de la cápside serotipo 1, 8, 9 y/o rh10. La composición se puede administrar al diafragma del sujeto mamífero y viajar a al menos una neurona motora por transporte retrógrado o se puede administrar al sistema nervioso central.

5 Aunque las composiciones y los métodos similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o el ensayo de la presente invención, a continuación se describen composiciones y métodos adecuados. En caso de conflicto, dominará la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Las realizaciones particulares discutidas a continuación son solamente ilustrativas y no pretenden ser limitantes.

10

Breve descripción de los dibujos

La invención se señala con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Las ventajas anteriores y adicionales de esta invención pueden entenderse mejor refiriéndose a la siguiente descripción tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

15

La FIG. 1A, la FIG. 1B y la FIG. 1C son escaneos de fotografías de tejidos cardíacos teñidos y la FIG 1D es una gráfica que muestra que la administración intravenosa de rAAV2/9 da como resultado transducción a alto nivel del corazón. Neonatos (n=5) de ratón C57BL6/129SvJ de un día de vida se inyectaron con 1×10^{11} gv de pseudotipos de rAAV AAV2/1, AAV2/8 y AAV2/9 que portan la construcción *CMV-lacZ* por la vía de administración en la vena temporal previamente descrita. A las 4 semanas después de la inyección, se realizó el ensayo de detección de la enzima β -galactosidasa para cuantificar los niveles de expresión de lacZ. La FIG. 1A, la FIG 1B y la FIG 1C muestran criosecciones teñidas por X-Gal de los corazones inyectados con AAV2/1 (FIG. 1A), AAV2/8 (FIG. 1B), y AAV2/9 (FIG. 1C). **La FIG. 1D** muestra los niveles de la enzima β -galactosidasa en los corazones (n = 5).

20

La FIG. 2A y la FIG. 2B son gráficas que muestran el análisis de biodistribución de expresión de los niveles de la enzima β -galactosidasa detectados en diversos especímenes tras la administración de las construcciones rAAV2/8-CMV-LacZ o rAAV2/9-CMV-lacZ. La FIG. 2A muestra la biodistribución a través de los tejidos musculares en comparación con el miocardio. Ht indica corazón; Di, diafragma; Qu, cuádriceps; So, sóleo; ED, extensor largo de los dedos; TA, tibial anterior. La FIG 2B muestra la biodistribución de expresión en el músculo no esquelético. Br indica cerebro; Lu, pulmón; Sm, Intestino delgado; Ki, riñón; Spl, bazo.

25

30

La FIG. 3A, la FIG. 3B y la FIG. 3C son gráficas que muestran un ensayo de curso temporal tras la administración mediada por rAAV2/9 de *CMV-lacZ*. FIG. 3A: tras la administración de transgén usando rAAV2/9, los niveles de expresión llegaron a la meseta en el músculo esquelético a las 4 semanas después de la administración y continuaron incrementándose en el corazón durante la duración de 8 semanas del experimento. La FIG. 3B muestra que los genomas del vector por célula también continuaron incrementándose en el tejido cardíaco pero no en el músculo esquelético durante la duración del experimento. La FIG. 3C muestra que los transcritos de ARN también se incrementaron en el tejido cardíaco durante la duración del experimento (n = 4 por momento).

35

La FIG. 4A es una gráfica que muestra el análisis del nivel de expresión de β -galactosidasa del corazón y el músculo esquelético (4 semanas después de la administración) desde que los ratones se inyectaron con 1×10^{11} gv de rAAV2/9-CMV-lacZ como los neonatos de 1 día de vida. **La FIG. 4B** es una gráfica que muestra el análisis del nivel de expresión de β -galactosidasa del corazón y el músculo esquelético (4 semanas después de la administración) desde que los ratones se inyectaron con 1×10^{11} gv de rAAV2/9-CMV-lacZ por la vena yugular a los 3 meses de vida (n = 3). **La FIG. 5A** es una gráfica que muestra la actividad de GAA en especímenes de tejido de los corazones de macacos rhesus inyectados de intravenosamente al nacer con o bien rAAV2/1-CMV-hGaa o rAAV2/9-CMV-hGaa. El eje X muestra la actividad de GAA total menos la actividad de base de los controles no inyectados por genoma del vector administrado. **La FIG. 5B** es una gráfica que demuestra el perfil de distribución del genoma del vector entre el tejido del cardíaco y del músculo esquelético de macaco rhesus inyectado intravenosamente al nacer con rAAV2/9-CMV-hGaa. Todos los datos son a los 6 meses después de la administración del vector.

40

45

La FIG. 6A, la FIG. 6B y la FIG. 6C son gráficas que muestran los resultados de la ventilación por minuto (ml/min) en la línea base y durante 10 minutos de hipercapnia en ratones control y GAA^{-/-} de 6 meses (FIG. 6A), 12 meses (FIG. 6B) y >21 meses (FIG. 6C)-. Media \pm EEM; * = GAA^{-/-} diferente del control, † = macho diferente de la hembra.

50

La FIG. 7A es una gráfica que muestra los resultados de la ventilación por minuto en la línea base y la respuesta media a hipercapnia en ratones control, GAA^{-/-} y con GAA específica a músculo. Los ratones con GAA específica a músculo se mantienen sobre el entorno de GAA^{-/-}, pero expresan solamente GAA en el músculo esquelético. **La FIG. 7B** es una gráfica que muestra los resultados de la función contráctil diafragmática para el diafragma de ratón control, GAA^{-/-} y con GAA específica a músculo a los 12 meses de vida.

55

La FIG. 8 es una gráfica que muestra que el flujo inspiratorio medio proporciona una estimación del impulso neural para respirar. El flujo inspiratorio medio basal en ratones control y GAA^{-/-} de 6 meses, 12 meses y >21 meses. Media \pm EEM; * = diferente del control; no diferencias en edad ni género.

60

La FIG. 9A es una gráfica y **la FIG. 9B** es una histotinción que muestra los resultados de la cuantificación de glucógeno para los segmentos de la médula espinal C₃-C₅ (FIG. 9A) en ratones control y GAA^{-/-} de 6 meses, 12 meses y >21 meses de vida. El conjunto motor frénico se encuentra dentro de los segmentos espinales cervicales C₃-C₅. Detección histológica de glucógeno (FIG. 9B) con el colorante de ácido periódico-Schiff. Las neuronas motoras frénicas (flechas) se identificaron por el indicador neuronal retrógrado Fluoro-Gold® aplicado al diafragma.

65

La FIG. 10A es una gráfica que muestra los resultados de una amplitud pico de 30 segundos de la media de tiempo

en marcha para ratones control y GAA^{-/-}. Los valores de P_aCO₂ son similares. **La FIG. 10B** es un neurograma que muestra resultados de un neurograma frénico puro (panel superior) y la media de tiempo en marcha (panel inferior) para un ratón control y GAA^{-/-} mecánicamente ventilado con valores de P_aCO₂ similares. La escala, el aumento del amplificador, los ajustes del filtro, y las configuraciones de registro eran idénticas en las dos preparaciones.

La FIG. 11 es una gráfica que muestra que la inyección intravenosa de rAAV2/1 conduce a aclaramiento de glucógeno en tejido de diafragma afectado. Un año después de la inyección, el tejido de diafragma de los ratones Gaa^{-/-} administrados con rAAV2/1-CMV-GAA intravenosamente y ratones Gaa^{-/-} control emparejados por edad no tratados se fijó y se tiñó con ácido peryódico-Schiff (PAS) mediante métodos convencionales (Richard Allen, Kalamazoo, MI). Las fotografías se tomaron usando un microscopio de luz Zeiss, cámara Olympus, y sistema de grabación digital MagnaFire®. Aumento x 400.

La FIG. 12A, la FIG. 12B, la FIG. 12C y la FIG. 12D son una serie de gráficas que muestran que la administración sistémica de rAAV2/1-CMV-hGAA confiere ventilación mejorada en respuesta a hipercapnia seis meses después del tratamiento. La ventilación de Gaa^{-/-} (n = 6) tratados y Gaa^{-/-} no tratados emparejados por edad y C57BL6/129SvJ (n = 10) se evaluó usando pletismografía de cuerpo completo barométrica. * = p ≤ 0,05

La FIG. 13A, la FIG. 13B, la FIG. 13C y la FIG. 13D son una serie de gráficas que muestran que la administración sistémica de rAAV2/1-CMV-hGAA confiere ventilación mejorada en respuesta a hipercapnia doce meses después del tratamiento. La ventilación de Gaa^{-/-} (n = 12) tratados y Gaa^{-/-} no tratados emparejados por edad y C57BL6/129SvJ (n = 10) se evaluó usando pletismografía de cuerpo completo barométrica. * = p ≤ 0,05

La FIG. 14A, la FIG. 14B, la FIG. 14C y la FIG. 14D son una serie de gráficas que muestran que la función ventilatoria está significativamente mejorada en ratones tratados con AAV2/1. La función ventilatoria se ensayó mediante pletismografía barométrica de cuerpo completo despierto, desatado. Las gráficas muestran la respuesta de la ventilación por minuto a hipercapnia durante el periodo de tiempo de 10 minutos.

La FIG. 15A, la FIG. 15B, la FIG. 15C y la FIG. 15D son una serie de gráficas que muestran que la función ventilatoria está significativamente mejorada en ratones tratados con AAV2/1. Las gráficas muestran la respuesta del flujo inspiratorio pico a hipercapnia durante el periodo de tiempo de 10 minutos.

La FIG. 16 es una ilustración esquemática de un híbrido de amplitud de ráfaga frénica Fuller. La amplitud de ráfaga frénica medida en voltios describe la magnitud del nervio frénico con cada respiración. El voltaje inferior en los animales con GAA indica función de la neurona motora frénica defectuosa. La figura muestra la restauración de la respuesta frénica tras la administración de AAV-GAA al diafragma.

La FIG. 17A, la FIG. 17B, la FIG. 17C, la FIG. 17D, la FIG. 17E, la FIG. 17F y la FIG. 17G son una gráfica (FIG. 17A) y una serie de fotografías (FIG 17B-FIG 17G) de neuronas motoras frénicas que ilustran el contenido de glucógeno en la médula espinal cervical (C₃-C₅). La cuantificación de glucógeno bioquímico (µg de glucógeno/mg de peso seco) de la médula espinal en ratones control y Gaa^{-/-} a 6, 12 y >21 meses de vida (FIG. 17A). * = Gaa^{-/-} diferente del control, p < 0,01, † = 6 meses diferentes de >21 meses, p < 0,01. Los conjuntos motores múltiples presentan tinción positiva para glucógeno en la médula espinal cervical de ratón Gaa^{-/-} (FIG. 17E) frente al control (FIG. 17B). Las neuronas motoras frénicas se marcaron con Fluoro-Gold® en los ratones control (FIG. 17C) y Gaa^{-/-} (FIG. 17F). La neurona motora frénica marcada de Gaa^{-/-} presenta una tinción más intensa para glucógeno (FIG. 17G) frente a una neurona motora frénica control (FIG. 17D).

La FIG. 18A y la FIG. 18B son un par de gráficas que muestran descenso dependiente de la edad en la ventilación por minuto. Se evaluaron ratones control y deficientes en GAA para Ve/VCO₂ (A) y ventilación por minuto (B) a los 6, 12, >21 meses. Los ratones KO GAA tiene 1/2 normal Ve/VCO₂ y ventilación por minuto en comparación con los controles.

La FIG. 19A, la FIG. 19B y la FIG. 19C ilustran la respuesta de ventilación por minuto a hipercapnia. La ventilación por minuto de la línea base de 60 minutos (21 % de O₂, N₂ equilibrado) y la respuesta a 10 minutos a hipercapnia (7 % de CO₂, O₂ equilibrado) para ratones control y Gaa^{-/-} de 6 (FIG. 19A), 12 (FIG. 19B) y >21 (FIG. 19C) meses de vida. * = control diferente de Gaa^{-/-}, p < 0,01.

La FIG. 20A y la FIG. 20B son un par de gráficas, y **la FIG. 20C** es una serie de registros gráficos que muestran ratones con hGaa específica a músculo. Las mediciones de la fuerza frecuencia para ratones B6/129 (n = 3), Gaa^{-/-} (n = 3) y con hGaa específica a músculo (n = 6) (FIG. 20A). † = Gaa^{-/-} diferente de los ratones control y con hGaa específica a músculo. La ventilación por minuto en la línea base y la respuesta media a hipercapnia para ratones B6/129, Gaa^{-/-} y con hGaa específica a músculo (n = 8/grupo) (FIG. 20B). * = diferente del control, ‡ = todos los grupos diferentes unos de otros. Todos los valores considerados significativos a p < 0,01. Los registros gráficos representativos del flujo de aire de ratones no anestesiados durante respiración tranquila (línea base) y reto respiratorio (hipercapnia) se proporcionan en la FIG. 20C. La escala es idéntica en todos los paneles. La calibración del flujo de aire está en ml/s.

La FIG. 21A es una gráfica y **la FIG. 21B** es una serie de registros gráficos que muestran la amplitud de ráfaga inspiratoria frénica. Amplitud de ráfaga inspiratoria frénica de treinta segundos para ratones control, Gaa^{-/-} y con hGaa específica a músculo con similares valores de P_aCO₂ arterial (mostrado en la gráfica). * = diferente del control, p < 0,01. Se muestran la amplitud frénica neta (registros gráficos superiores) y el registro gráfico rectificado, integrado (registros gráficos inferiores) de ratones control representativos, Gaa^{-/-} y MTP (la escala es idéntica en cada panel).

La FIG. 22 es una fotografía de un gel de agarosa que muestra que el ADN genómico aislado del diafragma contiene gen control después de la administración del vector.

La FIG. 23 es una fotografía de un gel que muestra el ADN genómico aislado del núcleo frénico.

La FIG. 24 es una gráfica que muestra que la ventilación se mejora 4 semanas después de la inyección con AAV-CMV-GAA (2,52 × 10¹⁰ partículas).

La FIG. 25 muestra las copias de genoma del vector en el tibial anterior (TA) y la médula espinal lumbar después de la inyección intramuscular directa de copias de genoma de AAV2/9-GAA en animales *Gaa*^{-/-}. En resumen, los animales *Gaa*^{-/-} recibieron una inyección única de vectores AAV2/9-DES-GAA o AAV2/9-CMV-GAA en el músculo tibial anterior. Se valoraron las copias de genoma del vector en el tibial anterior y la médula espinal lumbar 28 días después de la inyección. Ambas construcciones demuestran transducción eficaz del músculo esquelético y transporte retrógrado del transgén terapéutico. **La FIG. 26** muestra la copia de genoma del vector y la actividad de la enzima GAA en animales con Pompe tras una inyección única de AAV2/9-hGAA en el músculo tibial anterior. Se muestran copias de gv en el tibial anterior (A) y (B) la médula espinal lumbar a un mes después de la inyección. Los datos de PCR indica suficiente transducción retrógrada de los vectores AAV en la médula espinal. (C) Los niveles de actividad de GAA en el sitio de inyección (TA) dan como resultado un incremento significativo en el nivel enzimático en ratones *Gaa*^{-/-}.

La FIG. 27 muestra tinción de la unión neuromuscular (NMJ) tras una inyección única de AAV2/9-DES-hGAA en el tibial anterior. La inmunotinción de la NMJ muestra que la administración mediada por rAAV2/9 de hGAA da como resultado la inversión de la patología de la enfermedad de Pompe y la restauración de la NMJ en animales *Gaa*^{-/-} tratados.

La FIG. 28 muestra la transducción del conjunto de neurona motora frénica después de la inyección intraespinal directa de construcciones indicadoras (*reporter*) de AAV en la región C3-C5 de ratón. (A) Detección positiva de las construcciones indicadoras de AAV (*) en el sitio de inyección en preparaciones fijadas de cerebro intacto y médula espinal. (B) La detección epifluorescente de la sección transversal de AAV-GFP demuestra transducción del conjunto motor frénico.

La FIG. 29 muestra la detección inmunohistoquímica de la proteína GAA en el conjunto de neurona motora frénica después de la inyección intraespinal directa de AAV-GAA en la región C3-C5 de ratón. La detección de AAV-GAA en el conjunto de neurona motora frénica se muestra (A) a bajo y (B) a mayor aumento. La tinción marrón oscuro es positivo para la detección de proteína GAA.

La FIG. 30 muestra inyección intratorácica de colorante infrarrojo en ratón. La imagen indica detección positiva del colorante a través de la superficie del diafragma.

La FIG. 31 muestra actividad del diafragma y la neurona motora frénica durante las condiciones de hipercápnica después de la inyección intratorácica de los vectores AAV. Los animales *Gaa*^{-/-} no tratados muestran un EMG (diafragma) y amplitud de ráfaga (nervio frénico) débil y atenuado en comparación con animales tratados con AAV2/9-CMV-GAA y AAV2/9-DES-GAA.

La FIG. 32 muestra detección de indicador de AAV en la médula espinal cervical y torácica. La tinción inmunohistoquímica anti-GFP detecta la tinción de neurona motora frénica (izquierda) y costal (derecha) positiva demostrando que la administración intratorácica de AAV2/9 da como resultado transducción retrógrada.

La FIG. 33 muestra EMG de diafragma (A), copias de vectores de genoma de AAV (B), y mejora de la propagación de la señal del nervio frénico (C) tras la administración intratorácica de los vectores rAAV2/9-CMV-GAA o rAAV2/9-DES-GAA en animales *Gaa*^{-/-}.

La FIG. 34 muestra corrección de los síntomas patológicos en animales *Gaa*^{-/-} después de la administración intravenosa de los vectores AAV2/9-CMV-GAA o AAV2/9-DES-GAA. (A) muestra la fracción de expulsión a los tres meses después de la inyección. Animales tratados con AAV-DES presentan mejora significativa en la fracción de expulsión. Media y eem (n = 6). (B) muestra que todos los tratamientos dieron como resultado un incremento significativo del peso corporal en uno y tres meses después de la inyección. (C) muestra los intervalos PR a un mes y tres meses después del tratamiento. (D) muestra la mejora de la función cardíaca después de la inyección intravenosa. (E) muestra la actividad enzimática de GAA en el corazón después de la administración intravenosa. (F) las mediciones de la fuerza-frecuencia *in vitro* del diafragma de animales tratados con AAV2/9-CMV y AAV2/9-DES-GAA presentan fuerza titánica máxima incrementada. Media y eem (n = 6). * Valor de p ≤ 0,05 en comparación con ratones no tratados. El tratamiento de AAV2/9-GAA da como resultado una mejora de la función contráctil a frecuencias por encima de 60 Hz. (G) muestra la actividad de la enzima GAA en el músculo respiratorio. (H) muestra las copias de genoma del vector en el corazón, diafragma y médula espinal después de la administración intravenosa de los vectores AAV2/9-CMV y AAV2/9-DES-GAA. (I) muestra el nivel de expresión de GAA después de la administración intravenosa de los vectores AAV2/9-CMV y AAV2/9-DES-GAA.

La FIG. 35 es una representación esquemática de los virus AAV y HSV. Los genomas tipo silvestre (*wild type*, WT) y recombinantes se muestran con elementos genéticos principales.

La FIG. 36 ilustra la producción de AAV mediante el método de coinfección con HSV usando células adherentes. 1 y 2) generación de reservas de rHSV; 3) coinfección con rHSV; 4) recogida y recuperación de rAAV.

La FIG. 37 muestra la purificación simplificada de rAAV2/9 mediante precipitación por pl y cromatografía en columna. (A) PAGE teñido con plata de lisado crudo (línea 1), lisado crudo después de la microfluidización (línea 2), sobrenadante que retiene AAV2/9 después de la precipitación por pl (línea 3); (B) PAGE teñido con plata de fracciones que contienen rAAV2/9 purificado por pl (líneas 2 a 7) después de IEC con sefarsa SP y concentración.

La FIG. 38 es una evaluación de secciones transversales del nervio ciático en ratones tipo silvestre y *Gaa*^{-/-}. Los ratones *Gaa*^{-/-} muestran morfometría irregular y un incremento en la cantidad de la matriz extracelular.

La FIG. 39 muestra sección del nervio longitudinal teñida con H&E. La comparación de los ratones tipo silvestre y *Gaa*^{-/-} revela un incremento en la tinción nuclear que indica diferenciación y proliferación de células Schwann.

La FIG. 40 es una evaluación de la integridad de la unión neuromuscular del sóleo en ratones tipo silvestre y *Gaa*^{-/-}. (A) Secciones longitudinales del músculo sóleo. Indicar los cambios marcados en *Gaa*^{-/-} en los que la disociación de la unión neuromuscular es evidente. (B) Unión neuromuscular en la muestra completa del diafragma de ratón. La unión neuromuscular intacta típica (flecha) y la unión neuromuscular atípica (*) en el diafragma de *Gaa*^{-/-}. Alfa-

bungarotoxina (rojo) y Neurofilamento H (verde).

La FIG. 41 muestra análisis morfométrico del diafragma NMJ. Los receptores de acetilcolina (AChR) de *Gaa*^{-/-} son significativamente mayores en comparación con WT. Indicar la apariencia focal y no congruente de la marcación de α -bungarotoxina en los *Gaa*^{-/-}.

5 La FIG. 42 muestra secciones transversales del nervio ciático en ratones WT y *Gaa*^{-/-}. Los ratones *Gaa*^{-/-} muestran morfometría axonal irregular y un incremento en la matriz extracelular.

La FIG. 43 muestra la pérdida de Sinaptotagmina en la NMJ. Los animales *Gaa*^{-/-} (B) presentan una pérdida profunda de la expresión de sinaptotagmina cuando se compara con WT (A). Magenta-NFH.

La FIG. 44 muestra un diseño experimental de la expresión mediada por rAAV de GAA en animales.

10 La FIG. 45 muestra un descenso en el tamaño de los receptores de acetilcolina en la pierna del ratón *Gaa*^{-/-} inyectado con AAV2/9-DESMIN-GAA. Los animales *Gaa*^{-/-} muestran un incremento significativo en el tamaño del AChR, mientras que un descenso en el tamaño del AChR después del tratamiento con AAV2/9-DESMIN-GAA proporciona efectos terapéuticos positivos frente a la patología de NMJ. En un ratón *Gaa*^{-/-} de 23 meses de vida, dos meses después de la inyección de los vectores AAV2/9-DESMIN-GAA directamente en el músculo tibial anterior derecho, se miden el tamaño del receptor de acetilcolina (AChR) en la pierna inyectada y la pierna contralateral.

15 La FIG. 46 muestra que los animales *Gaa*^{-/-} presentan una pérdida de la integridad de la NMJ cuando se comparan con los animales tipo silvestre (WT). La normalización de la unión parece darse a 1 mes después de la administración de AAV9-GAA (panel derecho).

20 La FIG. 47 muestra marcación axonal (Gap43) en animales *Gaa*^{-/-} tratados con AAV2/9-GAA.

La FIG. 48 muestra la ventilación en ratones *Gaa*^{-/-} después de la administración intraespinal de AAV-GAA. Los animales tratados con vector (línea discontinua) mostraron parámetros ventilatorios mejorados durante la línea base (paneles izquierdos) y el reto respiratorio hipercápnico (paneles derechos).

25 Descripción detallada

La presente invención proporciona vectores rAAV para la administración de genes terapéuticos en diversos tejidos, órganos y células incluyendo el músculo esquelético, el corazón, y el SNC, para tratamiento de la enfermedad de Pompe. Ventajosamente, los vectores rAAV de la presente invención proporcionan expresión sostenida, a largo plazo del gen terapéutico de interés en un sujeto.

30 En una realización, la presente invención proporciona un virión del virus adenoasociado (AAV) recombinante, que comprende un vector rAAV que comprende una molécula de ácido nucleico heteróloga (también referida como un transgén o un gen terapéutico), y el vector AAV se introduce en una cápside viral.

35 También desvelado en el presente documento, el virión rAAV comprende un vector rAAV que comprende una molécula de ácido nucleico heteróloga (también referida como un transgén o un gen terapéutico) que codifica una proteína o polipéptido de interés,

40 en el que la molécula de ácido nucleico heteróloga está unida de manera operativa a elementos control (por ejemplo, promotor, potenciador) capaces de dirigir la expresión *in vivo* o *in vitro* de la proteína o el polipéptido de interés,

en el que la molécula de ácido nucleico heteróloga está flanqueada en un extremo con una repetición terminal invertida de AAV, y

45 en el que el vector rAAV se introduce en una cápside vírica.

En una realización preferida, la presente invención pertenece a vectores rAAV pseudotipificados. En determinadas realizaciones, la presente invención pertenece a vectores rAAV2/x, los cuales comprenden el genoma del vector de AAV2 y las cápsides de AAVx (por ejemplo, AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, o AAVrh10). En una realización preferida, la presente invención pertenece a los vectores rAAV2/8 (también referidos en las Figuras como rAAV8).

50 En una realización, el vector rAAV comprende un promotor de citomegalovirus (CMV). En una realización, el vector rAAV comprende un promotor de desmina (DES). En una realización específica, el vector rAAV comprende elementos reguladores para la expresión específica a tejido del transgén, tal como, por ejemplo, factor potenciador específico al miocito 2 (MEF2), y elemento potenciador de myoD.

60 También desvelado en el presente documento, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad neuromuscular, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento, una cantidad eficaz de una composición que comprende un vector rAAV de la presente invención.

65 En una opción específica, la presente divulgación proporciona un método para restaurar la integridad de la unión neuromuscular y/o para mejorar la integridad de la unión neuromuscular dañada en un sujeto, en la que el método comprende administrar al sujeto, una cantidad eficaz de una composición que comprende un vector rAAV de la presente invención. En determinadas opciones, la integridad de la unión neuromuscular dañada está causada por la

enfermedad o lesión neuromuscular.

También desvelado en el presente documento, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad mediante la administración de un gen terapéutico en las células de interés, en la que el método comprende introducir en una célula, una cantidad eficaz de una composición que comprende un vector rAAV de la presente invención.

En determinadas realizaciones, el vector rAAV de la presente invención se administra por inyección intravenosa, intramuscular, intratorácica, intratecal, intracisternal o intraespinal. En determinadas opciones, los vectores rAAV se administran a células del músculo esquelético, el diafragma, el músculo costal y/o cardíaco de un sujeto. En determinadas opciones, los vectores de rAAV se administran a células neuronales en el sistema nervioso periférico y/o central por transporte directo o retrógrado.

También desvelado en el presente documento, la presente divulgación proporciona tratamiento para enfermedades neuromusculares incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Pompe, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal, esclerosis múltiple, enfermedad de almacenamiento de glucógeno Tipo 1a, distrofia muscular de cintura y extremidades, síndrome de Barth, y miastenia grave.

También desvelado en el presente documento, el vector rAAV comprende un gen terapéutico que codifica GAA y el vector rAAV se administra en el sistema nervioso central (por ejemplo, la médula espinal y el cerebro) para reducir la acumulación de glucógeno en el sistema nervioso central en un sujeto con enfermedad de Pompe.

También desvelado en el presente documento, la presente divulgación proporciona tratamiento para una enfermedad neuromuscular que no es la enfermedad de Pompe. En una opción, la presente divulgación mejora la integridad de la unión neuromuscular dañada en un sujeto que no tiene enfermedad de Pompe. El modelo animal de la enfermedad de Pompe se usa como un ejemplo para ilustrar que los vectores rAAV de la presente invención dan como resultado administración eficaz del gen terapéutico que codifica GAA en las células, tejidos y órganos de interés. El modelo animal de la enfermedad de Pompe también se usa como un ejemplo para ilustrar que los vectores rAAV de la presente invención dan como resultado mejora de la integridad de la unión neuromuscular. Un experto en la técnica, a la vista de estos ejemplos, reconocería fácilmente que los vectores rAAV de la presente invención también se pueden usar para administrar otros genes terapéuticos a células, tejidos y órganos de interés (por ejemplo, células neuronales), proporcionando de ese modo tratamiento para las enfermedades neuromusculares y/o mejorando la integridad de la unión neuromuscular en un sujeto que no tiene enfermedad de Pompe.

En el presente documento se describen composiciones y métodos que incluyen viriones rAAV que tienen vectores rAAV que expresan GAA para el tratamiento de un sujeto mamífero que tiene una deficiencia de GAA. En el presente documento también se desvelan composiciones que comprenden serotipos de rAAV (por ejemplo, serotipos 1-10 o derivados de los mismos) que expresan moléculas terapéuticas en combinación con una vía intravenosa de administración da como resultado serotipos de rAAV que son más fácilmente capaces de atravesar el sistema vascular y someter eficazmente a transducción un tipo de tejido particular (por ejemplo, tejido cardíaco, tejido de diafragma, tejido del sistema nervioso central).

También desvelado en el presente documento, los AAV se modifican para incluir ligandos que son específicos a célula y/o tejido para que las composiciones se administren de manera sistémica y la absorción en las dianas esté dirigida y sea específica.

Cuando se tiene en consideración aquellas características deseables en un vehículo para la administración de gen en un mamífero, el rAAV parvovirus no patógeno (4,7 kb) surgió como una elección atractiva, principalmente debido a su pequeño tamaño y capacidad probada para persistir durante largos periodos de tiempo en células infectadas. rAAV es un virus de ADN monocatenario que requiere un auxiliar, tal como herpes virus o adenovirus, para replicarse. Con los recientes descubrimientos de serotipos adicionales de rAAV, llega a ser posible seleccionar aquellos con los tropismos más ventajosos para dirigirse a y/o evitar tejidos como se desee para las aplicaciones específicas. El sistema de administración de gen más óptimo para cualquier aplicación terapéutica combinará una vía de administración física clínicamente ventajosa con el serotipo rAAV que tiene la afinidad natural más alta para un tejido específicamente dirigido de interés.

En una opción típica, una composición incluye un virión rAAV que tiene un vector rAAV que codifica GAA que mejora la función del nervio frénico en un sujeto mamífero que tiene deficiencia de GAA (por ejemplo, enfermedad de Pompe). El virión rAAV se puede someter a transducción directamente en el sistema nervioso central, o se puede someter a transducción en otros tipos de tejido (por ejemplo, diafragma) y transportar al sistema nervioso central por transporte retrógrado. Al mejorar la actividad del nervio frénico en un sujeto mamífero (por ejemplo, ser humano) que tiene una deficiencia de GAA, se puede corregir los déficits respiratorios resultantes (por ejemplo, ventilación reducida, función cardíaca reducida, etc.)

En otra realización, la administración del rAAV se realiza por administración intravenosa (por ejemplo, administración sistémica). En una opción típica, se usa la administración sistémica, ya que impacta en los aspectos cardíacos,

musculares y respiratorios de la enfermedad.

Otros ejemplos de diferentes moléculas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSD) incluyen sin limitación: síndrome de Hurler: α -L-iduronidasa; síndrome de Hunter: iduronato sulfatasa; 5 síndrome de Sanfilippo: heparano N-sulfatasa; Morquio A: galactosa-6-sulfatasa; Morquio B: β -galactosidasa ácida; enfermedad de Sly: 3-glucoronidasa; enfermedad de célula I: N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa; enfermedad de Schindler: α -N-acetilgalactosaminidasa (α -galactosidasa B); enfermedad de Wolman: lipasa ácida; éster de colesterol: lipasa ácida; enfermedad de almacenamiento; enfermedad de Farber: ceramidasa ácida lisosomal; enfermedad de Niemann-Pick: esfingomielinasa ácida; enfermedad de Gaucher: β -glucosidasa (glucocerebrosidasa); enfermedad de 10 Krabbe: galactosilceramidasa; enfermedad de Fabry: α -galactosidasa A; gangliosidosis GM1: β -galactosidasa ácida; Galactosialidosis: β -galactosidasa y neuraminidasa; enfermedad de Tay-Sach: hexosaminidasa A; enfermedad de Sandhoff: hexosaminidasa A y B; neuronal ceroidea: palmitoil proteín tioesterasa (PPT); neuronal ceroidea: tripeptidil aminopeptidasa I1 (TPP-I). Las moléculas de ácido nucleico heterólogas o los transgenes que codifican las moléculas terapéuticas de interés pueden estar insertadas en los vectores rAAV de la invención para el tratamiento de 15 enfermedades de almacenamiento lisosomal.

La enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (GSD II; enfermedad de Pompe; deficiencia de maltasa ácida) está causada por deficiencia de la enzima lisosomal α -glucosidasa ácida (maltasa ácida). Las formas clínicas se 20 distinguen: infantil, juvenil y adulta. GSD II infantil tiene su aparición poco después del nacimiento y presenta debilidad muscular progresiva e insuficiencia cardíaca. Esta variante clínica es mortal en los dos primeros años de vida. Los síntomas en pacientes adultos y juveniles se dan después con los años, y los músculos esqueléticos y las neuronas están principalmente implicados. Los pacientes finalmente mueren debido a insuficiencia respiratoria. Los pacientes excepcionalmente pueden sobrevivir durante más de seis décadas. Hay una buena correlación entre la gravedad de la enfermedad y la actividad residual de la α -glucosidasa ácida, siendo la actividad del 10-20 % de lo normal en la 25 aparición tardía y menos del 2 % en las formas de aparición temprana de la enfermedad.

La enfermedad de Pompe es un error congénito del metabolismo con deficiencia de la enzima degradante del glucógeno lisosomal la α -glucosidasa ácida (GAA), lo cual a la larga da como resultado acumulación de glucógeno en 30 todos los tejidos, especialmente en el músculo estriado. Históricamente, la debilidad muscular ha sido vista como el principal contribuidor a la deficiencia respiratoria en la población de pacientes, aún otros mecanismos no han sido investigados. Para evaluar más los mecanismos contribuyentes de la insuficiencia respiratoria, se usó un modelo animal de la enfermedad de Pompe, el modelo de ratón $Gaa^{-/-}$. La ventilación se cuantificó en ratones $Gaa^{-/-}$ y control durante la respiración tranquila y la hipercapnia. Todas las variables de la ventilación se atenuaron en ratones $Gaa^{-/-}$ a los 6, 12 y >21 meses de vida y se acompañaron de contenido de glucógeno elevado de la médula espinal cervical 35 (C_3 - C_5). Los ratones transgénicos que solamente expresan Gaa en el músculo esquelético tenían ventilación por minuto similar a $Gaa^{-/-}$, aunque la función muscular diafragmática era normal, demostrando que un mecanismo distinto de la disfunción muscular estaba contribuyendo a las deficiencias de ventilación. La amplitud de ráfaga respiratoria frénica eferente (mV) era menor en ratones $Gaa^{-/-}$, ($5,2 \pm 1,2$ mV) en comparación con los controles ($49,7 \pm 13,9$ mV) con niveles de P_aCO_2 similares ($53,1 \pm 1,2$ frente a $52,2 \pm 1,4$ mmHg). Los datos indican que el control neural de la 40 ventilación es deficiente en la enfermedad de Pompe y respaldan las siguientes conclusiones: 1) Los ratones $Gaa^{-/-}$ recapitulan los déficits respiratorios de la GSDII clínica, 2) la acumulación de glucógeno espinal puede reducir la respuesta motora, y 3) el control neural respiratorio puede estar reducido en GSDII.

Las formas infantiles de Pompe tienen un rápido desarrollo de cardiomiopatía y muestra miopatía y neuropatía que 45 conducen a muerte generalmente en el primer año de vida. Usando tinción con reactivo de ácido peryódico-Schiff (PAS) para valorar las secciones de diafragma en ratones, se examina la progresión de la deposición de glucógeno en animales $Gaa^{-/-}$. A los 12 meses de vida depósitos de glucógeno generalizados y difusos son aparentes en las secciones del diafragma de los animales $Gaa^{-/-}$. No solamente hay un descenso en las propiedades contráctiles diafragmáticas en los animales $Gaa^{-/-}$, también hay un empeoramiento progresivo de la función contráctil con la edad. 50 Las mediciones de fuerza frecuencia *in vitro* ilustran una pérdida progresiva de la función contráctil en ratones $Gaa^{-/-}$ a los 3, 6 y 12 meses de vida. La deficiencia de GAA conduce a aclaramiento de glucógeno ineficiente, conduciendo a una alteración de la morfología celular y la función. Las biopsias de los pacientes de Pompe también muestran vacuolización, acumulación de glucógeno lisosomal y consecuentes debilidades musculares respiratorias.

Además, el efecto de acumulación de glucógeno dentro del sistema nervioso central y su efecto sobre la función del 55 músculo esquelético se han descubierto recientemente. Los presentes inventores han detectado básicamente deposición de glucógeno dentro de la médula espinal de ratón $Gaa^{-/-}$. Específicamente, la tinción con PAS muestra el grado y la localización del glucógeno en la neurona motora en las secciones transversales de la médula espinal. La neurona motora parece estar hinchada en algunos casos y varía en el grado a través de la sección. Los registros del nervio frénico en animales tipo silvestre y $Gaa^{-/-}$ muestran discrepancias obvias en el nivel de la amplitud de ráfaga tras el reto hipercápnico. Los inventores también descubrieron que un ratón con GAA específica a músculo (GAA expresada en el músculo esquelético pero no en el SNC) aún mostró déficits respiratorios funcionales durante las mediciones de la pletismografía. Los resultados indican disfunción respiratoria mediada por el SNC en animales $Gaa^{-/-}$ y en pacientes de Pompe. 65

Una característica notable de la enfermedad de Pompe se da en el modelo animal es la cifosis severa como un

resultado de la miopatía esquelética drástica. Los animales $Gaa^{-/-}$ desarrollan cifosis severa a aproximadamente 9-12 meses de vida. Se ha descrito el desarrollo de la neutropenia en individuos afectados por Pompe y esto es aparente en el modelo animal en el que la debilidad muscular finalmente afecta a la ingesta de nutrientes. Los ratones $Gaa^{-/-}$ tratados con AAV-CMV-GAA no desarrollan cifosis. Con la conservación de la masa del músculo esquelético y la resistencia, los animales tratados son capaces de mantener ingesta nutricional adecuada y por lo tanto similar a los ratones tipo silvestre.

El modelo de ratón $Gaa^{-/-}$ muestra la patología progresiva asociada al almacenamiento de glucógeno en el SNC y el músculo esquelético. Los presentes inventores han informado del papel específico de la contribución del SNC a la disfunción respiratoria en el modelo murino de la enfermedad de Pompe. En otros trastornos neuromusculares, las adaptaciones en la NMJ y la neurona motora se dan como resultado de las anomalías del SNC o el músculo esquelético. Se informa que la fatiga es evidente en pacientes de Pompe de aparición tardía y puede estar causada por deficiencias que son neural-basadas pero para la mayoría permanecen centradas alrededor de los defectos del músculo esquelético.

De conformidad con la presente invención, se extrajeron los nervios ciáticos de animales tipo silvestre y $Gaa^{-/-}$ de 18 meses de vida. Como se muestra en la Figura 38, las secciones transversales del nervio de animales $Gaa^{-/-}$ parecen variar en la cantidad y el espesor de la mielina, el diámetro o axones, y muestran un incremento en la cantidad de la matriz extracelular. Además, las secciones longitudinales del nervio ciático de animales $Gaa^{-/-}$ muestran un incremento en la tinción nuclear, acusando diferenciación y proliferación de células Schwann (Figura 39). Los patrones de tinción de las muestras del nervio ciático en la enfermedad de Pompe también se observan en enfermedades neuromusculares tradicionales tales como esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal, esclerosis múltiple, enfermedad de almacenamiento de glucógeno Tipo 1a, distrofia muscular de cintura y extremidades, síndrome de Barth, y miastenia grave.

La presente fatiga en pacientes con enfermedades neuromusculares podría ser debida a deficiencias en el acoplamiento E-C y otros mecanismos. Tras la comparación de la unión neuromuscular en las secciones longitudinales de las preparaciones de sóleo y diafragma completo (Figura 40), los presentes inventores indicaron cambios bruscos en la asociación de la unión neuromuscular. La incorporación de las preparaciones de diafragma completo proporcionan una imagen en profundidad del estado general de las uniones neuromusculares. Las preparaciones del diafragma de animales $Gaa^{-/-}$ muestran una distorsión avanzada y clara de las uniones en comparación con el diafragma de tipo silvestre.

La enfermedad de Gaucher es un trastorno de almacenamiento lisosomal recesivo autosómico caracterizado por una deficiencia de la enzima lisosomal, glucocerebrosidasa ("GCR"), la cual hidroliza el glicolípido glucocerebrósido. En la enfermedad de Gaucher, la deficiencia de la enzima degradante causa el glicolípido glucocerebrósido, el cual principalmente surge de la degradación de glucoesfingolípidos de las membranas de glóbulos blancos y glóbulos rojos senescentes, para acumularse en grandes cantidades en el lisosoma de fagocitos, principalmente en el hígado, el bazo, la médula ósea. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad incluyen esplenomegalia, hepatomegalia, trastornos esqueléticos, trombocitopenia, y anemia. Por ejemplo, véase el documento de Patente de los Estados Unidos N.º 6.451.600.

La enfermedad de Tay-Sachs es un trastorno hereditario mortal del metabolismo lipídico caracterizado especialmente en el tejido del SNC debido a la deficiencia de la isozima A (ácida) de β -hexosaminidasa. Las mutaciones en el gen HEXA, el cual codifica la subunidad α de β -hexosaminidasa, causan la deficiencia de la isozima A. La enfermedad de Tay-Sachs es un prototipo de un grupo de trastornos, la gangliosidosis GM2, caracterizada por degradación defectuosa de gangliósido GM2. El gangliósido GM2 (gangliósido monosialitado 2) se acumula en las neuronas comenzando en el feto. La gangliosidosis GM1 está causada por una deficiencia de β -galactosidasa, lo cual da como resultado almacenamiento lisosomal de gangliósido GM1 (gangliósido monosialitado 1). La enfermedad de Sandhoff resulta de una deficiencia de tanto isozima A como B (básica) de β -hexosaminidasa. Las mutaciones en el gen de HEXB, el cual codifica la subunidad β de β -hexosaminidasa, causan la deficiencia de isozima B.

Otra LSD resulta de una deficiencia genética de la escisión de carbohidrato, enzima lisosomal α -L-iduronidasa, la cual causa mucopolisacaridosis I (MPS I) (E. F. Neufeld and J. Muenzer, 1989; la patente de los Estados Unidos N.º 6.426.208). Véase también "The mucopolysaccharidoses" en *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly and D. Valle, Eds.), pp. 1565-1587, McGraw-Hill, Nueva York. En una forma grave, MPS I comúnmente se conoce como síndrome de Hurler y está asociado a problemas múltiples tales como el retraso mental, opacidad de la córnea, características faciales embrutecidas, cardiopatía, enfermedad respiratoria, agrandamiento del hígado y el bazo, hernias, y rigidez de articulación. Los pacientes que padecen el síndrome de Hurler normalmente mueren antes de los 10 años. En una forma intermedia conocida como el síndrome de Hurler-Scheie, la función mental generalmente no está gravemente afectada, pero los problemas físicos pueden conducir a muerte en la adolescencia o los veintes. El síndrome de Scheie es la forma más suave de MPS I y generalmente es compatible con una esperanza de vida normal, pero la rigidez de articulación, la opacidad córnea y la enfermedad de la válvula cardíaca causan problemas significativos.

La enfermedad de Fabry es una enfermedad de almacenamiento lisosomal hereditaria ligada a X caracterizada por

síntomas tales como disfunción renal grave, angioceratomas, y anomalías cardiovasculares, incluyendo agrandamiento ventricular e insuficiencia de la válvula mitral (Patente de los Estados Unidos N.º 6.395.884). La enfermedad también afecta al sistema nervioso periférico, causando episodios de angustia, dolor de quemado en las extremidades. La enfermedad de Fabry está causada por una deficiencia de la enzima α -galactosidasa A (α -gal A), lo cual da como resultado un bloqueo del catabolismo de glucoesfingolípidos neutros, y acumulación del sustrato de la enzima, trihexósido de ceramida, dentro de las células y en el torrente sanguíneo. Debido al patrón de herencia ligado a X de la enfermedad, básicamente todos los pacientes de la enfermedad de Fabry son machos. Aunque se han observado unos pocos heterocigotos hembras gravemente afectados, los heterocigotos hembras generalmente son o bien asintomáticos o tiene síntomas relativamente leves gran parte limitados a una característica opacidad de la córnea. Una variante atípica de la enfermedad de Fabry, que presenta baja actividad residual de α -gal A y o bien síntomas muy leves o aparentemente ningún otro síntoma característico de la enfermedad de Fabry, se correlaciona con la hipertrofia ventricular izquierda y enfermedad cardíaca. Se ha especulado que la reducción en α -gal A puede ser la causa de tales anomalías cardíacas.

La enfermedad de I-célula es una enfermedad de almacenamiento lisosomal mortal causada por la ausencia de residuos de manosa-6-fosfato en enzimas lisosomales. La N-acetilglucosamina-1-fosfo-transferasa es necesaria para la generación de la señal M6P sobre las proenzimas lisosomales.

LSD que afectan al sistema nervioso central requieren que la enzima de reemplazo atraviese la BBB. Para conseguir esto, la fuente de la enzima de reemplazo se puede colocar dentro del cerebro del sujeto, de ese modo evitando la BBB. Por tanto, las células progenitoras gliales son vehículos de administración terapéutica ideales debido a su capacidad excepcional para multiplicarse, migrar y diferenciarse en oligodendrocitos y subtipos de astrocitos. Por tanto, Las LSD que afectan el sistema nervioso central se pueden tratar en diversas maneras, incluyendo codificar genéticamente células progenitoras gliales para secretar proenzimas lisosomales, por ejemplo, proenzimas lisosomales, y administrar las células a tejidos dañados y/o reemplazar las células defectuosas.

En otra opción, las composiciones de la presente invención se usan para tratar trastornos neurológicos. Un "trastorno neurológico" se refiere a cualquier enfermedad del sistema nervioso central (SNC) o sistema nervioso periférico (SNP) que está asociada a los defectos de la célula neuronal o glial incluyendo pero sin limitación la pérdida neuronal, degeneración neuronal, desmielinación neuronal, gliosis (es decir, astrogliosis), o acumulación neuronal o extraneuronal de proteínas aberrantes o toxinas (por ejemplo, β -amiloide, o α -sinucleína). El trastorno neurológico puede ser crónico o agudo.

Trastornos neurológicos ilustrativos incluyen pero sin limitación la enfermedad de Gaucher y otras LSD incluyendo la enfermedad de Fabry, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Pompe, y la mucopolisacaridosis; enfermedad de Parkinson; enfermedad de Alzheimer; esclerosis lateral amiotrófica (ALS); esclerosis múltiple (MS); enfermedad de Huntington; ataxia de Fredrich; deterioro cognitivo leve; y trastornos del movimiento (incluyendo ataxia, parálisis cerebral, coreoatetosis, distonía, síndrome de Tourette, kernicterus); trastornos de temblor, leucodistrofias (incluyendo adrenoleucodistrofia, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Canavan, enfermedad de Alexander, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher); lipofuscinosis neuronal ceroida; ataxia telangectasia; y síndrome de Rett. Esta expresión también incluye sucesos cerebrovasculares tales como apoplejía y ataques isquémicos.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, describe un organismo, incluyendo mamíferos tales como primates. Las especies de mamíferos que pueden beneficiarse de los métodos sujetos incluyen, pero sin limitación, simios, chimpancés, orangutanes, seres humanos, monos; y otros animales tales como perros, gatos, caballos, ganado bovino, cerdos, ovejas, cabras, pollos, ratones, ratas, cobayas y hámsteres. Generalmente, el sujeto es un ser humano.

En algunas opciones, los sujetos con un "trastorno neurológico" incluyen sujetos en riesgo de desarrollar un trastorno, enfermedad o afección neurológica y/o sujetos ya diagnosticados con un trastorno, enfermedad o afección neurológica.

La inyección de un vector rAAV (tal como rAAV2/9) que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica GAA puede dar como resultado un descenso en el tamaño del tamaño de AChR en animales $Gaa^{-/-}$; por lo tanto, la administración mediada por rAAV de GAA se puede usar para restaurar o aumentar la transmisión neuromuscular entre el nervio frénico y el diafragma. En una realización, Además de la administración de un vector AAV2/8 que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica GAA, también se pueden coadministrar uno o más inhibidores de acetilcolinesterasa (ACI) por separado o simultáneamente para mejorar la liberación de neurotransmisor en sujetos con enfermedad de Pompe.

Diversos inhibidores de acetilcolinesterasa (ACI) son conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, tetrahidroaminoacridina, donepezilo, galantamina, rivastigmina tacrina, metrifonato, y huperzina-A (véase la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2013/0131110).

Moléculas terapéuticas

Ácidos nucleicos para la modulación de la expresión de GAA

Como ejemplo, GAA se usa para ilustrar la invención. Sin embargo, también se desvela en el presente documento, dependiendo de las enfermedades, que se puede sustituir la molécula terapéutica (*infra*). La transferencia de una proteína GAA funcional en una célula o animal se consigue usando un ácido nucleico que incluye un polinucleótido que codifica la proteína GAA funcional interpuesta entre dos ITR de AAV. La secuencia de polinucleótidos codificante de GAA puede tomar muchas diferentes formas. Por ejemplo, la secuencia puede ser una secuencia de nucleótidos de GAA mamífera nativa tal como una de las secuencias codificantes de GAA de ratón o humana depositadas en Genbank como números de acceso NM_008064, NM_000152, X55080, X55079, M34425 y M34424. La secuencia de nucleótidos codificante de GAA también puede ser una secuencia codificante no nativa que, como resultado de la redundancia y degeneración del código genético, codifica el mismo polipéptido que una secuencia de nucleótidos de GAA mamífera nativa. Otras secuencias de nucleótidos codificantes de GAA dentro de la invención son aquellas que codifican fragmentos, análogos y derivados de una proteína GAA nativa. Tales variantes pueden ser, por ejemplo, una variante alélica de origen natural de un ácido nucleico codificante de GAA nativo, un homólogo de un ácido nucleico codificante de GAA nativo, o una variante de origen natural de ácido nucleico codificante de GAA nativo. Estas variantes tienen una secuencia de nucleótidos que difiere del ácido nucleico codificante de GAA nativo en una o más bases. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de tales variantes puede presentar una delección, adición, o sustitución de uno o más nucleótidos de un ácido nucleico codificante de GAA nativo. Las inserciones de ácido nucleico generalmente son de aproximadamente 1 a 10 nucleótidos contiguos, y las delecciones generalmente son de aproximadamente 1 a 30 nucleótidos contiguos. En la mayoría de las aplicaciones de la invención, el polinucleótido que codifica una GAA básicamente conserva la capacidad de convertir fenilalanina en tirosina.

La secuencia de nucleótidos codificante de GAA también puede ser una que codifica una proteína de fusión a GAA. Tal secuencia se puede producir ligando un primer polinucleótido que codifica una proteína GAA fusionado en el marco con un segundo polinucleótido que codifica otra proteína (por ejemplo, una que codifica un marcador detectable). Los polinucleótidos que codifican tales proteínas de fusión son útiles para la visualización de la expresión del polinucleótido en una célula.

Para facilitar la expresión a largo plazo, el polinucleótido que codifica GAA está interpuesto entre las repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV (por ejemplo, la primera y segunda ITR de AAV). Las ITR de AAV se encuentra en ambos extremos de un genoma de AAV WT, y sirven como el origen y el cebador de la replicación del ADN. Las ITR son requeridas en *cis* para la replicación del ADN de AAV así como para rescatar, o la escisión, de plásmidos procariontes. Las secuencias de ITR de AAV que están contenidas dentro del ácido nucleico se pueden derivar de cualquier serotipo de AAV (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) o se pueden derivar de más de un serotipo. Para su uso en un vector, la primera y segunda ITR deberían incluir al menos las porciones mínimas de una ITR WT o modificadas por ingeniería genética que son necesarias para el empaquetado y la replicación.

Además de las ITR de AAV y el polinucleótido que codifica GAA, los ácidos nucleicos de la invención también pueden incluir una o más secuencias de control de la expresión ligadas al polinucleótido que codifica GAA. Se conocen numerosas de tales secuencias. Aquellas a incluir en los ácidos nucleicos de la invención se pueden seleccionar basándose en su función conocida en otras aplicaciones. Ejemplos de las secuencias de control de expresión incluyen promotores, aisladores, silenciadores, elementos de respuesta, intrones, potenciadores, sitios de iniciación, señales de terminación, y colas pA.

Para conseguir niveles apropiados de GAA, se puede emplear cualquiera de un número de promotores adecuados para su uso en la célula hospedadora seleccionada. Por ejemplo, se pueden usar promotores constitutivos de diferentes resistencias. Los vectores y los plásmidos de expresión de acuerdo con la presente invención pueden incluir uno o más promotores constitutivos, tales como los promotores virales o promotores de genes mamíferos que son generalmente activos en promover la transcripción. Ejemplos de promotores virales constitutivos incluyen promotores del virus del Herpes Simple (HSV), timidina quinasa (TK), virus del sarcoma de Rous (RSV), Virus Simio 40 (SV40), virus de tumor mamario de ratón (MMTV), Ad E1A y de citomegalovirus (CMV). Ejemplos de promotores mamíferos constitutivos incluyen diversos promotores de gen constitutivo (*housekeeping*), ilustrados por el promotor de β -actina. Como se describe en los ejemplos a continuación, se ha probado que el promotor de beta-actina de pollo (CB) es un promotor constitutivo particularmente útil para expresar GAA.

Los promotores inducibles y/o los elementos reguladores también se pueden contemplar para su uso con los ácidos nucleicos de la invención. Ejemplos de promotores inducibles adecuados incluyen aquellos de genes tales como genes de citocromo P450, genes de la proteína de choque térmico, genes de metalotioneina, y genes inducibles por hormona, tales como el promotor del gen de estrógeno. Otro ejemplo de un promotor inducible es el promotor tetVP 16 que responde a tetraciclina.

Promotores útiles de acuerdo con la presente divulgación incluyen también, pero sin limitación, promotores específicos a neurona, tales como promotor de sinapsina I (SYN); promotores de creatina quinasa muscular (MCK); promotores de citomegalovirus (CMV); y promotores de desmina (DES). En una opción, la expresión mediada por AAV de los ácidos nucleicos heterólogos (tales como GAA humana) se pueden conseguir en neuronas por un promotor de Sinapsina o en músculos esqueléticos por un promotor de MCK.

Los promotores específicos a tejido y/o los elementos reguladores son útiles en ciertas opciones desveladas en el presente documento. Ejemplos de tales promotores que se pueden usar con los vectores de expresión desvelados en el presente documento incluyen (1) creatina quinasa, miogenina, cadena pesada de alfa miosina, péptido de cerebro humano y natriurético, específico para células musculares, y (2) albúmina, alfa-1-antitripsina, promotores de proteína central del virus de la hepatitis B, específicos para células del hígado.

En el presente documento también se desvelan métodos y composiciones de los mismos que se pueden usar para corregir o aliviar un defecto génico causado por una proteína de múltiples subunidades. En determinadas situaciones, se puede usar un transgén diferente para codificar cada subunidad de la proteína. Esto puede ser deseable cuando el tamaño del ADN que codifica la subunidad de la proteína es grande, por ejemplo, para una inmunoglobulina o el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas. Para que la célula produzca la proteína de múltiples subunidades, una célula se infectaría con rAAV que expresa cada una de las diferentes subunidades.

Como alternativa, diferentes subunidades de una proteína pueden estar codificadas por el mismo transgén. En este caso, un único transgén incluiría el ADN que codifica cada una de las subunidades, con el ADN para cada subunidad separado por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). El uso de IRES permite la creación de multigén o ARNm policistrónicos. Los elementos IRES pueden evitar el modelo de exploración de ribosomas de la traducción dependiente de cap metilado en 5' y comenzar la traducción en sitios internos. Por ejemplo, se han descrito elementos IRES de la hepatitis C y los miembros de la familia de picornavirus (por ejemplo, polio y encefalomiocarditis), así como un IRES de un ARNm mamífero. Los elementos IRES se pueden ligar a marcos abiertos de lectura heterólogos. En virtud del elemento IRES, cada marco abierto de lectura es accesible a los ribosomas para una traducción eficaz. Por tanto, se pueden expresar múltiples genes de manera eficaz usando un único promotor/potenciador para transcribir un solo mensaje. Esto es particularmente útil cuando el tamaño del ADN que codifica cada una de las subunidades es suficientemente pequeño que el total del ADN que codifica las subunidades y el IRES es no mayor que el tamaño máximo del inserto de ADN que el virus puede abarcar. Por ejemplo, para rAAV, el tamaño de inserto puede ser de no más de aproximadamente 4,8 kilobases; sin embargo, para un adenovirus que carece de todas sus funciones auxiliares, el tamaño del inserto es aproximadamente de 28 kilobases.

Productos génicos útiles incluyen hormonas y factores de crecimiento y diferenciación que incluyen, sin limitación, insulina, glucagón, hormona del crecimiento (GH), hormona paratiroidea (PTH), calcitonina, factor liberador de la hormona del crecimiento (GRF), hormona estimulante tiroidea (TSH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), prolactina, melatonina, vasopresina, β -endorfina, met-enkefalina, leu-enkefalina, factor liberador de prolactina, factor inhibidor de prolactina, hormona liberadora de corticotropina, hormona liberadora de tirotrópina (TRH), hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica (CG), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetinas, angiostatina, endostatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), bFGF2, factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante α (TGF α), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento insulínico I y II (IGF-I e IGF-II), uno cualquiera de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) que comprende TGF β , activinas, inhibinas o cualquiera de las proteínas morfogénicas óseas (BMP) BMP 1 15, una cualquiera de la familia del factor de diferenciación de heregulina/neuregulina/ARIA/neu (NDF) de los factores de crecimiento, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofinas NT-3, NT-4/5 y NT-6, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF), neurtuina, persefina, agrina, una cualquiera de la familia de semaforinas/colapsinas, netrina-1 y netrina-2, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), efrinas, nogina, sonic hedgehog y tirosina hidroxilasa.

Otros productos génicos útiles incluyen proteínas que regulan el sistema inmunitario incluyendo, sin limitación, citoquinas y linfoquinas tales como trombopoyetina (TPO), interleuquinas (IL) IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, y IL-17, proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF), ligando Fas, factores α y β de necrosis tumoral (TNF α y TNF β), interferones (IFN) 1FN- α , IFN- β , y IFN- γ , factor de células madre, ligando flk-2/flt3. Esta invención también abarca productos génicos producidos por el sistema inmunitario. Estos incluyen, sin limitaciones, inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, receptores de linfocitos T, receptores de linfocitos T quiméricos, receptores de linfocitos T monocatenarios, moléculas MHC de clase I y clase II, así como moléculas de MHC modificadas por ingeniería genética incluyendo moléculas de MHC monocatenarias. Productos génicos útiles también incluyen proteínas reguladoras complementarias tales como la proteína del cofactor de membrana (MCP), factor acelerador de la descomposición (DAF), CR1, CR2 y CD59.

Otros productos génicos útiles más incluyen uno cualquiera de los receptores para las hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, linfoquinas, proteínas reguladoras y proteínas del sistema inmunitario. Ejemplos de tales receptores incluyen flt-1, flk-1, TIE-2; la familia de trk de receptores tales como TrkA, MuSK, Eph, receptor de PDGF, receptor del EGF, HER2, receptor de insulina, receptor de IGF-1, la familia de receptores de FGF, los receptores de TGF β , los receptores de interleuquina, los receptores de interferón, los receptores de serotonina, los receptores α -adrenérgicos, los receptores β -adrenérgicos, receptor de GDNF, receptor de neurotrofina p75, entre otros. La

divulgación abarca receptores para proteínas de matriz extracelular, tales como integrinas, contra receptores para las proteínas de unión a transmembrana, tales como moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 y ICAM-4), moléculas de adhesión a célula vasculares (VCAM), y selectinas E-selectina, P-selectina y L-selectina. La divulgación abarca receptores para la regulación del colesterol, incluyendo el receptor de LDL, receptor de HDL, receptor de VLDL, y el receptor basurero (*scavenger*). Esta divulgación abarca los ligandos de apolipoproteína para estos receptores, incluyendo ApoAI, ApoAIV y ApoE. La divulgación también abarca productos génicos tales como la superfamilia del receptor de la hormona esteroidea incluyendo los receptores de glucocorticoide y los receptores de estrógenos, los receptores de vitamina D y otros receptores nucleares. Además, productos génicos útiles incluyen péptidos antimicrobianos tales como defensinas y magininas, factores de transcripción tales como jun, fos, max, mad, factor de respuesta de suero (SRF), AP-1, AP-2, myb, MRG1, CREM, Alx4, FREAC1, NF-KB, miembros de la familia de cremallera de leucina, proteínas dedo de zinc C₂H₄, incluyendo Zif268, EGR1, EGR2, proteínas de dedo de zinc C6, incluyendo los receptores de glucocorticoide y estrógeno, proteínas dominio POU, ilustradas por Pit 1, proteínas de homeodominio, incluyendo HOX-1, proteínas de hélice-bucle-hélice básicas, incluyendo myc, MyoD y miogenina, proteínas que contienen caja ETS, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, proteínas de unión a caja CCAAT, factor de regulación de interferón 1 (IRF-1), proteína de tumor deWilms, proteína de unión a ETS, STAT, proteínas de unión a caja GATA, por ejemplo, GATA-3 y la familia forkhead de proteínas de hélice alada.

Otros productos génicos útiles incluyen carbamoi sintetasa I, ornitina transcarbamilasa, arginosuccinato sintetasa, arginosuccinato liasa, arginasa, fumarilacetoacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, porfobilinógeno desaminasa, factor VII, factor VIII, factor IX, factor II, factor V, factor X, factor XII, factor XI, factor de von Willebrand, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y reductasa, hemo oxigenasa, enzima convertidora de angiotensina, endotelina-1, un péptido natriurético atrial, pro-uroquinasa, uroquinasa, activador de plasminógeno, cofactor II de la heparina, proteína C activada (Factor V Leiden), Proteína C, antitrombina, cistatión beta-sintasa, cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, albúmina, isovaleril-CoA deshidrogenasa, propionil CoA carboxilasa, metil malonil CoA mutasa, glutaril CoA deshidrogenasa, insulina, beta-glucosidasa, piruvato carboxilasa, fosforilasa hepática, fosforilasa quinasa, glicina descarboxilasa (también referida como P-proteína), proteína H, proteína T, proteína de la enfermedad de Menkes, supresores tumorales (por ejemplo, p53), regulador de la transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), el producto del gen de la enfermedad de Wilson PWD, Cu/Zn superóxido dismutasa, aminoácido aromático descarboxilasa, tirosina hidroxilasa, acetilcolina sintetasa, prohormona convertidasas, inhibidores de proteasas, lactasa, lipasa, tripsina, enzimas gastrointestinales incluyendo quimotripsina y tripsina, adenosina desaminasa, α 1 antitripsina, inhibidor tisular de metaloproteinas (TIMP), GLUT-1, GLUT-2, trehalosa fosfato sintasa, hexoquinasas I, II y III, glucoquinasa, una cualquiera o más de las cadenas individuales o tipos de colágeno, elastina, fibronectina, trombospondina, vitronectina y tenascina, y genes suicidas tales como timidina quinasa y citosina deaminasa. Otras proteínas útiles incluyen aquellas implicadas en trastornos de almacenamiento lisosomal, incluyendo β -glucosidasa ácida, α -galactosidasa A, α -1-iduronidasa, iduronato sulfatasa, α -glucosidasa ácida lisosomal, esfingomielinasa, hexosaminidasa A, hexosaminidasa A y B, arilsulfatasa A, lipasa ácida, ceramidasa ácida, galactosilceramidasa, α -fucosidasa, α -, β -manosidosis, aspartilglucosaminidasa, neuramidasa, galactosilceramidasa, heparan-N-sulfatasa, N-acetil- α -glucosaminidasa, Acetil-CoA: α -glucosaminidina N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, arilsulfatasa B, β -glucuronidasa y hexosaminidasas A y B.

Otros transgenes útiles incluyen polipéptidos de origen no natural, tales como polipéptidos quiméricos o híbridos o polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de no origen natural que contienen inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, las inmunoglobulinas modificadas por ingeniería genética de cadena sencilla podrían ser útiles en determinados pacientes inmunocomprometidos. Otras proteínas útiles incluyen receptores truncados que carecen de su dominio de transmembrana y citoplasmático. Estos receptores truncados se pueden usar para antagonizar la función de sus respectivos ligandos uniéndose a ellos sin señalización concomitante por el receptor. Otros tipos de secuencias génicas de origen no natural incluyen moléculas sentido y antisentido y ácidos nucleicos catalíticos, tales como ribozimas, que se podrían usar para modular la expresión de un gen.

Vectores víricos

Las composiciones como se describen en el presente documento (por ejemplo, las composiciones que incluyen un vector viral que codifica GAA) se pueden administrar a un sujeto mamífero mediante cualquier técnica adecuada. Diversas técnicas que usan vectores virales para la introducción de un gen GAA dentro de las células se proporcionan de acuerdo con las composiciones y los métodos descritos en el presente documento. Los virus son vehículos desarrollados que administran de manera eficaz sus genes dentro de las células hospedadoras y por lo tanto son sistemas de vector deseables para la administración de genes terapéuticos. Los vectores virales preferidos presentan baja toxicidad a la célula hospedadora y producen cantidades terapéuticas de la proteína GAA (por ejemplo, de una manera específica a tejido). Los métodos de vector viral y los protocolos se revisan en Kay *et al.*, *Nature Medicine*, 7:33-40, 2001.

Aunque los experimentos descritos a continuación implican rAAV, se puede usar cualquier agente viral adecuado. Se conocen muchos vectores virales en la técnica para la administración de genes a sujeto mamífero y, a continuación, se da una lista no exhaustiva de ejemplos. Se discuten métodos para el uso de adenovirus recombinantes como

vectores para terapia génica, por ejemplo, en W.C. Russell, *J. Gen. Virol.*, 81:2573-2604, 2000; y Bramson *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6:590-595, 1995. Se discuten métodos para el uso del virus del Herpes Simple, por ejemplo, en Cotter and Robertson, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1:633-644, 1999. También se pueden usar vectores lentivirales defectuosos de replicación, incluyendo VIH. Se discuten métodos para el uso de vectores lentivirales, por ejemplo, en Vigna and Naldini, *J. Gene Med.*, 5:308-316, 2000 y Miyoshi *et al.*, *J. Virol.*, 72:8150-8157, 1998. También se pueden usar vectores retrovirales, incluyendo vectores basados en el virus de la leucemia murina. Se discuten métodos para el uso de vectores basados en retrovirus, por ejemplo, en Hu and Pathak, *Pharmacol. Rev.* 52:493-511, 2000 y Fong *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 17:1-60, 2000. Otros vectores virales que pueden encontrar uso incluyen Alfavirus, incluyendo el virus del bosque de Semliki y el virus de Sindbis. Los vectores virales híbridos se pueden usar para administrar un gen *gaa* a un tejido diana (por ejemplo, músculo, sistema nervioso central). Técnicas convencionales para la construcción de vectores híbridos son bien conocidas por los expertos en la técnica. Tales técnicas se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor, NY), o cualquier número de los manuales de laboratorio que discuten la tecnología de ADN recombinante.

Vector rAAV y viriones

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de las composiciones y los métodos descritos en el presente documento se incorporan dentro de vectores rAAV y/o viriones para facilitar su introducción en una célula. Los vectores rAAV útiles en la invención son construcciones de ácido nucleico recombinantes que incluyen (1) una secuencia heteróloga a expresar (por ejemplo, un polinucleótido que codifica una proteína GAA) y (2) secuencias virales que facilitan la integración y la expresión de los genes heterólogos. Las secuencias virales pueden incluir aquellas secuencias de AAV que se requieren en *cis* para la replicación y el empaquetado (por ejemplo, ITR funcionales) del ADN dentro de un virión. En las aplicaciones típicas, el gen heterólogo codifica GAA, el cual es útil para corregir una deficiencia de GAA en una célula. Tales vectores rAAV también pueden contener marcadores o genes indicadores. Los vectores rAAV útiles tienen uno o más de los genes WT de AAV delecionados en todo o en parte, pero conservan las secuencias de flanco funcional ITR. También desvelado en el presente documento, las ITR de AAV pueden ser cualquier serotipo (por ejemplo, derivado de serotipo 2) adecuado para una aplicación particular. Se discuten métodos para el uso de vectores rAAV, por ejemplo, en Tal, *J. Biomed. Sci.*, 7:279-291, 2000; y Monahan and Samulski, *Gene Delivery*, 7:24-30, 2000.

Los ácidos nucleicos y los vectores de la invención generalmente se incorporan en un virión rAAV para facilitar la introducción del ácido nucleico o vector en una célula. Las proteínas de la cápside de AAV componen el exterior, parte de no ácido nucleico del virión y se codifican por el gen *cap* de AAV. El gen *cap* codifica tres proteínas de la cubierta viral, VP1, VP2 y VP3, las cuales son requeridas para el ensamblaje del virión. Se ha descrito la construcción de viriones rAAV. Véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos N.º 5.173.414, 5.139.941, 5.863.541 y 5.869.305, 6.057.152, 6.376.237; Rabinowitz *et al.*, *J. Virol.*, 76:791-801, 2002; y Bowles *et al.*, *J. Virol.*, 77:423-432, 2003.

Los viriones rAAV desvelados en el presente documento incluyen aquellos derivados de un número de serotipos de AAV incluyendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9. Para guiar a las células musculares, los viriones rAAV que incluyen al menos un serotipo 1 de proteína de cápside pueden ser particularmente útiles ya que los experimentos informados en el presente documento muestran que inducen expresión celular de GAA significativamente mayor que los viriones rAAV que tienen únicamente cápsides serotipo 2. Los viriones rAAV que incluyen al menos una proteína de cápside serotipo 6 también pueden ser útiles, ya que las proteínas de cápside serotipo 6 son estructuralmente similares a las proteínas de cápside serotipo 1, y por tanto se espera que también den como resultado alta expresión de GAA en células musculares. El serotipo 9 de rAAV también se ha encontrado que es un transductor eficaz de las células musculares. Las construcciones y uso de los vectores de AAV y las proteínas de AAV de diferentes serotipos se discuten en Chao *et al.*, *Mol. Ther.* 2:619-623, 2000; Davidson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:3428-3432, 2000; Xiao *et al.*, *J. Virol.* 72:2224-2232, 1998; Halbert *et al.*, *J. Virol.* 74:1524-1532, 2000; Halbert *et al.*, *J. Virol.* 75:6615-6624, 2001; y Auricchio *et al.*, *Hum. Molec. Genet.*, 10:3075-3081, 2001.

También útiles en la invención son los rAAV pseudotipificados. Los vectores pseudotipificados desvelados en el presente documento incluyen vectores AAV de un serotipo dado (por ejemplo, AAV2) pseudotipificado con un gen de cápside derivado de un serotipo distinto del serotipo dado (por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 etc.). Por ejemplo, un vector pseudotipificado representativo de la invención es un vector rAAV2 que codifica GAA pseudotipificada con un gen de cápside derivado de AAV de un serotipo diferente (por ejemplo, AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9). La presente divulgación utilizó un pseudotipo AAV2/8. En una opción, se observó que la administración del transgén LacZ usando la vía de administración IV y cápside pseudotipo rAAV2/9 da como resultado aproximadamente niveles 200 veces mayores de expresión en tejido cardíaco que una dosis idéntica con rAAV2/1. Experimentos adicionales indicaron que la administración IV de un transgén usando rAAV2/9 a ratones adultos también da como resultado transducción de tejido cardíaco. Las técnicas que implican la construcción y el uso de viriones rAAV pseudotipificados son conocidas en la técnica y se describen en Duan *et al.*, *J. Virol.*, 75:7662-7671, 2001; Halbert *et al.*, *J. Virol.*, 74:1524-1532, 2000; Zolotukhin *et al.*, *Methods*, 28:158-167, 2002; y Auricchio *et al.*, *Hum. Molec. Genet.*, 10:3075-3081, 2001.

Los viriones AAV que tienen mutaciones dentro de la cápside del virión se pueden usar para infectar tipos celulares particulares de manera más eficaz que los viriones de cápside no mutada. Por ejemplo, los mutantes de AAV adecuados pueden tener mutaciones de inserción de ligando para facilitar la modificación génica de AAV para tipos celulares específicos. La construcción y la caracterización de mutantes de cápside de AAV incluyendo los mutantes de inserción, los mutantes de cribado de alanina, y los mutantes de epítipo tag se describe en Wu *et al.*, *J. Virol.*, 74:8635-45, 2000. Otros viriones rAAV que se pueden usar en métodos de la invención incluyen aquellos híbridos de cápside que son generados mediante desarrollo molecular de virus así como mediante barajado de exones. Véase Sambrook *et al.*, *Nat. Genet.*, 25:436-439, 2000; y Kolman and Stemmer, *Nat. Biotechnol.*, 19:423-428, 2001.

10 *Modulación de los niveles de GAA en una célula*

Los ácidos nucleicos, vectores, y viriones anteriormente descritos se pueden usar para modular los niveles de GAA en una célula. El método incluye la etapa de administrar a la célula una composición que incluye un ácido nucleico que incluye un polinucleótido que codifica GAA interpuesto entre dos ITR de AAV. La célula puede ser de cualquier animal dentro de la cual se pueda administrar un ácido nucleico de la invención. Células mamíferas (por ejemplo, seres humanos, perros, gatos, cerdos, ovejas, ratones, ratas, conejos, ganado bovino, cabras, etc.) de un sujeto con deficiencia de GAA son células diana típicas para su uso en la invención.

En algunas opciones, la célula es una célula miocárdica, por ejemplo, un miocardiocito. En otras opciones, la célula es una neurona (por ejemplo, nervio motor frénico).

Incremento de la función de neurona motora (por ejemplo, neurona frénica) en un mamífero

Los vectores rAAV, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para incrementar la actividad del nervio frénico en un mamífero que tiene enfermedad de Pompe y/o insuficientes niveles de GAA. Por ejemplo, rAAV que codifica GAA se puede administrar al sistema nervioso central (por ejemplo, neuronas). En otro ejemplo, el transporte retrógrado de un vector rAAV que codifica GAA del diafragma (u otro músculo) al nervio frénico u otras neuronas motoras puede dar como resultado corrección bioquímica y fisiológica de la enfermedad de Pompe. Estos mismos principios se podrían aplicar a otra enfermedad neurodegenerativa.

30 *Incremento de la actividad de GAA en un sujeto*

Los ácidos nucleicos, los vectores, y los viriones descritos anteriormente se pueden usar para modular los niveles de GAA sujeto animal. El método incluye la etapa de proporción de un sujeto animal y administrar al sujeto animal de una composición que incluye un ácido nucleico que incluye un polinucleótido que codifica GAA interpuesto entre dos ITR de AAV. El sujeto puede ser cualquier animal dentro del cual se pueda administrar un ácido nucleico de la invención. Por ejemplo, mamíferos (por ejemplo, seres humanos, perros, gatos, cerdos, ovejas, ratones, ratas, conejos, ganado bovino, cabras, etc.) son sujetos adecuados. Las composiciones de la invención son particularmente aplicables a sujetos animales deficientes en GAA.

Las composiciones anteriormente descritas se pueden administrar a animales incluyendo seres humanos en cualquier formulación adecuada mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, los viriones rAAV (es decir, partículas) se pueden introducir directamente en un animal, incluyendo inyección intravenosa (IV), inyección intraperitoneal (IP), o inyección *in situ* en el tejido diana (por ejemplo, músculo). Por ejemplo, se pueden usar una jeringa y aguja convencional para inyectar una suspensión de virión rAAV en un animal. Dependiendo de la vía de administración deseada, la inyección puede ser *in situ* (es decir, a un tejido o localización sobre un tejido particular), IM, IV, IP o por otra vía parenteral. La administración parenteral de viriones por inyección se puede realizar, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar tales formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, los viriones rAAV pueden estar en forma de polvo (por ejemplo, liofilizado) para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril apirógena, antes de su uso.

Para facilitar la administración de viriones rAAV a un animal, los viriones de la invención se pueden mezclar con un portador o excipiente. Los portadores y excipientes que se podrían usar incluyen solución salina (especialmente solución salina apirógena esterilizada) tampones salinos (por ejemplo, tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato y tampón de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, albúmina de suero), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Los portadores y excipientes de grado USP son particularmente útiles para la administración de viriones a sujetos humanos. Los métodos para producir tales formulaciones son bien conocidos y se encuentran en, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Además de las formulaciones previamente descritas, los viriones también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por un implante (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección IM. Por tanto, por ejemplo, los viriones se pueden formular con materiales

poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles.

5 De forma similar, los vectores rAAV se pueden administrar a un sujeto animal usando diversos métodos. Los vectores rAAV se pueden introducir directamente en un animal por administración intraperitoneal (inyección IP), así como administración parenteral (por ejemplo, inyección IV, inyección IM, e inyección *in situ* en el tejido diana). Los métodos y formulaciones para la administración parenteral anteriormente descritos para los viriones rAAV se pueden usar para administrar vectores rAAV.

10 En el presente documento también se desvela la administración *ex vivo* de células transducidas con viriones rAAV. La administración génica *ex vivo* se puede usar para trasplantar células hospedadoras transducidas con rAAV de nuevo en el hospedador. De forma similar, la terapia con célula madre *ex vivo* (por ejemplo, célula madre mesenquimática) se puede usar para trasplantar células hospedadoras transducidas por vector rAAV de nuevo en el hospedador. Un protocolo *ex vivo* adecuado puede incluir varias etapas. Un segmento del tejido diana (por ejemplo, tejido de músculo, hígado) se puede extraer del hospedador y los viriones rAAV se pueden usar para someter a transducción un ácido nucleico codificante de GAA en las células hospedadoras. Estas células genéticamente modificadas, a continuación, se pueden trasplantar de nuevo en el hospedador. Se pueden usar varias estrategias para la reintroducción de las células en el hospedador, incluyendo inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, o inyección *in situ* en el tejido diana. La microencapsulación de células transducidas o infectadas con rAAV modificado *ex vivo* es otra técnica que se puede usar dentro de la invención. Se puede usar trasplante de célula autóloga y alógena de acuerdo con la invención.

Dosis eficaces

25 Las composiciones anteriormente descritas generalmente se administran a un mamífero en una cantidad eficaz, es decir, una cantidad capaz de producir un resultado deseable en un sujeto tratado (por ejemplo, incremento de la actividad de GAA WT en el sujeto). Tal cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar como se describe a continuación.

30 Se pueden determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones utilizadas en los métodos de la invención mediante procedimientos farmacéuticos convencionales, usando o bien células en cultivo o animales experimentales para determinar la DL₅₀ (la dosis letal a 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación de DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren aquellas composiciones que presentan índices terapéuticos grandes. Aunque se pueden usar aquellas que presentan efectos secundarios tóxicos, se debería tener cuidado al diseñar un sistema de administración que minimice el daño potencial de tales efectos secundarios. La dosis de las composiciones descritas en el presente documento se encuentra generalmente dentro del intervalo que incluye una DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada.

40 Como se sabe en la técnica médica y veterinaria, la dosis para un animal cualquiera depende de diversos factores, incluyendo el tamaño del sujeto, el área superficial corporal, la edad, la composición particular a administrar, el tiempo y la vía de administración, el estado general de salud y otros fármacos que se estén administrando concurrentemente. Se espera que una dosis apropiada para la administración intravenosa de partículas estaría en el intervalo de aproximadamente 10¹² - 10¹⁵ partículas. Para un ser humano de 70 kg, actualmente se cree que una inyección de 1 a 45 10 ml (por ejemplo, 5 ml) de 10¹² - 10¹⁵ partículas es la dosis apropiada.

Las realizaciones de las composiciones inventivas se ilustran en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan con propósitos ilustrativos y no se consideran limitaciones sobre el ámbito de las composiciones y los métodos inventivos.

50

Ejemplos

Materiales y métodos

55 *Producción de virus*

Se generaron vectores AAV recombinantes, se purificaron, y se midió la concentración en el "University of Florida Powell Gene Therapy Center Vector Core Laboratory" como se ha descrito previamente (Zolotukhin, S, *et al.*, *Methods*, 28:158-167, 2002).

60

Inyección intravenosa

65 Todos los procedimientos animales se realizaron de acuerdo con las directrices del "University of Florida Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)" (ratones) o el "University of California (UC) Davis IACUC" (monos; véase a continuación). Se inyectaron cachorros de ratón de un día de vida por la vena temporal superficial como se ha descrito previamente (Sands MS *et al.*, *Lab. Anim. Sci.*, 49:328-330, 1999). En resumen, los ratones se anestesiaron

por hipotermia inducida. Se usó una jeringa de tuberculina de 29,5 de calibre para administrar el vector en un volumen total de 35 µl directamente en la vena temporal izquierda. Se inyectaron ratones adultos de dos meses de vida por la vena yugular. Los ratones primero se anestesiaron usando una mezcla de isoflurano al 1,5 % y O₂ (1 a 2 l). Se realizó una incisión de 0,5 cm para exponer la vena yugular. A continuación, se usaron una aguja de 29 de calibre y jeringa para administrar virus en un volumen de 150 µl. Se obtuvo hemostasis; se aproximó a la piel y se aseguró con Vetbond (3M, St. Paul, Minn).

Detección de β-galactosidasa

Los lisados de tejido se ensayaron para la actividad de la enzima β-galactosidasa usando el sistema de ensayo de gen indicador por quimioluminiscencia Galacto Star (Tropix Inc., Bedford, Mass). Las concentraciones de proteína para los lisados de tejido se determinaron usando el kit de ensayo de proteína DC Bio-Rad (Hercules, Calif.).

Análisis por ECG

Los registros gráficos de ECG se adquirieron usando electrodos de aguja subcutánea convencionales (MLA1203 1,5 mm Pin 5; AD Instruments) en el hombro derecho, la extremidad anterior derecha, la extremidad anterior izquierda, la extremidad posterior izquierda, y la cola y un Instrumento Power Laboratory Dual BioAmp. Se analizaron cinco minutos de los registros gráficos de ECG de cada animal usando el programa informático ADInstrument's Chart®.

Estudios de primates no humanos

Se condujeron estudios con monos en el "Center for Fetal Monkey Gene Transfer for Heart, Lung, and Blood Diseases" localizado en el "California National Primate Research Center (UC Davis)". Se hizo un seguimiento de las monas rhesus embarazadas (n = 6) durante el embarazo por ultrasonido, y los recién nacidos se dieron a luz por cesárea a término usando técnicas establecidas. A poco menos de una hora de nacimiento, los recién nacidos se inyectaron intravenosamente con vector (aproximadamente 1 ml) por un vaso periférico. Los bebés recibieron o bien rAAV2/1-CMV-hGaa (n = 3) o rAAV2/9-CMV-hGaa (n = 3). Los bebés se criaron en guarderías y se hizo un seguimiento durante 6 meses y, luego se sometieron a eutanasia por una sobredosis de pentobarbital y las extracciones del tejido completo se realizaron (una por grupo) usando métodos establecidos. Los especímenes de los animales control de una edad comparable se pusieron a disposición a través del "Center for Fetal Monkey Gene Transfer". La actividad de GAA se midió de tejidos extraídos 6 meses después de la inyección y la actividad de base de los controles no inyectados se restó para obtener los resultados en la FIG. 5A. Se extrajo el ADN genómico (ADNg) de tejidos de acuerdo con el protocolo del fabricante (Qiagen; kit de tejido DNeasy). Las concentraciones de ADN resultantes del procedimiento de extracción se determinaron usando un biofotómetro de Eppendorf (Modelo 6131; Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se usó un microgramo de ADNg extraído en todas las PCR cuantitativas de acuerdo con un protocolo previamente usado (Song, S, *et al.*, *Mol. Ther.*, 6:329-335, 2002) y las condiciones de reacción (recomendadas por Perkin-Elmer/Applied Biosystems) incluían 50 ciclos de 94,8 °C durante 40 segundos, 37,8 °C durante 2 minutos, 55,8 °C durante 4 minutos, y 68,8 °C durante 30 segundos. Los pares primarios se diseñaron para el promotor de CMV como se describe (Donsante A, *et al.*, *Gene Ther.*, 8:1343-1346, 2001) y las curvas convencionales establecidas por concentraciones aumentadas de un ADN plasmídico que contiene el mismo promotor. Las muestras de ADN se ensayaron por triplicado. La tercera réplica se complementó con CBATDNA a una relación de 100 copias/µg de ADNg. Si se detectaban al menos 40 copias del ADN aumentado, la muestra de ADN se consideraba aceptable para informar de copias de ADN de vector.

EJEMPLO 1: EL VIRUS ADENOASOCIADO RECOMBINANTE CONDUCE A TRANSDUCCIÓN CARDIACA PREFERENCIAL *IN VIVO*.

Se comparó rAAV2/1 directamente con dos serotipos menos caracterizados (rAAV2/8 y rAAV2/9) en sus capacidades de someter a transducción el miocardio *in vivo*. Estos vectores recombinantes o pseudotipificados se crean insertando un transgén de interés flanqueado por las repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV2 en la cápside de otro serotipo. Se administraron 1×10^{11} genomas de vector (gv) de cada uno de los 3 serotipos diferentes (rAAV2/1, rAAV2/8, o rAAV2/9) que portan la construcción CMV-lacZ (lacZ citoplasmática) por la vía venosa sistémica a ratones de 1 día de vida (5 neonatos por grupo) en un volumen de inyección de 35 µl (FIG. 1A-FIG. 1D). Los corazones de los ratones inyectados se extrajeron a las 4 semanas después de la inyección y se realizó tinción con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosida (X-gal) sobre criosecciones congeladas para visualizar el alcance de la biodistribución de la expresión de β-galactosidasa a través del miocardio (FIG. 1A-FIG. 1C). Además, se determinó la actividad de la β-galactosidasa para cuantificar la expresión de LacZ (FIG. 1D). También se realizó la técnica de PCR cuantitativa con verde SYBR sobre estos corazones para comparar las cantidades relativas de los genomas del vector presentes. Se encontró que 0,19, 16,12 y 76,95 gv por célula diploide estaban presentes en los corazones de los ratones inyectados con rAAV2/1, rAAV2/8, y rAAV2/9, respectivamente.

Los cálculos para los genomas de vector por célula se determinaron como previamente se ha descrito (Wei JF, *et al.*, *Gene Ther.*, 1:261-268, 1994).

Los resultados muestran que de aquellos serotipos comparados en este trabajo, la administración venosa sistémica

de AAV2/9 da como resultado amplia y uniforme distribución del vector y el producto transgén en el miocardio sin administración cardíaca selectiva. Se demostró que el nivel de expresión de gen da como resultado un nivel 200 veces mayor de expresión que el observado para rAAV2/1. rAAV2/8 proporciona transducción excepcional de miocardio a niveles aproximadamente 20 veces mayores que los obtenidos usando rAAV2/1; sin embargo, también hay transducción significativa de hepatocitos con este serotipo. Las criosecciones teñidas con X-Gal demostraron que tanto rAAV2/8 como rAAV2/9 proporcionan una distribución amplia y uniforme de la expresión de transgén a través del corazón entero. En cambio, aquellos corazones inyectados con rAAV2/1 mostraron mucha menos expresión total. Adicionalmente, se realizó inmunohistoquímica con un anticuerpo de troponina cardíaca (Santa Cruz Biotechnology) y se encontró que las células que expresan β -galactosidasa eran cardiomiocitos.

También, los estudios demostraron que rAAV2/9 sometía a transducción cardiomiocitos de manera más eficaz que los mioblastos *in vitro*. A continuación, se realizó el ensayo de detección de la enzima β -galactosidasa sobre otros tejidos de estos mismos animales para caracterizar la biodistribución de la expresión de LacZ. Se encontró que rAAV2/8 y rAAV2/9 son ambos capaces de transducción de músculo esquelético a algún grado (FIG. 2A). En general, rAAV2/8 tiene la capacidad de proporcionar una biodistribución total amplia y uniforme de la expresión a través del músculo además de al corazón, mientras que la expresión de transgén administrado por rAAV2/9 es mucho mayor en el corazón que en cualquier otro tejido.

El ensayo de β -galactosidasa también se realizó sobre muestras de tejido muscular no cardíaco, no esquelético de estos ratones (FIG. 2B). Estos resultados demostraron que mientras que rAAV2/8 y rAAV2/9 son capaces de someter a transducción los tejidos tales como el cerebro, el pulmón y el riñón, hay menos transducción de bazo e intestino delgado.

Una vez que se estableció que rAAV2/9 mostraba la mayor afinidad natural para miocardio, además se caracterizó *in vivo* la actividad de rAAV2/9. El promotor de CMV se eligió para estos estudios debido a que este casete de expresión era apropiado en tamaño y perfil de expresión en el tejido diana de interés. Se realizó PCR cuantitativa con verde SYBR sobre especímenes de tejido de corazón, hígado, y cuádriceps de ratones que se inyectaron con rAAV2/9 para comparar las cantidades relativas de genomas de vector presentes en estos tejidos. Estos resultados demostraron que había aproximadamente 76,95 gv/célula (genomas de vector por célula diploide) en miocardio y 2,89 gv/célula y 11,47 gv/célula presentes en el hígado y el cuádriceps, respectivamente. La implicación clínica de estos descubrimientos es que incluso cuando se usa una cápside de AAV, la cual muestra una alta afinidad natural para un tejido específico, el uso de un promotor específico a tejido será crítico para asegurar finalmente la expresión de transgén restringida al área de interés.

Se realizaron estudios adicionales para evaluar un ensayo de curso temporal de la expresión de rAAV2/9-CMV-*lacZ* en músculo cardíaco y esquelético. Se inyectaron neonatos de ratón de un día de vida con 5×10^{10} gv, y se extrajeron músculos cardíacos y esqueléticos a 1, 7, 14, 28, y 56 días después de la inyección (FIG. 3A). Los resultados muestran que la aparición de la expresión de transgén en ambos tejidos se dio entre 1 y 7 días tras la administración del vector. La cantidad de expresión en el músculo esquelético incrementó gradualmente durante los primeros 28 días, a continuación, se niveló y se mantuvo a un nivel constante hasta al menos 56 días. La cantidad de expresión de transgén en tejido cardíaco consecuentemente era mayor que en el músculo esquelético y continuó incrementándose continuamente por toda la duración del experimento (56 días).

A continuación, se realizó la PCR cuantitativa con verde SYBR sobre estos tejidos para determinar si el incremento de la expresión de transgén en el tejido cardíaco era atribuible a un incremento en la estabilidad de la proteína β -galactosidasa en el tejido cardíaco en comparación con el tejido del músculo esquelético (FIG. 3B). El número de copia de genoma del vector incrementó en el tejido cardíaco pero no en el tejido del músculo esquelético. Adicionalmente, se aisló el ARN de estos tejidos y se encontró que los números de transcrito de ARN también se incrementaron durante la duración del experimento (FIG. 3C).

El receptor celular para AAV9 actualmente no se conoce; sin embargo, la transducción cardíaca periférica asegura más evaluación de ligandos cardíacos, los cuales están unidos por AAV. Los datos sugieren que la cápside de AAV9 no se puede absorber por otros tejidos tan fácilmente que los serotipos previamente estudiados debido a su incapacidad de unirse a un receptor más ubicuo localizado por todo el cuerpo, tal como el receptor de heparin sulfato proteoglicano. Por lo tanto, la cápside de AAV9 podría requerir más tiempo para alcanzar el tejido cardíaco. Una explicación adicional para el incremento en la concentración del genoma del vector durante el transcurso del experimento es que puede haber un retraso en la síntesis de la doble cadena del transgén administrado en el corazón que podría explicar potencialmente una duplicación de los genomas de vector.

A continuación, se realizó un estudio en ratones adultos para determinar si el comportamiento de rAAV2/9 que se observó en neonatos es similar en animales adultos. Se administró rAAV2/9-CMV-*lacZ* (1×10^{11} gv) a ratones de 3 meses de vida usando una vía de administración intravenosa por la vena yugular (FIG. 4B). Los tejidos se extrajeron a las 4 semanas después de la inyección, y el nivel de expresión de transgén se determinó para tanto el músculo cardíaco como el esquelético. Los resultados muestran que rAAV2/9 somete a transducción músculo cardíaco y esquelético en ratones adultos, aunque en comparación con la misma dosis administrada a neonatos, los niveles de expresión eran mucho menores (FIG. 4A). El nivel de expresión administrado por rAAV2/9 en adultos era comparable

al observado tras la administración intravenosa de la misma dosis de rAAV2/1-CMV-lacZ a neonatos. La menor transducción de rAAV2/9 total en adultos en comparación con la misma dosis en neonatos no es inesperada debido a la dosis reducida por kilogramo de peso corporal. Estos datos demuestran, sin embargo, que se observa un perfil de biodistribución similar si rAAV2/9 se administra intravenosamente a adultos o neonatos y proporcionan más evidencia que rAAV2/9 preferiblemente somete a transducción tejido cardíaco.

Se usó un modelo de cardiomiopatía hereditaria para valorar una estrategia de transferencia génica para esta afección. La enfermedad de Pompe es una forma de distrofia muscular y miopatía metabólica causada por mutaciones en el gen de β -glucosidasa ácida (*Gaa*). Una cantidad insuficiente de la enzima GAA conduce a la acumulación de glucógeno en lisosomas y consecuente disfunción celular. En pacientes humanos, hay una correlación directa entre la cantidad de GAA producida y la gravedad de la enfermedad. Sin tratamiento, la insuficiencia cardiorespiratoria generalmente se da en los pacientes de aparición temprana en el primer año de vida.

Para demostrar la capacidad del pseudotipo rAAV2/9 para administrar un transgén terapéutico para corregir y/o prevenir la aparición de un fenotipo de la enfermedad, se trató el modelo de ratón *Gaa*^{-/-} con rAAV2/9-CMV-hGaa (*Gaa* humano). Debido a los resultados del gen marcador de rAAV2/9, se anticipó que una dosis terapéutica menor que la que generalmente se necesitaría sería suficiente para proporcionar corrección en un modelo de ratón de cardiomiopatía. Por lo tanto, se administraron dosis por neonato de o bien 4×10^5 o 4×10^8 gv de rAAV2/9-CMV-hGaa a ratones *Gaa*^{-/-} a 1 día de vida usando la vía de administración intravenosa. A los 3 meses después de la inyección, se realizaron ECG sobre cada grupo de dosis de ratones tratados y *Gaa*^{-/-} emparejados por edad, no inyectados y controles tipo silvestre sanos (B6/129).

Similar a la forma humana de esta enfermedad, los ECG de ratón *Gaa*^{-/-} no tratado muestran un intervalo PR acortado en comparación con los controles B6/129 sanos (PR=33,41 \pm 1,35 ms, o 26 % más corto que el tipo silvestre [PR=44,95 \pm 1,58 ms]). Los ratones que se trataron con la dosis baja (4×10^5 gv) de rAAV2/9-CMV-hGaa mostraron un intervalo PR de 36,76 \pm 1,12 ms, o solamente 18 % más corto que los controles tipo silvestre, emparejados por edad (P=0,062). El grupo de dosis tratado con 4×10^8 gv mostró un intervalo PR de 39,38 \pm 2,42 ms, o solamente 12 % más corto que los controles emparejados por edad B6/129 (P=0,058). Esencialmente, a estas dosis bajas se observó un intervalo PR alargado que puede incrementarse cuando el tiempo progresa.

Aunque el ratón es un modelo generalmente bien aceptado para los estudios de terapia génica, el comportamiento de diversas cápsides de AAV en seres humanos puede ser bastante diferente. Por lo tanto, los experimentos a largo plazo actualmente están siendo realizados en primates no humanos para valorar la expresión a lo largo del tiempo en un modelo animal más filogenéticamente similar a seres humanos. Los resultados de estos estudios en curso muestran que a los 6 meses tras la administración intravenosa por un vaso periférico (al nacer) de rAAV2/9-CMV-hGaa o rAAV2/1-CMV-hGaa a macacos rhesus bebés, el perfil de expresión entre los serotipos es similar al observado en los ratones con rAAV2/9, proporcionando aproximadamente 4 veces más de expresión de GAA que rAAV2/1 (FIG. 5A). El perfil de biodistribución de genoma del vector observado en estos tejidos de primate no humano también era similar al encontrado en el tejido de ratón (FIG. 5B) con rAAV2/9, demostrando una preferencia dramática para el tejido cardíaco sobre el músculo esquelético. Para tanto la expresión como el análisis del genoma del vector de especímenes de corazón de primate no humano, se hizo la media de los números entre el corazón izquierdo y derecho incluyendo el atrio y los ventrículos. La biodistribución de la expresión y los genomas del vector parecían que eran uniformes por todo el corazón.

EJEMPLO 2: LA CÁPSIDE DE AAV9 PERENTEMENTE SOMETE A TRANSDUCCIÓN TEJIDO CARDIACO Y DEMUESTRA COMPORTAMIENTO ÚNICO *IN VIVO*.

Desarrollo de una estrategia de terapia génica para el tratamiento de cardiomiopatías hereditarias:

Valorando los perfiles de expresión en tejidos por todo el cuerpo tras la administración intravenosa (IV) de virus a ratones adultos, recién nacidos y primates no humanos, se determinó que (de aquellos valorados) el serotipo de AAV óptimo para la transducción de tejido cardíaco es AAV2/9. Por MRI, ECG y análisis de tejido, se demostró que la administración IV de 4^{10} gv de AAV2/9 que porta un transgén terapéutico puede mejorar el fenotipo cardíaco en un modelo de ratón de la enfermedad de Pompe, un trastorno de almacenamiento de glucógeno. A los 3 meses de vida el análisis por ECG mostró mejora en intervalo PR y la valoración de MRI demostró gasto cardíaco incrementado en comparación con los controles no tratados. A los 6 meses después de la administración estas mejoras continuaron y tinciones con PAS de especímenes del corazón mostraron aclaramiento con éxito de glucógeno. La alta afinidad natural de AAV2/9 para tejido cardíaco sugiere que se une preferentemente a un receptor que es dominante en cardiomiocitos. Los estudios han revelado un rasgo interesante que es único a esta cápside entre aquellas con las que se ha trabajado previamente. Se administraron 5^{10} gv de AAV2/9-CMV-LacZ a ratones de 1 día de vida y se extrajeron el corazón y los músculos en un curso temporal hasta 56 días para cuantificar la expresión. Aunque la expresión de beta-gal se niveló en el tejido de músculo esquelético, continuó incrementándose en el corazón. El análisis de gv reveló el mismo fenómeno. Los datos sugieren que las cápsides de AAV9 pueden continuar liberándose de los tejidos con el tiempo y requieren más tiempo para alcanzar el corazón tras la administración IV.

La administración de gen mediada por rAAV2/9 de α -glucosidasa ácida corrige el fenotipo cardíaco en un modelo de

ratón de enfermedad de Pompe:

la enfermedad de Pompe es una forma de distrofia muscular y miopatía metabólica causada por mutaciones en el gen de la alfa glucosidasa ácida (GAA). Una cantidad insuficiente de GAA conduce a la acumulación de glucógeno en lisosomas y consecuente disfunción celular. En pacientes humanos hay una correlación directa entre la cantidad de GAA producida y la gravedad de la enfermedad. Sin tratamiento, la insuficiencia cardiorespiratoria generalmente se da en pacientes de aparición temprana en el primer año de vida.

En el presente documento se describe un estudio de caracterización del fenotipo cardíaco en el modelo de ratón nuligénico (*knockout*) respecto a GAA (*gaa*^{-/-}) a diversas edades a través del análisis de registros gráficos de ECG, los datos de MRI y el uso de la tinción por ácido peryódico-Schiff (PAS) para valorar visualmente el contenido de glucógeno en las secciones de tejido. Por el análisis por ECG, se observó un intervalo PR acortado por 3 meses de vida (*gaa*^{-/-} 33,41 ± 1,35 ms, control 44,95 ± 1,58 ms) imitando el fenotipo de conducción observado en la población con Pompe humana. A las 2 semanas de vida se pueden observar cantidades anormales de glucógeno en los lisosomas de células cardíacas como se demuestra por la tinción con PAS. El análisis por MRI muestra un descenso en el volumen sistólico (SV) (*gaa*^{-/-} 36,13 ± 1,19 µl, control 51,84 ± 3,59 µl) y un descenso en el gasto cardíaco (CO) (*gaa*^{-/-} 7,95 ± 0,26 ml/min, control 11,40 ± 0,79 ml/min) a 3 meses y un incremento significativo en la masa miocárdica (*gaa*^{-/-} 181,99 ± 10,7 mg, control 140,79 ± 5,12 mg) por 12 meses de vida.

Este modelo de disfunción cardíaca se usa para desarrollar una técnica de administración de gen cardíaco que se puede aplicar a muchas cardiomiopatías genéticamente heredadas. Previamente se mostró que la administración IV de vectores virales AAV2 recombinantes pseudotipificados con cápsides virales de serotipo 1 (rAAV2/1) que portan la construcción CMV-hGAA a neonatos *Gaa*^{-/-} de 1 día de vida restaura la actividad de GAA en diversos tejidos cuando se observa 12 meses después de la administración. Más recientemente, se encontró que la administración del transgén LacZ usando la vía de administración IV y cápside pseudotipo rAAV2/9 da como resultado niveles de expresión aproximadamente 200 veces mayores en tejido cardíaco que una dosis idéntica con rAAV2/1. Experimentos adicionales indicaron que la administración IV de un transgén usando rAAV2/9 a ratones adultos también da como resultado transducción de tejido cardíaco.

El serotipo de rAAV más óptimo para la transducción cardíaca (rAAV2/9) actualmente se ha combinado con la vía de administración IV clínicamente relevante para administrar el gen de GAA humana (*hGAA*) a ratones *Gaa*^{-/-}. Los neonatos tratados con rAAV2/9-CMV-hGAA a un intervalo de dosis (4×10^5 gv, 4×10^8 gv y 4×10^{10} gv) usando esta estrategia han demostrado corrección sostenida cuando se valora por análisis por ECG (39,38 ± 2,42 ms). Las tinciones con PAS sobre secciones de tejido congelado así como el análisis por NMR sobre tejidos liofilizados han demostrado menos acumulación de glucógeno en el tejido cardíaco de ratones *gaa*^{-/-} tratados como los neonatos en comparación con controles no tratados. El análisis por MRI no invasivo ha demostrado un incremento en SV y CO. También se han tratado ratones *Gaa*^{-/-} adultos usando la vía de administración IV y actualmente están siendo valorados para invertir los efectos de la enfermedad de Pompe en ratones que ya han empezado a presentar el fenotipo cardíaco.

La vía de administración sistémica, el uso del promotor CMV y el hecho de que GAA es una enzima secretada todo promueve la expresión y la corrección por todo el cuerpo. Se ha observado la actividad de GAA en diversos otros tejidos de ratones tratados incluyendo los músculos esqueléticos y el hígado. En conclusión, estos estudios han demostrado que la capacidad de rAAV2/9 para ser administrado sistémicamente usando una vía de administración IV relativamente no invasiva, transciende el sistema vascular, somete a transducción los tejidos por todo el cuerpo y previene finalmente la presentación de fenotipos cardíacos de la enfermedad de Pompe.

EJEMPLO 3: MRI PARA LA CARACTERIZACIÓN Y LA EVALUACIÓN DE LA TERAPIA GÉNICA EN MODELOS MURINOS DE DISTROFIA MUSCULAR.

Se realizaron estudios para establecer qué combinación de serotipo de virus adenoasociado (AAV), promotor y vía de administración es la más ventajosa para la administración génica cardíaca. Se realizan estudios para caracterizar de manera no invasiva los corazones en modelos de ratón de las diversas formas de distrofia muscular que se puede tratar. Ejemplos de modelos de diversas formas de distrofia muscular incluyen: un modelo para la distrofia muscular de cintura y extremidades; nuligénico respecto a alfa-sarcoglicano (*ASG*^{-/-}), un modelo para distrofia miotónica tipo 1 (*MDNL1*^{-/-}) en el que el exón 3 de MBNL se ha sometido a delección y el modelo de ratón MDX para la distrofia muscular Duchenne que carece de distrofina.

En los estudios de caracterización iniciales, se extrajo tejido cardíaco de estos modelos a un rango de edades y se encontró que las manifestaciones de la enfermedad incrementan con la edad en todos los casos. La localización y el tamaño de las lesiones distróficas en los estadios tempranos de desarrollo se pueden identificar y determinar debido a su capacidad de absorber y secuestrar el colorante fluorescente, el Colorante azul de Evans (EBD), debido a la permeabilidad anormal del tejido muscular deteriorado. También se demostró la capacidad de identificar de manera no invasiva y hacer un seguimiento de la progresión del desarrollo de la lesión distrófica en el músculo esquelético usando técnicas de resonancia magnética ¹H. Para reconocer las lesiones en los estadios tardíos del desarrollo sobre criosecciones, se utilizó el colorante tricromo. Este tinte para la presencia de colágeno que infiltra lesiones distróficas más progresadas cuando experimentan fibrosis.

La MR cardíaca proporciona imágenes de alta resolución que ofrecen información funcional estructural así como global y regional. Para ratones MDX mayores (6-52 semanas), el corazón muestra lesiones focales de infiltración celular inflamatoria, daño de miocito y fibrosis generalmente localizada en el ventrículo o el septo. También se encontró que los corazones MDX más viejos (>48 semanas) muestran regiones de intensidad de señal de MR incrementada. Las regiones hiper intensas correlacionadas con las regiones de daño de miocito, determinadas histológicamente usando acumulación de EBD, H&E y tinción con tricromo. También se puede usar MR cardíaca para hacer un seguimiento de la función de miocito. Al realizar la MRI cardíaca sobre estos modelos a diversas edades, se obtuvieron imágenes que han permitido la identificación de la presentación de cardiomiopatía dilatada, defectos de contractilidad y arritmias. Además de las mediciones y las técnicas de imágenes cardíacas convencionales, los protocolos de marcado cardíaco están siendo establecidos para permitir la identificación de áreas de defectos de contractilidad localizados. Esto puede ser beneficioso para modelos de ratón que pueden mostrar disfunción regional debido a áreas de tejido necrótico por todo el corazón.

Tras la finalización de estos estudios de caracterización, una próxima etapa incluye proporcionar terapia génica a estos ratones y prevención de las manifestaciones de estas enfermedades. A continuación, los animales tratados se valoran periódicamente de manera no invasiva usando protocolos de MRI establecidos para demostrar finalmente la corrección funcional en modelos murinos de cardiomiopatía.

20 EJEMPLO 4: LOS DÉFICITS NEURALES CONTRIBUYEN A INSUFICIENCIA REPIRATORIA PARA ENFERMEDAD DE POMPE.

Los objetivos principales eran determinar si los ratones GAA^{-/-} tienen un patrón alterado de respiración, similar a las dificultades de ventilación observadas en la población de paciente y si los déficits de ventilación en GSD II están mediados por un componente central.

Pletismografía: Se usó pletismografía barométrica para medir la ventilación por minuto (MV) y el tiempo de inspiración (T_i) en ratones GAA^{-/-} y controles emparejados por edad (cepa B6/129). Después de un periodo de aclimatación (30 min) y línea base (60 min; F_iO₂ = 21 %, F_iCO₂ = 0 %), se expusieron los ratones a reto hipercápnico (10 min, F_iCO₂ = 6,5 %) para estimular la respuesta motora respiratoria.

Muestreo de sangre: Se anestesiaron ratones control (B6/129) y GAA^{-/-} y se extrajo aproximadamente 100 µl de sangre de la cola en un cartucho G8+ desechable y se leyó con una máquina I-Stat portátil (Heska Corp.).

Deleción de glucógeno: El glucógeno se cuantificó usando una modificación del método de hidrólisis ácida. Se realizó tinción con ácido peryódico Schiff para la detección de glucógeno histológico; se pintó con Fluoro-Gold® (4 %) sobre los diafragmas de ratón 48 horas antes del sacrificio para la detección de las neuronas motoras frénicas.

Mediciones de fuerza frecuencia in vitro: Se determinó la longitud óptima para la tensión tetánica isométrica para cada tira de diafragma seguido de incremento progresivo de la frecuencia de estimulación. La fuerza generada se normalizó a la longitud y el peso de tira de diafragma.

Neurofisiología: El nervio frénico derecho se aisló y se registró la actividad eléctrica en ratones anestesiados (uretano, i.v. 1,0-1,6 g/kg), ventilados mecánicamente, paralizados y vagotomizados con un electrodo de tungsteno bipolar.

Resultados y Sumario: La FIG. 6A y la FIG. 6C son gráficas que muestran los resultados de ventilación por minuto (ml/min) en la línea base y durante 10 minutos de hipercapnia en ratones control y GAA^{-/-} 6 meses (FIG. 6A), 12 meses (FIG. 6B) y >21 meses (FIG. 6C).

En resumen, los resultados muestran:

los ratones GAA^{-/-} tiene un patrón alterado de respiración en comparación con los ratones control emparejados por edad (FIG. 7A).

La deficiencia de GAA en el sistema nervioso da como resultado déficits en la ventilación como se demuestra por la ventilación por minuto atenuada en ratones con GAA específica a músculo (que tiene diafragma de funcionamiento normal) (FIG. 7B).

El flujo inspiratorio medio atenuado sugiere que se puede disminuir el impulso para respirar en ratones GAA^{-/-} (FIG. 8).

La acumulación de glucógeno en la médula espinal de ratones GAA^{-/-} se observa que comienza a los 6 meses de vida (FIG. 9A y FIG. 9B).

La respuesta frénica inspiratoria eferente se reduce en GAA^{-/-} frente a control (FIG. 10A y FIG. 10B).

Conclusión: Los déficits de ventilación en ratones GAA^{-/-} son similares a la población de paciente. Los datos del flujo inspiratorio medio, la cuantificación de glucógeno, el patrón de respiración de ratón con GAA específica a músculo y el neurograma frénico son coherentes con la hipótesis de que estas dificultades ventilatorias reflejan tanto un componente muscular como uno neural en GSD II.

EJEMPLO 5 - CORRECCIÓN FISIOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD DE POMPE USANDO VECTORES RAAV2/1

Materiales y métodos:

El plásmido de AAV2 recombinante p43.2-GAA (Fraitas, T.J., Jr. *et al.*, *Mol. Ther.* 5:571-578, 2002) se ha descrito previamente. Las partículas de AAV recombinante basadas en el serotipo 1 se produjeron usando p43.2-GAA y se generaron, purificaron, y valoraron en el "University of Florida Powell Gene Therapy Center Vector Core Lab" como se ha descrito previamente (Zolotukhin, S. *et al.*, *Methods*, 28:158-167, 2002).

Todos los estudios con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del "the University of Florida Institutional Animal Care and Use Committee". El modelo de ratón de la enfermedad de Pompe (*Gaa*^{-/-}) usado en este estudio se ha descrito previamente y se generó por una alteración dirigida de exón 6 del gen *Gaa* (Raben, N. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273:19086-19092, 1998). A ratones *Gaa*^{-/-} de un día de vida se administraron 5×10^{10} partículas (30 μ l de volumen total) de rAAV2/1-CMV-GAA intravenosamente por la vena temporal superficial como se ha descrito previamente (Sands, M.S. y Barker, J.E., *Lab. Anim. Sci.*, 49:328-330, 1999).

Se ensayaron homogenados de tejido diez, 24 y 52 semanas después de la inyección, para la actividad de la enzima GAA. En resumen, los lisados se ensayaron para la actividad de GAA midiendo la escisión del sustrato sintético 4-metilumbeliferil- α -D-glucósido (Sigma M9766, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) después de incubación durante 1 h a 37 °C. La escisión con éxito produjo un producto fluorescente que emite a 448 nm, medido con un lector de fluorescencia de microplaca FLx800 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). La concentración de proteína se midió usando el kit de ensayo de proteína DC Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA). Los datos se representan como porcentaje de los niveles normales de GAA en cada tejido después de la resta de los niveles de tejido de *Gaa*^{-/-} no tratados. La detección de anticuerpos anti-GAA se realizó por ELISA.

Los segmentos de diafragma tratado y no tratado se fijaron durante la noche en glutaraldehído al 2 % en PBS, se incrustaron en Epon 812® (Shell), se seccionaron, y se tiñeron con ácido peryódico-Schiff (PAS) por métodos convencionales.

Los ratones se anestesiaron con una mezcla de isoflurano al 1,5-2 % y 1 l/min de oxígeno, a continuación, se colocaron en posición supina sobre una almohadilla de calentamiento. Los cables del ECG se colocaron subcutáneamente en el hombro derecho, la extremidad anterior derecha, la extremidad anterior izquierda, la extremidad posterior izquierda y la cola. Se adquirieron los registros gráficos de ECG durante cinco minutos por animal usando la unidad de PowerLab ADInstruments y el programa informático Chart acquisition (ADInstruments, Inc., Colorado Springs, CO). Se hizo la media de todos los intervalos picos de todos los registros gráficos para cada animal y, a continuación, se hizo la media dentro de cada grupo experimental.

Valoración de la masa cardíaca:

La MRI cardíaca se realizó sobre un espectrómetro Bruker Avance 4.7 T (Bruker BioSpin Corporation, Billerica, MA) en la instalación de "University of Florida Advanced Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy (AMRIS)". Los animales se anestesiaron usando isoflurano al 1,5 % (Abbott Laboratories, North Chicago, IL) y 1 l/min de oxígeno. Los animales se colocaron boca abajo sobre una bobina de superficie para transmisión y recepción de cuadratura casera con el corazón colocado tan cerca al centro de la bobina como sea posible. Las imágenes se adquirieron usando activación cardíaca y se dispararon en el pico de la onda R-R (SA Instruments, Inc., Stony Brook, NY). El corazón se visualizó adquiriendo lonchas individuales del eje corto a lo largo de la longitud del ventrículo izquierdo. Las imágenes se adquirieron usando una secuencia de eco de gradiente (GRE) (matriz = 256 x 128, TE = 2,4 ms, FOV = 4 cm x 3 cm, 7-8 lonchas, espesor = 1 mm). El TR eficaz (tiempo de repetición de pulso) estaba regido por el ritmo cardíaco del animal, el cual se observó que mantenía regularidad y la anestesia se ajustó consecuentemente. El intervalo R-R generalmente era de 250 ms.

Las imágenes se procesaron usando CAAS MRV para ratones (Pie Medical Imaging, Maastricht, Países Bajos). Los contornos se dibujaron para el epicardio y el endocardio para cada loncha a lo largo de la longitud del ventrículo izquierdo a tanto la diástole final como la sístole final. Los resultados se exportaron y se analizaron y se calculó la masa miocárdica diastólica final.

Se usaron relaciones fuerza-frecuencia isométricas para valorar la fuerza contráctil del diafragma. El diafragma se aisló, con las costillas y el tendón central unidos, y se colocó en solución Krebs-Henseleit calibrada con una mezcla gaseosa de 95 % de O₂/5 % de CO₂ sobre hielo. Una tira de músculo sencilla, cortada del diafragma costal ventral paralelo a las fibras del tejido conectivo, se usó para determinar las relaciones fuerza-frecuencia. Se unieron Grapas Plexiglas® a la tira de diafragma grapando a la costilla y al tendón central. La tira de músculo se suspende verticalmente en un baño de tejido con funda de agua (Radnoti, Monrovia, CA) que contiene solución de Krebs-Henseleit calibrada con una mezcla gaseosa de 95 % de O₂/5 % de CO₂, mantenida a 37 °C, pH 7,4 y calibrada durante 15 min. Para medir las propiedades contráctiles isométricas, la grapa unida al tendón central se conecta a un transductor de fuerza (Modelo FT03, Grass Instruments, West Warwick, RI). Los resultados del transductor se

amplifican y diferencian por amplificadores operacionales y se someten a conversión A/D usando un sistema de adquisición de datos basado en ordenador (Polyview, Grass Instruments). Para determinar la longitud óptima de la tira de músculo (L_0) para la tensión tetánica isométrica, el músculo se estimula en el campo (Modelo S48, Grass Instruments) a lo largo de su longitud entera usando electrodos de alambre de platino. Se suscitan contracciones de tirón único, seguido de incremento paso a paso en la longitud del músculo, hasta que se obtiene tensión de tirón isométrico máxima. Se miden todas las propiedades contráctiles de manera isométrica a L_0 . La fuerza tetánica isométrica pico se mide a 10, 20, 40, 80, 100, 150, y 200 Hz. Se usan trenes únicos de 500 ms, con un periodo de recuperación de cuatro minutos entre los trenes para prevenir la fatiga. Los calibradores se usan para medir L_0 antes de retirar el músculo del aparato. A continuación se disecciona el tejido muscular de la costilla y el tendón central, se seca, y se pesa. El área de la sección transversal (CSA) muscular se determina usando la ecuación $CSA \text{ (cm}^2\text{)} = [\text{masa de tira de músculo (g)/longitud de fibra } L_0 \text{ (cm)} \times 1,056 \text{ (g/cm}^3\text{)}]$, en la que $1,056 \text{ g/cm}^3$ es la densidad asumida del músculo. La CSA calculada se usa para normalizar la tensión isométrica, la cual se expresa como N/cm^2 .

La función respiratoria se ensayó usando pletismografía de cuerpo completo barométrica. Ratones C57BL6/129SvJ, $Gaa^{-/-}$ y $Gaa^{+/+}$, tratados con rAAV2/1 no anestesiados, desatados se colocaron en una cámara de Plexiglas® clara (Buxco, Inc., Wilmington, NC). El flujo de aire de la cámara, la presión, la temperatura y la humedad están continuamente controladas y los parámetros tales como la frecuencia, la ventilación por minuto, el volumen tidal, y el flujo inspiratorio pico se midieron y analizaron usando el método por Drorbaugh and Fenn y se registraron usando el programa informático BioSystem XA (Buxco, Inc.) (Drorbaugh, J.E. and Fenn, W.O., *Pediatrics*, 16:81-87, 1955). Las mediciones basales se tomaron bajo las condiciones de normoxia ($F_{I}O_2$: 0,21, $F_{I}CO_2$: 0,00) durante un periodo de una hora seguido de una exposición de diez minutos a hipercapnia ($F_{I}O_2$: 0,21, $F_{I}CO_2$: 0,07).

Resultados:

Se examinó la función cardíaca y respiratoria en animales tratados con rAAV2/1. Similar a la población de paciente de Pompe, las mediciones del electrocardiograma (ECG) (intervalo P-R) se acortaron significativamente en el modelo de ratón. En los ratones tratados con rAAV2/1, se mostró una mejora significativa en la conductancia cardíaca con intervalos P-R prolongados de $39,34 \pm 1,6$ ms, en comparación con los controles no tratados ($35,58 \pm 0,57$ ms) ($p \leq 0,05$). Además, usando imágenes por resonancia magnética (MRI), se indicó un descenso marcado en la masa ventricular izquierda cardíaca de $181,99 \pm 10,70$ mg en controles emparejados por edad no tratados a $141,97 \pm 19,15$ mg en los ratones tratados con rAAV2/1. Además, los ratones mostraron fuerza contráctil diafragmática incrementada a aproximadamente 90 % de las fuerzas pico del tipo silvestre con correspondiente ventilación significativamente mejorada (particularmente en frecuencia, ventilación por minuto, y flujo inspiratorio pico), medida usando pletismografía de cuerpo completo barométrica. Estos resultados demuestran que además de la corrección bioquímica e histológica, los vectores rAAV2/1 pueden medir la corrección fisiológica sostenida de la función cardíaca y respiratoria en un modelo de cardiomiopatía y distrofia muscular mortales.

La administración sistémica de rAAV2/1 puede dar como resultado restauración sostenida de la actividad enzimática de GAA cardíaca y diafragmática en ratones $Gaa^{-/-}$

Se inyectaron 5×10^{10} partículas de rAAV2/1-CMV-hGAA en ratones $Gaa^{-/-}$ de un día de vida por la vena temporal superficial. Se recogieron muestras de suero en serie para ensayar la formación de anticuerpos anti-hGAA y se analizaron los tejidos cardíacos y de diafragma para la actividad de la enzima GAA a diez, 24 y 52 semanas después de la inyección. Se detectó una respuesta inmunitaria humoral transitoria por la presencia de anticuerpos anti-hGAA circulantes. Los títulos del anticuerpo eran mayores a las once semanas después de la inyección con una media de $16,08 \pm 4,66$ veces por encima de los niveles de base. Después de quince semanas, los títulos de anticuerpo cayeron significativamente a $4,72 \pm 1,28$ veces por encima de los de base y se redujeron más a los niveles anteriores a las 31 semanas después del tratamiento. Los niveles de actividad de la enzima GAA se detectaron a las 24 semanas con 4223 ± 1323 % y $138,18 \pm 59,7$ % de la actividad normal ($Gaa^{+/+}$) en el corazón y el diafragma, respectivamente, con niveles que caían a $593,79 \pm 197,35$ % y $39,81 \pm 17,43$ % de la normal, respectivamente, un año después de la inyección.

La terapia mediada por AAV2/1 recombinante puede corregir anomalías de la masa cardíaca y la conductancia en ratones $Gaa^{-/-}$

Los resultados anteriormente descritos demuestran que la administración de vectores rAAV2/1-CMV-hGAA dan como resultado la corrección bioquímica e histológica sostenida del fenotipo cardíaco de la enfermedad de Pompe como se evidencia por los niveles suprafisiológicos de la actividad de la enzima GAA y el aclaramiento concomitante de glucógeno, como se determina por la tinción con el reactivo ácido peryódico-Schiff. La espectroscopía de resonancia magnética de potrones ($^1\text{H-MRS}$) de extractos de ácido perclórico de tejidos cardíacos respaldó más estos descubrimientos. Como se muestra en la FIG. 11, se podía detectar un pico de glucógeno pronunciado en un ratón $Gaa^{-/-}$ de 1 año de vida. Se observó una reducción media del 70 % en el contenido de glucógeno en corazones de ratones de un 1 año $Gaa^{-/-}$ de vida tratados con rAAV2/1-CMV-hGAA como los neonatos, en comparación con los ratones no tratados.

Se examinaron los efectos fisiológicos de la terapia mediada por rAAV2/1 sobre la función cardíaca. Un intervalo P-R

acortado es característico en los electrocardiogramas de pacientes con enfermedad de Pompe. A un año de vida, los ratones *Gaa*^{-/-} también muestran un intervalo P-R significativamente acortado. Como se muestra en la Tabla 1, los ratones *Gaa*^{-/-} de un año de vida a los que se administraron rAAV2/1-CMV-hGAA como los neonatos demostraron conductancia cardíaca significativamente mejorada con un intervalo P-R prolongado de $39,32 \pm 1,6$ ms, en comparación con los controles no tratados ($35,58 \pm 0,57$ ms) ($p < 0,05$). Además de la conductancia cardíaca aberrante, tanto la población de paciente como el modelo de ratón de la enfermedad de Pompe también presentan hipertrofia cardíaca pronunciada. usando imágenes de resonancia magnética (MRI), los estudios previos han demostrado que la masa cardíaca se puede cuantificar con exactitud, de manera no invasiva, en modelos de ratón. Se usó MRI para valorar la masa ventricular izquierda (LV) en el modelo de *Gaa*^{-/-}. A un año de vida, los ratones *Gaa*^{-/-} tienen masa LV significativamente mayor ($181,99 \pm 10,7$ mg) en comparación con los ratones *Gaa*^{+/+} (C57BL6/129SvJ) tipo silvestre emparejados por edad ($140,79 \pm 5,12$ mg). Como se muestra en la Tabla 1, los ratones *Gaa*^{-/-} tratados con rAAV2/1 tienen masas LV similares a la de los ratones tipo silvestre a un año de vida ($141,97 \pm 19,15$ mg). Aunque la masa LV reducida en los ratones tratados con rAAV2/1 no era bastante estadísticamente significativa ($p=0,06$), la tendencia de masa LV menor se cree que es real y probablemente sería significativa con una población de muestra mayor.

Tabla 1: La inyección intravenosa de rAAV2/1 conduce a masa cardíaca disminuida e intervalo P-R alargado

	Masa ventricular (mg)	Intervalo P-R (ms)
<i>Gaa</i> ^{-/-} de 1 año de vida	$181,99 \pm 10,70$	$35,58 \pm 0,57$
BL6/129 de 1 año de vida	$140,79 \pm 5,12$	$45,13 \pm 1,16$
tratado con AAV2/1 de 1 año de vida	$141,97 \pm 19,15^{**}$	$39,34 \pm 1,60^*$

Un año después de la inyección, los ratones tratados con rAAV2/1 (n = 7) así como los ratones *Gaa*^{-/-} (n = 7) controles emparejados por edad y C57 (n = 5) se sometieron a electrocardiografía así como a imagen por resonancia magnética.

La contractilidad y la función ventilatoria del diafragma se mejoran significativamente después de la administración de los vectores rAAV2/1

Ya que la insuficiencia respiratoria se manifiesta como una de las complicaciones clínicas más dominantes de la enfermedad de Pompe, los efectos de la terapia génica mediada por rAAV2/1 sobre la función ventilatoria se examinó en ratones *Gaa*^{-/-} (Kishnani, P.S. *et al.*, *Genet. Med.*, 8:267-288, 2006; Hagemans, M.L., *et al.*, *Neurology*, 66:581-583, 2006; Mellies, U. *et al.*, *Neurology*, 64:1465-1467, 2005). La tinción con PAS del diafragma de ratones *Gaa*^{-/-} de un año de vida administrados intravenosamente con rAAV2/1-CMV-hGAA, mostró una reducción significativa en la cantidad de glucógeno acumulado, correspondiente al nivel terapéutico de la expresión de GAA. El músculo del diafragma se aisló y se evaluó para la generación de fuerza isométrica. La fuerza contráctil del diafragma generada por ratones tratados con rAAV2/1 se mejoraron significativamente en comparación con los controles no tratados, emparejados por edad, y animales no tratados de 3 meses de vida, incluso más jóvenes. A la máxima frecuencia de estimulación (200 Hz), la fuerza generada por los diafragmas de ratones tratados con rAAV2/1 era de $21,98 \pm 0,77$ N/cm², mientras que los diafragmas de ratón *Gaa*^{-/-} control de un año de vida generó una media de $13,95 \pm 1,15$ N/cm².

Para medir la ventilación, se usó pletismografía de cuerpo completo barométrica. La pletismografía permite la medición simultánea de los parámetros múltiples de la ventilación, incluyendo frecuencia (respiraciones/min), volumen tidal (ml/respiración), ventilación por minuto (ml/min), y flujo inspiratorio pico (ml/s), en ratones no anestesiados, desatados (DeLorme, M.P. and Moss, O.R., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 47:1-10, 2002). Los ratones se sometieron a 90 min de aire normóxico seguido de una exposición de diez minutos a condiciones hipercápnicas (7 % de CO₂). Los niveles de CO₂ elevados incrementan el impulso para respirar y permiten una valoración de un intervalo prolongado de las capacidades respiratorias. La pletismografía se realizó a los 6 y 12 meses de vida. Los ratones *Gaa*^{-/-} no tratados mostraron capacidad ventilatoria drásticamente disminuida a tanto los 6 como los 12 meses de vida, como se demuestra por la frecuencia, el volumen tidal, la ventilación por minuto, y el flujo inspiratorio pico ($p < 0,01$) significativamente reducidos en respuesta a hipercapnia. Por el contrario, a los 6 meses, los ratones *Gaa*^{-/-} tratados con rAAV2/1 tenían ventilación significativamente mejorada a través de todos los parámetros medidos en respuesta a hipercapnia (FIG. 12A-FIG. 12D), y a un año después del tratamiento, la frecuencia, la ventilación por minuto, y el flujo inspiratorio pico eran aún significativamente mayores que la de los controles emparejados por edad no tratados ($p < 0,05$) (FIG. 13A-FIG. 13D).

Los experimentos descritos en el presente documento demuestran que además de la corrección bioquímica del fenotipo de la enfermedad, la administración del vector rAAV2/1 terapéutico puede conducir también a corrección funcional. El tratamiento con un vector rAAV2/1 terapéutico dio como resultado una mejora significativa en la función cardíaca indicada por un intervalo P-R alargado en los electrocardiogramas de los animales tratados.

Estos experimentos también demuestran que una media de actividad de GAA normal de aproximadamente el 39 % puede dar como resultado el aclaramiento de glucógeno en el diafragma, el músculo principal implicado en la ventilación, así como una mejora drástica en la capacidad contráctil del diafragma. Además, se observó una mejora significativa de la función ventilatoria bajo condiciones de hipercapnia. Igual a la función cardíaca, aunque la mejora marcada se indica en la función ventilatoria, la corrección es solamente parcial. No se observó una diferencia

significativa en la ventilación entre los animales tratados y los respectivos controles no tratados durante la exposición a condiciones de normoxia.

Los experimentos realizados en el modelo de ratón *Gaa*^{-/-} sugieren que la actividad de la neurona motora frénica en ratones *Gaa*^{-/-} se atenúa y demuestran que una administración intravenosa única de un vector rAAV2/1 terapéutico puede dar lugar a corrección sostenida del fenotipo cardiorespiratorio en un modelo de ratón de distrofia muscular metabólica.

Ejemplo 6 - Administración mediada por gel de vectores rAAV2/1 para corregir la función ventilatoria en ratones con Pompe con enfermedad de formas progresivas

Se caracterizaron las consecuencias de un método mediado por gel de la administración de un vector viral AAV2 recombinante terapéutico pseudotipificado con cápsides virales de serotipo 1 (rAAV2/1) en ratones *Gaa*^{-/-} a 3, 9 y 21 meses de vida. En ratones tratados a los 3 meses de vida, se observó una mejora significativa de la fuerza contráctil del diafragma a los 6 meses que se sostiene hasta 1 año de vida en comparación con controles no tratados emparejados por la edad. De forma similar, se observó fuerza contráctil significativamente mejorada en ratones tratados a los 9 y 21 meses de vida, 3 meses después del tratamiento ($p \leq 0,05$). La ventilación bajo las condiciones de normoxia (la relación de volumen tidal/tiempo de inspiración, la relación de la ventilación por minuto para expirar CO₂, y el flujo inspiratorio pico) estaban todas mejoradas en ratones tratados a los 3 meses de vida y ensayadas a los 6 meses ($p \leq 0,05$), pero no se sostenían a 1 año de vida, en comparación con controles no tratados emparejados por edad. En todos los ratones tratados con gel de rAAV2/1 (tratados 3, 9 y 21 meses de vida) la ventilación por minuto y los flujos inspiratorios picos se mejoraron significativamente bajo condiciones hipercápnicas. Estos resultados demuestran que en la administración mediada por gel de vectores rAAV2/1 se puede mediar la mejora fisiológica significativa de la función ventilatoria en un modelo de distrofia muscular.

Materiales y métodos:

Empaquetado y purificación de vectores AAV2/1 recombinantes

El plásmido AAV2 recombinante p43.2-GAA se ha descrito previamente. Las partículas de AAV recombinante basadas en el serotipo 1 se produjeron usando p43.2-GAA y se generaron, purificaron, y valoraron en el "University of Florida Powell Gene Therapy Center Vector Core Lab".

Administración in vivo

Todos los estudios con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del "the University of Florida Institutional Animal Care and Use Committee". A ratones *Gaa*^{-/-} de tres, nueve y 21 meses de vida se administraron 1×10^{11} partículas de rAAV2/1-CMV-GAA directamente al diafragma en una matriz gel como se ha descrito previamente (véase la solicitud de patente de los Estados Unidos número 11/055.497 presentada el 10 de febrero de 2005).

Valoración histológica del aclaramiento de glucógeno

Los segmentos de diafragma tratado y no tratado se fijaron durante la noche en glutaraldehído al 2 % en PBS, se incrustaron en Epon 812® (Shell), se seccionaron, y tiñeron con PAS por métodos convencionales.

Valoración de la fuerza contráctil del diafragma

Se usaron relaciones fuerza-frecuencia isométricas para valorar la fuerza contráctil del diafragma. El diafragma se aisló, con las costillas y el tendón central unidos, y se colocó en solución Krebs-Henseleit calibrada con una mezcla gaseosa de 95 % de O₂/5 % de CO₂ sobre hielo. Una tira de músculo sencilla, cortada del diafragma costal ventral paralelo a las fibras del tejido conectivo, se usó para determinar las relaciones fuerza-frecuencia. Se unieron Grapas Plexiglas® a la tira de diafragma grapando a la costilla y al tendón central. La tira de músculo se suspende verticalmente en un baño de tejido con funda de agua (Radnoti, Monrovia, CA) que contiene solución de Krebs-Henseleit calibrada con una mezcla gaseosa de 95 % de O₂/5 % de CO₂, mantenida a 37 °C, pH 7,4 y calibrada durante 15 min. Para medir las propiedades contráctiles isométricas, la grapa unida al tendón central se conecta a un transductor de fuerza (Modelo FT03, Grass Instruments, West Warwick, RI). Los resultados del transductor se amplifican y diferencian por amplificadores operacionales y se someten a conversión A/D usando un sistema de adquisición de datos basado en ordenador (Polyview, Grass Instruments). Para determinar la longitud óptima de la tira de músculo (L₀) para la tensión tetánica isométrica, el músculo se estimula en el campo (Modelo S48, Grass Instruments) a lo largo de su longitud entera usando electrodos de alambre de platino. Se suscitan contracciones de tirón único, seguido de incremento paso a paso en la longitud del músculo, hasta que se obtiene tensión de tirón isométrico máxima. Se miden todas las propiedades contráctiles de manera isométrica a L₀. La fuerza tetánica isométrica pico se mide a 10, 20, 40, 80, 100, 150, y 200 Hz. Se usan trenes únicos de 500 ms, con un periodo de recuperación de cuatro minutos entre los trenes para prevenir la fatiga. Los calibradores se usan para medir L₀ antes de retirar el músculo del aparato. A continuación se disecciona el tejido muscular de la costilla y el tendón central, se seca, y se pesa. El área de la sección transversal (CSA) muscular se determina usando la ecuación:

$$\text{CSA (cm}^2\text{)} = [\text{masa de tira de músculo (g)/longitud de fibra } L_0 \text{ (cm)} \times 1,056 \text{ (g/cm}^3\text{)}],$$

5 en la que 1,056 g/cm³ es la densidad asumida del músculo. La CSA calculada se usa para normalizar la tensión isométrica, la cual se expresa como N/cm².

Valoración de la función ventilatoria

10 La función ventilatoria se ensayó usando pletismografía de cuerpo completo barométrica. Ratones C57BL6/129SvJ (n=10), *Gaa*^{-/-} (n = 10) y *Gaa*^{-/-} tratados con rAAV2/1 (n = 8) no anestesiados, desatados se colocaron en una cámara de Plexiglas® clara (Buxco, Inc., Wilmington, NC). El flujo de aire de la cámara, la presión, la temperatura y la humedad están continuamente controladas y los parámetros tales como la frecuencia, la ventilación por minuto, el volumen tidal, y el flujo inspiratorio pico se midieron y analizaron usando el método por Drorbaugh and Fenn y se registraron usando el programa informático BioSystem XA (Buxco, Inc.). Las mediciones basales se tomaron bajo las condiciones de normoxia (F_IO₂: 0,21, F_ICO₂: 0,00) durante un periodo de una hora seguido de una exposición de diez minutos a hipercapnia (F_IO₂: 0,93, F_ICO₂: 0,07).

Registros del nervio frénico eferente

20 Los ratones se anestesiaron con isoflurano al 2-3 %, se les puso una cánula en la tráquea, y se conectaron a un ventilador (Modelo SAR-830/AP, CWE, Incorporated). Los ajustes del ventilador se manipularon para producir presiones parciales de CO₂ entre 45-55 mmHg. Se implantó un catéter yugular (diámetro exterior de 0,033; tubería RenaPulse™, Braintree Scientific) y se usó para la transición de los ratones de anestesia de isoflurano a uretano (1,0-1,6 g/kg). Se insertó un catéter arterial carotídeo (catéter carotídeo de ratón, Braintree Scientific) para permitir las mediciones de la presión sanguínea (Ohmeda P10-EZ) y la retirada de 0,15 ml de muestra para medir PO₂ y PCO₂ arterial (analizador de gas sanguíneo portátil I-Stat). Los ratones se sometieron a vagotomía y se paralizaron (bromuro de pancuronio; 2,5 mg/kg, i.v.). El nervio frénico derecho se aisló y se colocó sobre un electrodo de alambre de tungsteno bipolar. Las actividades eléctricas del nervio se amplificaron (2000x) y se filtraron (100-10.000 Hz; Modelo BMA 400, CWE, Incorporated). Cuando se hace un seguimiento de la actividad inspiratoria espontánea en el neurograma frénico, la señal amplificada era rectificada a onda completa y se suavizó con una constante de tiempo de 100 ms, se digitalizó y se registró en un ordenador usando el programa informático Spike2 (Cambridge Electronic Design; Cambridge, RU). Los ajustes de aumento del amplificador y los métodos de procesamiento de señal eran idénticos en todos los animales experimentales. Los 30 segundos antes de cada extracción de sangre se analizaron para la amplitud de ráfaga inspiratoria frénica media a partir de estos registros.

Resultados:

La administración mediada por gel de rAAV2/1 puede dar como resultado transducción eficaz de diafragma y aclaramiento de glucógeno acumulado

40 El análisis histológico de diafragmas transducidos de ratones administrados con 1×10^{11} partículas de rAAV que codifican β -galactosidasa (*lacZ*) conducida por el promotor de CMV mostró que no solamente la administración de rAAV2/1 podía conducir a transducción uniforme a través de la superficie del diafragma sobre el cual se aplicó el vector, sino que el vector rAAV2/1 podía someter a transducción el espesor entero del tejido de diafragma. En comparación, los vectores rAAV2 solamente podían someter a transducción las primeras pocas capas de células.

50 Se administraron 1×10^{11} partículas de rAAV2/1-CMV-GAA a diafragmas de ratones adultos *Gaa*^{-/-} de tres, nueve y 21 meses de vida usando el método de gel. Se valoró la actividad de la enzima GAA tres meses después del tratamiento para cada grupo de edad y en una cohorte adicional de ratones tratados a los tres meses de vida, se valoró la actividad de GAA diafragmática a los nueve meses después del tratamiento. Se observó una media de la actividad de GAA normal de 84,97±38,53 % en los diafragmas tratados. Se vio diferencia no significativa en la actividad de GAA con respecto a la edad en el tratamiento, o con el tiempo después del tratamiento como en el caso de ratones tratados a los tres meses de vida y se analizaron a los 6 meses y 1 año de vida, respectivamente. La tinción con ácido peryódico-Schiff (PAS) de tejido de diafragma también reveló una reducción en la cantidad de glucógeno almacenado en el tejido para todos los grupos de edad tratados.

La contractilidad del diafragma se mejora significativamente después de la administración de vectores rAAV2/1

60 Similar a la población de paciente de Pompe, los ratones *Gaa*^{-/-} tienen una debilidad progresiva de la fuerza contráctil del diafragma en correlación con la duración de la enfermedad. Las relaciones fuerza-frecuencia isométricas del músculo de diafragma aislado de ratones *Gaa*^{-/-} no tratados (n=3 para cada grupo) muestran un descenso significativo en la fuerza contráctil con la edad desde 3 meses a 2 años. Después de la administración mediada por gel de rAAV2/1-CMV-hGAA a diafragmas de ratones *Gaa*^{-/-}, se vio una mejora significativa en la fuerza contráctil en el músculo del diafragma en comparación con los controles no tratados emparejados por la edad. Para los animales que se trataron a los 3 meses de vida, se sostuvo la fuerza contráctil del diafragma significativamente mejorada a los 6 meses (fuerza pico de 24,83±3,31 N cm²) hasta 1 año (21,59±1,59 N/m²) de vida, en comparación con los controles no tratados

emparejados por edad (fuerza pico de $16,53 \pm 0,74$ y $13,94 \pm 1,15$ N/cm² a los 6 meses y 1 año respectivamente). En los ratones tratados a los 9 meses (fuerza pico de $21,28 \pm 1,49$) y 21 meses (fuerza pico de $17,21 \pm 0,29$) de vida, una mejora significativa aún se vio en la función contráctil de los diafragmas tratados, 3 meses de después del tratamiento en comparación con los controles no tratados emparejados por edad (fuerza pico de $12,71 \pm 0,94$ a los 2 años de vida).

La función ventilatoria se mejora después de la administración de vectores rAAV2/1 a ratones con Pompe adultos

Usando pletismografía barométrica, se midieron simultáneamente las características múltiples de ventilación en ratones conscientes, desatados. En este estudio, la ventilación se midió bajo condiciones de normoxia (niveles de oxígeno en aire de respiración normales; $F_{I}O_2$: 0,21, $F_{I}CO_2$: 0,00) y para valorar el intervalo prolongado de la capacidad ventilatoria, bajo condiciones de hipercapnia (mayor que los niveles normales de dióxido de carbono; $F_{I}O_2$: 0,93, $F_{I}CO_2$: 0,07).

Bajo condiciones de normoxia, la ventilación (la relación de volumen tidal/tiempo inspiratorio (V_T/T_i ; ml/s) ($2,2 \pm 0,1$ frente a $1,79 \pm 0,16$), la relación de ventilación por minuto (ml/min) y CO_2 expirado (V_E/VCO_2) ($18,65 \pm 0,73$ frente a $13,3 \pm 0,74$), y el flujo inspiratorio pico (ml/s) ($4,11 \pm 0,17$ frente a $3,21 \pm 0,29$)) estaban todos mejorados ($p \leq 0,05$) en ratones tratados a los 3 meses de vida y ensayados a los 6 meses en comparación con los controles emparejados por edad no tratados. Aunque la correlación de la función ventilatoria en condiciones de normoxia no se sostuvo, ya que ninguno de los parámetros se mejoraron significativamente a un año de vida (9 meses después del tratamiento). Los animales que se trataron a los 9 meses y 21 meses de vida tampoco mostraron ventilación normóxica mejorada tres meses después del tratamiento. Por el contrario, el reto respiratorio hipercápnico dio como resultado la función ventilatoria mejorada en todos los grupos tratados. Como se muestra en la FIG. 14A-FIG. 14D y la 15A-FIG. 15D, para los animales tratados a los 3 meses y ensayados a los 6 meses y 1 año de vida así como en los animales tratados a los nueve meses y 21 meses de vida, se incrementaron significativamente la ventilación por minuto (FIG. 14A-FIG. 14D) y el flujo inspiratorio pico (FIG. 15A-FIG. 15D) por encima de los animales control no tratados emparejados por edad.

La actividad del nervio frénico incrementada después de la administración mediada por gel de rAAV2/1 a diafragma de ratón $Gaa^{-/-}$

Era de interés examinar la actividad del nervio frénico en un animal administrado con rAAV2/1 al músculo del diafragma. Como se muestra en la FIG. 16, la amplitud de ráfaga frénica inspiratoria en un ratón $Gaa^{-/-}$ de 2 años de vida administrado con rAAV2/1-CMV-hGAA por el método de gel a los 21 meses de vida era mayor que la de un animal control no tratado, emparejado por edad, sugiriendo una posible corrección de los déficits neurales potenciales en la enfermedad de Pompe.

Debido a la naturaleza física del diafragma de ratón (tamaño y espesor), se usó un método basado en gel de administración de vector. El vector rAAV2/1 podía propagarse a través del espesor del diafragma, mientras que el vector rAAV2 podía únicamente someter a transducción las primeras pocas capas de células. La propagación del vector se puede atribuir a la cápside que confiere infección diferencial por los receptores celulares y/o circulando a través del tejido por el proceso de transcitosis.

En este estudio, la administración directa del vector rAAV2/1 al diafragma dio como resultado actividad del nervio frénico incrementada en el animal tratado en comparación con el control no tratado. Tomados en conjunto estos resultados indican que la corrección fisiológica de la función del diafragma se puede mediar por terapia génica basada en rAAV2/1 y que animales incluso mayores tanto como 21 meses de vida (indicar que la esperanza de vida promedio de un ratón C57BL tipo silvestre es de aproximadamente 2 años de vida) pueden beneficiarse del tratamiento por terapia génica.

Ejemplo 7 - Los déficits neurales contribuyen a la insuficiencia respiratoria en un modelo de ratón de enfermedad de Pompe

La disfunción respiratoria es un rasgo distintivo de la enfermedad de Pompe y se ve la debilidad muscular como la causa subyacente, aunque hasta ahora no se ha explorado la posibilidad de una contribución neural asociada. En los experimentos descritos en el presente documento, se examinaron los aspectos de comportamiento y neurofisiológicos de la respiración en un modelo animal de ratón de la enfermedad de Pompe - el ratón $Gaa^{-/-}$ - y en una segunda línea transgénica (MTP) que expresa solamente GAA en músculo esquelético. El contenido de glucógeno era significativamente elevado en la médula espinal cervical del ratón $Gaa^{-/-}$, incluyendo en neuronas motoras frénicas marcadas de manera retrógrada. La ventilación, valorada por pletismografía barométrica, se atenuó durante tanto la respiración tranquila como el reto hipercápnico en ratones $Gaa^{-/-}$ (6 a >21 meses de vida) frente a controles tipo silvestre. Los ratones MTP tenían propiedades contráctiles diafragmáticas normales; sin embargo, los ratones MTP tenían ventilación similar a los ratones $Gaa^{-/-}$ durante la respiración tranquila. Los registros neurofisiológicos indicaron que las amplitudes de ráfaga inspiratoria del nervio frénico eferente eran básicamente menores en ratones $Gaa^{-/-}$ y MTP frente a controles. Se concluyó que la respuesta neural para el diafragma es deficiente en ratones $Gaa^{-/-}$, y las terapias dirigidas a solamente músculo pueden ser ineficientes en la enfermedad de Pompe.

Métodos

Animales

5 Los ratones *Gaa*^{-/-} y con hGAA específica a músculo (MTP) se han descrito previamente (Raben *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 10:2039-2047, 2001; Raben *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273:19086-19092, 1998). Los ratones C57B1/6 X 129X1/SvJ emparejados por género simultáneos se usaron como controles para todos los experimentos. Los ratones se guardaron en la "University of Florida specific pathogen-free animal facility". El "University of Florida's Institutional Animal Care and Use Committee" aprobó todos los procedimientos animales.

Pletismografía barométrica

15 La pletismografía barométrica para cuantificar la ventilación (Buxoo Inc., Wilmington, NC) se ha descrito previamente y se adaptó para los ratones. La ventilación se caracterizó en ratones machos y hembras. Los géneros se separaron solamente cuando se detectaron diferencias significativas entre los ratones machos y hembras. Los datos de un subconjunto de los animales usados en estos experimentos se han publicado como controles para una intervención de terapia génica.

20 Niveles en sangre de hemoglobina, hematocrito, glucosa y sodio

Se extrajo sangre venosa de la cola de ratones anestesiados (isoflurano al 2%, O₂ equilibrado) directamente en un cartucho de análisis de gas en sangre comercialmente disponible (I-stat, Heska Corporation; Ft. Collins, CO).

25 Marcación retrógrada de neuronas motoras frénicas

30 Se aplicó trazador retrógrado neuronal Fluoro-Gold® (4 %, Flurocromo, LLC, Denver, CO) a la superficie peritoneal del diafragma (aproximadamente 75 µl) usando un pequeño pincel. Se tiene cuidado en aplicar el trazador con moderación solamente al diafragma para minimizar la fuga a los tejidos del hígado y alrededores. Cuarenta y ocho horas después de la aplicación de Fluoro-Gold®, se extrajo la médula espinal cervical (C₃-C₅), se incrustó en parafina y se seccionó en el plano transversal a 10 µm. Se identificaron las neuronas motoras marcadas con Fluoro-Gold® mediante microscopía de fluorescencia.

Estadística

35 La significancia estadística para este proyecto se determinó *a priori* a $p < 0,01$. Los datos de ventilación se analizaron usando un análisis de 3 vías de la covarianza (ANCOVA). Las relaciones de volumen:peso corporal no se usaron, ya que las relaciones de la masa corporal puede introducir sesgos y este método no tiene el efecto pretendido de la eliminación de la influencia de la masa corporal sobre los datos. Al usar el método ANCOVA, se analizó el peso corporal como un covariado para todos los datos del volumen respiratorio, el cual elimina con más exactitud la influencia del peso corporal sobre los datos. Para las mediciones basales, se usaron género, cepa y edad como factores mientras que los datos de hipercapnia se analizaron usando el género, la cepa y el tiempo (minutos 1-10 de hipercapnia) como factores. La hemoglobina, el hematocrito, la glucosa y el sodio (ratones anestesiados) se analizaron usando la prueba de la *t* de Student. La cuantificación de glucógeno se analizó usando una ANOVA de 2 vías y la prueba de la *t* con la corrección de Bonferroni para mediciones post-hoc. La función contráctil del músculo diafragmático se analizó usando una ANOVA de 2 vías con mediciones repetidas. La amplitud de ráfaga inspiratoria frénica, la frecuencia de respiración y la tasa de aumento de la ráfaga frénica se extrajeron del neurograma frénico. Estas variables y la P_aCO₂ arterial se analizaron con ANOVA de 1 vía y la prueba de LSD de Fischer para análisis post hoc. Todos los datos se presentan como la media ± EEM.

50 El muestreo de la sangre arterial, la cuantificación de glucógeno, la detección de glucógeno histológico en neuronas motoras, las propiedades contráctiles diafragmáticas *in vitro*, y los registros del nervio frénico eferente se realizaron como se describe (Martineau, L, and Ducharme, M.B., *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.*, 37(5):67-72, 1998; Lo *et al.*, *J. Appl. Physiol.*, 28:234-236, 1970; Guth, L, and Watson, P.K., *Exp. Neurol.*, 22:590-602, 1968; Staib *et al.*, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 282(3):R583-90, 2002; Doperalski, N.J. and Fuller, D.D., *Exp. Neurol.*, 200(1):74-81, 2006).

Resultados

60 Características generales de ratones *Gaa*^{-/-}

Los ratones *Gaa*^{-/-} pesaban significativamente menos que sus controles tipo silvestre a todas las edades. Se observaron no diferencias de género en relación con la edad, y los machos pesaban significativamente más que las hembras a todas las edades.

65 Cuantificación de glucógeno y tinción con PAS de la médula espinal cervical

El contenido en glucógeno se elevó a todas las edades en las médulas espinales cervicales (C₃-C₅) de ratones *Gaa*^{-/-}, y las diferencias eran más pronunciadas a los >21 frente a los 6 meses (FIG. 17A). Estos datos se confirmaron en una serie independiente de experimentos en los que los niveles de glucógeno se determinaron en niveles múltiples de la neuraxis.

La histoquímica correlativa también demostró producto de reacción de glucógeno significativo en los cuerpos de célula neuronal de ratón *Gaa*^{-/-} a través de la materia gris de la médula espinal cervical que era especialmente prominente en neuronas motoras (FIG. 17E, FIG. 17F y FIG. 17G). Las neuronas motoras en la médula espinal cervical ventral marcadas de manera retrógrada con Fluoro-Gold® presentaron gotitas de PAS prominentes (glucógeno positivo) por todo el citoplasma del cuerpo celular (FIG. 17G). Las neuronas comparables de las secciones teñidas con PAS de especímenes controles mostraron neuronas con inclusiones virtualmente no PAS positivo (FIG. 17B, FIG. 17C y FIG. 17D).

15 Ventilación

Los ratones *Gaa*^{-/-} parecían estar hipoventilando basándose en la relación ventilación por minuto/CO₂ expirado, lo cual normaliza la ventilación por minuto para la producción metabólica de CO₂. Esta medida se atenuó en la línea base en ratones *Gaa*^{-/-} frente a controles tipo silvestre. La ventilación por minuto basal (no normalizada), la frecuencia de respiración, el volumen tidal, el flujo inspiratorio pico, el flujo expiratorio pico y la relación volumen tidal/tiempo inspiratorio también se disminuyeron en ratones *Gaa*^{-/-} en comparación con los controles a todas las edades estudiadas (Tabla 2, FIG. 18). Las únicas diferencias por edad detectadas eran menor frecuencia a >21 meses (frente a 6 meses) y volumen tidal elevado a >21 meses (frente a 6 meses). Se detectó no mancha por interacción de la edad en los análisis.

Tabla 2: Características de ventilación basal

	Frecuencia (respiraciones/min)	TV (ml/respiración)	MV (ml/respiración)	PIF (ml/s)	PEF (ml/s)	TV/T (ml/s)
6 meses						
Control:	239+/-7	0,27+/-0,00	64,8 +/-3,7	5,9 +/- 0,2	3,4+/-0,2	3,4+/-0,2
<i>Gaa</i> ^{-/-} :	197+/- 6*	0,21+/-0,00*	41,6+/-2,3*	3,3+/- 0,2*	2,2+/-0,1*	1,7+/-0,1*
12 meses						
Control:	252+/-7	0,31+/-0,00	77,3+/-3,4	6,7+/-0,2	4,4+/-0,2	3,9+/-0,2
<i>Gaa</i> ^{-/-} :	186+/-7*	0,23+/-0,00*	43,2+/-2,3*	3,6+/- 0,1*	2,3+/-0,1*	2,1+/-0,1*
>21 meses						
Control:	225+/-7€	0,33+/-0,00€	73,4+/-3,2	6,3+/-0,3	4,6+/-0,2	3,7+/-0,2*
<i>Gaa</i> ^{-/-} :	168+/-7*€	0,25+/-0,01*€	41,8+/-3,8*	3,5+/- 0,3*	2,3+/-0,2*	2,1+/-0,2*

Línea base de sesenta minutos (21 % de O₂, N₂ equilibrado) para la frecuencia, el volumen tidal (TV), la ventilación por minuto (MV), el flujo inspiratorio pico (PIF), el flujo expiratorio pico (PEF) y el volumen tidal: la relación del tiempo inspiratorio (TV/Ti) de ratones control y *Gaa*^{-/-}.

* = *Gaa*^{-/-} diferente del control (p < 0,01).

€ = >21 meses diferente de 6 meses (p < 0,01).

Se usó reto hipercápnico como un estímulo respiratorio para ensayar la capacidad de incrementar la ventilación en ratones *Gaa*^{-/-}. La respuesta hipercápnica era menor para ratones *Gaa*^{-/-} frente a controles a cada edad para la ventilación por minuto (FIG. 18A y FIG. 18B), así como la frecuencia, el volumen tidal, el flujo inspiratorio pico, el flujo expiratorio pico y la relación de volumen tidal/tiempo inspiratorio. Se detectaron diferencias de género solamente en el grupo de los 6 meses de vida, por lo que las hembras tenían una respuesta diferente a la hipercapnia para todas las variables respiratorias ensayadas.

Muestreo de sangre

Tanto la hemoglobina (Hb) como el hematocrito (Hct) eran elevados en ratones *Gaa*^{-/-} (Tabla 3), lo más probable para compensar la insuficiente presión parcial arterial de O₂ (P_aO₂; véase a continuación). Además, los niveles de glucosa y sodio no variaron entre los ratones control y *Gaa*^{-/-}, sugiriendo que las diferencias de Hb y Hct medidas no reflejaban diferencias en el volumen de plasma. Los ratones *Gaa*^{-/-} tenían menor P_aO₂ frente a los controles (Tabla 3),

respaldando el concepto de que estos ratones están hipoventilando.

Tabla 3: Características sanguíneas para ratones $Gaa^{-/-}$ y control de 12 meses

	HEMOGLOBINA (g/dl)	HEMATOCRITO (%)	SODIO (mmol/l)	GLUCOSA (mg/dl)	P_aO_2 (mmHg)
CONTROL:	13,5 ± 0,3	39,8 ± 0,9	144,5 ± 0,8	180,4 ± 16,3	98,5 ± 1,9
$Gaa^{-/-}$: 2,7*	15,3 ± 0,4*	45,0 ± 1,1*	143,4 ± 0,9	176,8 ± 11,4	83,3 ± 2,7*

Los valores de hemoglobina, hematocrito, sodio y glucosa para los ratones control y $Gaa^{-/-}$ a los 12 meses de vida (n=9/grupo). La presión parcial arterial de O_2 para ratones control y $Gaa^{-/-}$ a los 12 meses de vida (n=6/grupo). * = $Gaa^{-/-}$ diferente del control ($p < 0,01$).

5 Ratones con hGAA específica a músculo

A continuación, se cuantificó la función respiratoria en los animales transgénicos con corrección específica a músculo de la actividad de GAA (ratones MTP). Para obtener primero un índice de la función del músculo de diafragma, se midieron las propiedades contráctiles *in vitro* de ratones B6/129, $Gaa^{-/-}$ y MTP. Los ratones control y MTP tenían fuerzas similares, mientras que los ratones $Gaa^{-/-}$ producían fuerzas significativamente menores. Estos datos confirman que los niveles de glucógeno normales en músculo de diafragma de MTP (MTP frente a B6/129; $1,7 \pm 1,3$ frente a $1,4 \pm 0,2$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ww) corresponden a músculo de diafragma que es funcionalmente similar a ratones B6/129.

A pesar del músculo de diafragma funcional aparentemente normal (FIG. 19C), el patrón de respiración estaba alterado en los ratones MTP. La ventilación por minuto durante la línea base era similar en ratones MTP y $Gaa^{-/-}$, y en ambos estaba significativamente reducida en comparación con los ratones B6/129 (FIG. 19A-FIG. 19C). Además, la respuesta a hipercapnia estaba atenuada en ratones MTP, aunque no mostraron una respuesta mayor que los ratones $Gaa^{-/-}$ (FIG. 19B). Los registros gráficos del flujo de aire representativos de ratones B6/129, $Gaa^{-/-}$ y MTP (FIG. 20C) se generaron (FIG. 19C).

Actividad frénica eferente

Para determinar si la ventilación comprometida vista en $Gaa^{-/-}$ y MTP estaba asociada con la respuesta motora frénica reducida, medimos la actividad del nervio frénico eferente en ratones $Gaa^{-/-}$, MTP y control. A niveles de PCO_2 arteriales similares (véase la leyenda, FIG. 20A), los ratones $Gaa^{-/-}$ y MTP tenían amplitudes de ráfaga inspiratoria frénica menores (FIG. 20A y FIG. 20B). Los registros del neurograma de los ratones $Gaa^{-/-}$ y MTP también revelaron menos ráfagas frecuentes, y una pendiente atenuada de la ráfaga inspiratoria integrada (es decir, "tasa de aumento" más lenta, Tabla 4).

Tabla 4: Características neurofisiológicas frénicas

	Tasa de aumento (mV/
Control:	346 ± 86
$Gaa^{-/-}$:	44 ± 15*
MTP:	101 ± 27*

La tasa de aumento para la ráfaga frénica (mV/s), la frecuencia de la ráfaga frénica (respiraciones neurales/s) y la amplitud de la ráfaga frénica (mV) para ratones control de 12 meses de vida (n=8), $Gaa^{-/-}$ (n=8) y MTP (n=6). * = diferente del control ($p < 0,01$)

Este estudio de un modelo de murina de enfermedad de Pompe ha revelado varias observaciones que pertenecen a la deficiencia de GAA y la implicación respiratoria concomitante. Primero, la ventilación se reduce en ratones $Gaa^{-/-}$ por pletismografía barométrica. Segundo, el glucógeno en la médula espinal cervical es elevado en ratones $Gaa^{-/-}$, y las inclusiones de glucógeno prominentes identificadas por tinción con PAS en neuronas motoras cervicales, incluyendo las neuronas motoras frénicas indirectamente identificadas por trazado de Fluoro-Gold® retrógrado. Tercero, los ratones $Gaa^{-/-}$ tienen respuesta frénica atenuada en relación a los controles tipo silvestre. Finalmente, los ratones MTP también presentan deficiencias respiratorias y rasgos del neurograma frénico similares a los observados en ratones $Gaa^{-/-}$, a pesar de la función contráctil diafragmática aparentemente normal (FIG. 21A y FIG. 21B). Estas son las primeras líneas formales de la evidencia que sugiere debilidad respiratoria en el ratón $Gaa^{-/-}$, y por extrapolación en pacientes de enfermedad de Pompe, pueden ser el resultado de una combinación de tanto déficits neurales como musculares.

El glucógeno en exceso dentro de la médula espinal (incluyendo las neuronas motoras frénicas) condujeron a la cuantificación de la amplitud de ráfaga frénica inspiratoria entre los ratones control y $Gaa^{-/-}$ en los experimentos descritos en el presente documento. Se midió la actividad del nervio frénico, la cual es la respuesta motora final del sistema respiratorio. Los mecanismos responsables de la respuesta reducida en ratones $Gaa^{-/-}$ podría resultar de las áreas por debajo de las neuronas motoras frénicas, los cuales incluyen entradas respiratorias (neurales) mayores y/o

deterioros de los aferentes quimiosensoriales debido a los niveles de PaO₂ crónicamente atenuados y los niveles de PaCO₂ elevados propuestos como hipótesis. Sin embargo, se debería indicar que durante las condiciones de impulso respiratorio mayor (PaCO₂ aproximadamente 90 mmHg) ambos grupos eran capaces de incrementar la amplitud de ráfaga inspiratoria frénica, pero los ratones Gaa^{-/-} continuaron teniendo respuestas menores (control: 68,7 mv ± 20,0, Gaa^{-/-}: 14,0 mv ± 4,8). El producto final de la actividad del nervio frénico se alteró en los ratones Gaa^{-/-} demostrando así un déficit neural del control respiratorio.

Para determinar que la disfunción muscular no era el único contribuidor a los déficits de ventilación debido a la deficiencia de GAA, se usó un ratón transgénico doble que expresaba hGAA solamente en el músculo esquelético (mantenido en el entorno de Gaa^{-/-}). Puesto que estos ratones tenían propiedades contráctiles musculares normales, se planteó la hipótesis de que algunas diferencias en la ventilación entre las cepas MTP y control reflejarían disparidad en el control neural de los músculos respiratorios. Coherente con este postulado, la ventilación era similar entre los ratones MTP y Gaa^{-/-} durante la respiración tranquila. Cuando el impulso respiratorio se estimuló con hipercapnia, la respuesta ventilatoria de los ratones MTP aún era menos que la de los controles, pero elevada en comparación con los ratones Gaa^{-/-}. Por tanto, tanto los componentes musculares como neurales contribuyen a los déficits de ventilación bajo condiciones de impulso respiratorio elevado.

Ejemplo 8 - AAV administrado a músculo es capaz de transportarse al cuerpo del nervio motor por la sinapsis con la fibra muscular

Con referencia a la FIG. 22, la FIG. 23 y la FIG. 24, AAV administrado a músculo es capaz de transportarse al cuerpo del nervio motor por la sinapsis con la fibra muscular. En los experimentos en los que los ratones recibieron inyección intratorácica de AAV-CMV-LacZ ($2,18 \times 10^{11}$ partículas) (FIG. 22), el ADN genómico aislado del diafragma contiene gen control después de la administración del vector. En los experimentos en los que los ratones recibieron inyección intratorácica de AAV-CMV-LacZ ($2,18 \times 10^{11}$ partículas), (FIG. 23) el ADN genómico se aisló del núcleo frénico. La FIG. 24 muestra que la ventilación se mejora 4 semanas después de la inyección con AAV-CMV-GAA ($2,52 \times 10^{10}$ partículas).

Ejemplo 9 - Restauración de la integridad de la unión neuromuscular con vectores rAAV2/9

En terapias en desarrollo para las distrofias musculares, existe el reto único de alcanzar simultánea corrección generalizada de todos los tejidos afectados.

Este ejemplo muestra que el vector rAAV2/9 que codifica hGAA da como resultado transporte retrógrado del transgén (GAA humana) a las neuronas motoras, así como transducción eficaz de los músculos esqueléticos, SNC y tejidos cardíacos (Figura 25). Además, la administración de los vectores rAAV2/9-GAA dan como resultado la restauración de la integridad de la unión neuromuscular, y la inversión de la patología axonal en la enfermedad de Pompe. La restauración de los niveles de GAA adecuados en las neuronas motoras proporciona mejora significativa en los parámetros ventilatorios de los animales de Pompe.

(A) Inyección intramuscular o intraespinal directa

En resumen, se colocaron al azar ratones con Pompe de un año de vida (Gaa^{-/-}) en los siguientes grupos: (Gaa^{-/-}) no tratado, AAV2/9-CMV-hGAA, o AAV2/9-DES-hGAA. Animales tratados con AAV2/9 recibieron una inyección intramuscular única de 1×10^{11} gv de vectores en el músculo tibial anterior derecho. Un mes después de la inyección, el músculo tibial anterior y la médula espinal lumbar se analizaron para el número de copias de genoma del vector y la actividad de GAA.

Como se muestra en la Figura 26, se detectaron altos niveles de genomas del vector en el tibial anterior (AAV2/9-DES-hGAA $1,5 \times 10^5 \pm 3,1 \times 10^4$ gv/ug de ADN; AAV2/9-CMV-hGAA $8,4 \times 10^4 \pm 1,7 \times 10^4$ gv/ug de ADN) y médula espinal lumbar (AAV2/9-DES-hGAA $1,5 \times 10^3 \pm 1,7 \times 10^2$ gv/ug de ADN; AAV2/9-CMV-hGAA $2,5 \times 10^3 \pm 1,3 \times 10^3$ gv/ug de ADN), indicando transducción eficaz del músculo esquelético y transporte retrógrado de los vectores AAV2/9. La actividad de GAA en los lisados del tibial anterior era de 2396 % y 1770 % por encima del tipo silvestre en animales AAV2/9-DES-hGAA y AAV2/9-CMV-hGAA, respectivamente ($p < 0,05$). La valoración inmunohistoquímica de las uniones neuromusculares en el tibial anterior reveló una restauración de la integridad en los animales tratados con AAV2/9 (Figura 27).

En este experimento, la expresión específica a tejido del transgén (GAA) se comparó entre el promotor de CMV tradicional y el promotor de Desmina (DES) restringido a tejido. En resumen, la construcción de desmina humana descrita en los experimentos (AAV2/9-DES) contiene tanto un factor potenciador específico a miocito 2 (MEF2) como un elemento potenciador de MyoD. El análisis de los tejidos humanos reveló la expresión de desmina en el cerebelo, endometrio, músculo esquelético, células neuronales del ventrículo lateral y corazón. Esto es ventajoso para las construcciones de AAV ya que la Desmina sirve como un promotor no viral y restringido a tejido en comparación con el promotor de CMV tradicional (expresión celular ubicua, viral). Además, los perfiles de expresión de la médula espinal muestran que se expresa Desmina, haciéndolo un promotor más favorable para conducir los transgenes terapéuticos por vectores AAV.

Los ensayos de actividad enzimática para GAA 28 días después de la inyección demuestran significativos los niveles de enzima y las copias de genoma del vector en el TA y la médula espinal lumbar (Figura 25). La administración directa de AAV2/9 a músculo esquelético da como resultado la transducción eficaz del músculo inyectado y muestra transducción retrógrada de las neuronas motoras lumbares como se muestra por evidencia de las copias de genoma del vector en la región de la médula espinal lumbar, así como la restauración de la integridad de la unión neuromuscular (NMJ) en animales *Gaa*^{-/-}. Los resultados también muestran que la administración intramuscular de vectores rAAV somete a transducción el SNC y los tejidos del músculo esquelético, y por tanto, se puede usar para tratar los componentes del SNC y el músculo esquelético de la enfermedad de Pompe.

Materiales y métodos

Empaquetado y purificación del vector AAV2/9 recombinante.

Las partículas de AAV recombinante basadas en el serotipo 9 se produjeron usando p43.2-GAA y se generaron, purificaron, y valoraron en el "University of Florida Powell Gene Therapy Center Vector Core Lab".

Animales experimentales.

El modelo de animal nuligénico respecto a GAA en exón 6, que representa el fenotipo de músculo cardíaco y esquelético asociado a la enfermedad de Pompe, se usó para examinar la eficacia de transducción de la terapia de GAA mediada por AAV2/9 (AAV2/9-GAA) y la especificidad de construcción del vector.

Se inyectaron ratones *Gaa*^{-/-}/129SvE (*Gaa*^{-/-}) con o bien 20 µl de solución de ringer lactada o con 1×10¹¹gv de rAAV2/9-CMV-GAA o rAAV2/9-DES-GAA diluida en solución de ringer lactada (QS 20 µl).

Unión neuromuscular en la muestra completa.

Se diseccionaron los músculos esqueléticos y se incubaron en α-bungarotoxina (TRITC marcada) durante 10 minutos. Se lavaron y fijaron en paraformaldehído al 4 %. Los tejidos se bloquearon en BSA al 4 % (TritonX al 1 %) y se incubaron con NFH. Los anticuerpos secundarios (Alexa 488) dirigidos frente a NFH se presentaron y los tejidos se montaron para posterior microscopia. Nervios ciáticos.

Los nervios ciáticos se aislaron y se colocaron en los casetes para la fijación de OCT. Las secciones se cortaron a 5 micras y se sometieron a incubación con Ac primaria y secundaria con visualización de NFH, MBP, SMI-32 o H&E.

Extracción de ADN genómico y PCR a tiempo real.

Se usó la PCR para medir la distribución de los genomas de AAV tras la inyección intramuscular en el TA y la médula espinal lumbar. El ADN se aisló usando el kit DNAeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se diseñaron cebadores y sondas para la región poli-A de SV40 del vector AAV.

Ensayo de la actividad de GAA.

Los tejidos se extrajeron, inmediatamente se congelaron de golpe y se almacenaron a -80 °C. Los homogenados se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante se ensayó para la actividad de GAA midiendo la escisión de 4-metilumbeliferil-α-Dglucopiranosido después de la incubación durante 1 hora a 37 °C. La concentración de proteína se midió usando el kit de ensayo de proteína DC Bio-Rad por las instrucciones del fabricante. Los datos se expresaron en relación a los valores medidos en los niveles en tejido de GAA no tratado (% WT).

(B) Administración intraespinal directa

Para someter a transducción directamente la región de la médula cervical y el conjunto de neurona motora frénica, se administraron vectores rAAV-GAA en la región C3-C5 de la médula espinal de los ratones *Gaa*^{-/-} por inyección intraespinal directa.

Como se muestra en la Figura 28, la inyección directa de las construcciones indicadoras de rAAV2/9 en la región C3-C5 de ratón dio como resultado la transducción del conjunto de neurona motora frénica. La administración del transgén terapéutico (GAA) en animales *Gaa*^{-/-} mejoró significativamente la función respiratoria, y la expresión de GAA en el conjunto de la neurona motora frénica se confirmó por detección inmunohistoquímica (Figura 29). La observación de la función respiratoria incrementada era el resultado de la transducción en el SNC sola, ya que las copias de genoma del vector no se detectaron en el diafragma. Los resultados también muestran que la acumulación de glucógeno en el SNC daña la función del músculo esquelético.

(C) Administración intratorácica directa

Con la observación de que la expresión de GAA en el SNC en gran medida mejora la función del músculo respiratorio, los experimentos se condujeron para dirigir tanto al músculo respiratorio (por ejemplo, diafragma y costal) como al SNC (regiones cervicales y torácicas) (Figura 30). En estos experimentos, AAV2/9-CMV-GAA se comparó con AAV2/9-DES-GAA para examinar la eficacia retrógrada del promotor de DES en el SNC.

En resumen, los animales $Gaa^{-/-}$ recibieron una inyección única de o bien los vectores AAV2/9-CMV-GAA o AAV2/9-DES-GAA. La administración de AAV2/9-DES-GAA dio como resultado eficacia de transducción similar o superior de tejidos diana en comparación con AAV2/9-CMV-GAA, y dio como resultado la mejora en la función cardíaca y respiratoria.

La inyección intratorácica en animales $Gaa^{-/-}$ dio como resultado la detección de genomas del vector en el diafragma y en la región C3-C5 de la médula espinal (región de la neurona motora frénica). Los resultados muestran que un fenómeno de transporte retrógrado se da con el uso de vectores AAV2/9.

Para determinar las implicaciones fisiológicas de la transducción de tanto el músculo respiratorio como el SNC, los animales $Gaa^{-/-}$ recibieron una inyección intratorácica única de AAV2/9-CMV-GAA o AAV2/9-DES-GAA, y se sometieron a mediciones neurofisiológicas 6 meses después de la inyección. La medición *in situ* directa del nervio frénico reveló un efecto terapéutico aparente por evidencia de la amplitud de ráfaga incrementada durante las condiciones hipercápnicas y la actividad del EMG del diafragma (Figura 31).

Además, los experimentos se condujeron para determinar si el transporte retrógrado es evidente en el conjunto de neurona motora frénica, lo cual tiene un impacto significativo sobre la función respiratoria apropiada. Uno de los distintivos de la enfermedad de Pompe es la insuficiencia respiratoria. Aunque la insuficiencia respiratoria se cree tradicionalmente que es el resultado de la debilidad del músculo respiratorio, los presentes inventores descubrieron que la insuficiencia respiratoria podría resultar de la deficiencia en la activación del nervio frénico debido a la acumulación de glucógeno.

Para visualizar directamente la transducción retrógrada mediada por AAV en el conjunto de neurona motora frénica, se inyectaron vectores AAV2/9-GFP a animales $Gaa^{-/-}$ por inyecciones intratorácicas. Un mes tras la inyección, los animales se sometieron a perfusión y la médula espinal entera se fijó para el análisis de inmunohistoquímica transversal para la detección y localización de la expresión de GFP.

Como se muestra en la Figura 32, la tinción positiva para GFP se detectó en las regiones C3-C5 y T2-T5 de la médula espinal. El recuadro en cada área es indicativo de la tinción positiva para el conjunto motor frénico (izquierda) y costal (derecha), respectivamente. La Figura 33 muestra que la administración de rAAV-CMV-GAA y rAAV-DES-GAA mejora la propagación de la señal del nervio frénico.

(D) Administración intravenosa

La administración intravenosa de los vectores rAAV-GAA proporciona tratamiento de la enfermedad de Pompe, incluyendo corrección de la disfunción cardíaca y del músculo esquelético. En resumen, se administraron 4×10^8 gv de rAAV2/9-CMV-hGAA a ratones $Gaa^{-/-}$ de un día de vida por inyección intravenosa (IV). La valoración de las mediciones cardíacas (por ejemplo, intervalo P-R, gasto cardíaco, y fracción de expulsión) reveló una mejora significativa en ratones $Gaa^{-/-}$ tratados en comparación con los animales no tratados hasta 6 meses después de la inyección. Adicionalmente, como resultado de la actividad GAA restaurada, la deposición de glucógeno se redujo drásticamente en los tejidos cardíacos y de diafragma de los animales tratados.

En otro experimento, los ratones $Gaa^{-/-}$ de tres meses de vida recibieron una inyección intravenosa única de 1×10^{11} gv (aproximadamente 5×10^6 gv/kg) de AAV2/9-(CMV o DES)-GAA. Las mediciones funcionales cardíacas y de diafragma se condujeron a 3 meses después del tratamiento (6 meses de vida) en paralelo a ratones $Gaa^{-/-}$ no tratados emparejados por la edad y tipo silvestre 129Sve (WT). Los animales tratados con DES-GAA mostraron una mejora marcada en la función cardíaca con niveles similares a WT (Fig. 34A) y la reducción de masa ventricular izquierda. Se midió la función contráctil de tiras de diafragma de $Gaa^{-/-}$ no tratados, AAV2/9-CMV, AAV2/9-DES, y WT, y los resultados muestran función mejorada en grupos tratados con AAV2/9-CMV-GAA y AAV2/9-DES-GAA (Fig. 34F). Los resultados también muestran que la GAA guiada por DES es más eficaz en animales tratados sistémicamente.

Ejemplo 10 - Producción de vectores rAAV usando un sistema basado en HSV

Un obstáculo principal para el uso de rAAV en aplicaciones de terapia génica es la carencia de la capacidad de generar alta producción de vector a alto título y alta pureza. La fabricación de cantidades en el intervalo de 1×10^{14} a 1×10^{15} genomas del vector usando el sistema de producción basada en transfección permanece engorrosa, que requiere tiempo y costosa.

Este ejemplo pertenece a la producción de gran cantidad de vectores rAAV (por ejemplo, rAAV2/9-hGAA) usando una plataforma de producción basada en el sistema tipo I de virus del Herpes simples (HSV). El sistema actual utiliza dos

HSV recombinantes: uno que porta *rep* y *cap* de AAV, o "auxiliar" y el otro que porta el genoma de AAV recombinante que contiene el casete de expresión de transgén. La producción de AAV se inicia tras la coinfección de las células con los dos HSV recombinantes y la recogida generalmente se da dentro de las 52 horas. Las células productoras (HEK293 o BHK21) se pueden cultivar sobre soporte adherente (matraz o fábrica celular) o en suspensión en una tecnología tipo bioreactor Wave.

Un reto adicional para el uso de rAAV en las aplicaciones de la terapia génica es la falta de método de purificación simplificado de alta recuperación, eficaz para los vectores AAV (por ejemplo, AAV2/9). Este ejemplo también proporciona un protocolo simplificado para purificar partículas de rAAV9 de extractos celulares crudos que se pueden aplicar a protocolos de producción a gran escala.

El establecimiento de la plataforma escalable y flexible basada en el sistema de HSV se requiere para la generación de cantidades suficientes de vectores rAAV altamente puros y concentrados (por ejemplo, rAAV2/9-GAA). Las reservas del vector rAAV9 preparadas usando el sistema HSV o el protocolo de cotransfección convencional en células 293 se compararon basándose en los siguientes parámetros: i) la pureza bioquímica de la preparación (es decir, la ausencia de proteínas contaminantes) ii) la relación de partículas infecciosas y físicas; iii) la relación de las proteínas de la cápside VP1:VP2:VP3; e iv) la relación de partículas llenas frente a vacías.

La implementación del método de producción escalable basado en el sistema de HSV y un protocolo de purificación simplificado para AAV9 posibilita la preparación de grandes cantidades de vectores rAAV altamente puros y potentes (por ejemplo, rAAV2/9-GAA) de una manera eficaz en cuanto tiempo y coste. Los vectores rAAV (por ejemplo, rAAV2/9-GAA) fabricados usando el sistema HSV se caracterizan basándose en los niveles de pureza y potencia biológica comparables con, o que superan, los vectores preparados en células HEK293 usando el método de transfección.

La Figura 35 es una representación esquemática de las construcciones de vector del sistema de producción basado en HSV. La figura 36 muestra la purificación simplificada de vectores rAAV por precipitación por pl y cromatografía en columna. La figura 37 muestra la producción de AAV mediante método de coinfección de HSV usando células adherentes.

Preparación de HSV-AAV-hGAA y auxiliar HSV-AAV/rep2cap9.

Se modifican por ingeniería genética dos HSV-AAV-hGAA recombinantes (HSV-hGAA y HSV-coGAA) mediante recombinación homóloga en el locus de la timidina quinasa (*tk*) del vector rHSV-1 defectuoso en la replicación, delecionado ICP27 (proteína 27 celular infectada). AAV-DES-hGAA contiene el ORF en dirección 3' de GAA humana del promotor de desmina y delimitados por las repeticiones terminales (ITR) del serotipo 2 de AAV. AAV-DES-cohGAA contiene una versión optimizada por codon del ORF de GAA humana para la mayor expresión en células eucariotas (GeneArt, Invitrogen).

El auxiliar HSV-AAV9 se genera insertando la secuencia generada por PCR de AAV2 *rep*, y AAV9 *cap* del plásmido pRep2Cap9 (obtenido del Dr. Jim Wilson, UPenn. Los virus recombinantes se cribaron y aislaron por ensayo de placa y se amplificó más por propagación clonal sobre células V27, células Vero-derivadas que suministrar ICP27.

Métodos para generar rHSV.

Los virus HSV se recuperan del sobrenadante celular y además se filtran y se concentran antes de la titulación. Las producciones de rAAV a pequeña y media escala se conducen en o bien cultivo de HEK293 en matraces (T225 o fábrica celular) o en células BHK adaptadas a suspensión en cultivos rotatorios (hasta 1 l o aproximadamente 1×10^9 células). Las células se coinfectaron con rHSV-hGAA (o rHSV-cohGAA) y rHSV-rep2/cap9 WVBs a MOI apropiada. Las células se recogieron a aproximadamente 52 horas después de la infección. AAV9 se purifican usando nuestro método de purificación convencional que usa congelación-descongelación y gradiente de iodixanol, seguido de la centrifugación usando dispositivo centrífugo Apollo. Las reservas se analizaron para el título del genoma vector por Q-PCR y para la pureza por SDS-PAGE teñida con plata.

Un método de purificación alternativo para la producción a media escala ($>1 \times 10^9$ células) implica preparar lisados crudos celulares mediante microfluidización y purificar partículas AAV9 mediante precipitación por pl y cromatografía en columna. Durante el proceso y el desarrollo, los métodos anteriormente descritos así como los lotes pequeños de AAV9 preparados en HEK293 mediante transfección de CaPO₄ convencional se evaluaron con respecto a producción/célula, relación vacías/llenas, pureza y relación unidades de partícula e infecciosas.

La ampliación del formato basado en suspensión es necesaria para la producción de rAAV9 a gran escala. En resumen, las células sBHK se cultivan en cultivos rotatorios (1 l y más) o bioreactor desechable tipo Wave de 10 l y más (Wave™, GE Healthcare) y se coinfectaron con rHSV-hGAA y rHSV-rep2/cap9 WVBs. Las ventajas del sistema BHK de suspensión es una densidad celular incrementada (hasta 2×10^9 célula/l) y aporte de HSV inferior (o MOI), que da como resultado un incremento neto de la producción de rAAV. Después de aproximadamente 52 horas, las células y el sobrenadante se sometieron a lisis *in situ* y se aclararon por filtración profunda y filtración absoluta. A continuación,

el lisado aclarado se concentró y se formuló a un tampón apropiado por filtración de flujo tangencial (TFF) antes de la purificación adicional.

Progreso en la purificación de los vectores AAV9.

5 Los inventores han desarrollado un novedoso protocolo de purificación de AAV (por ejemplo, AAV9) basado en precipitación por punto isoeléctrico (pI). El protocolo de purificación es aplicable a los lisados crudos a gran escala (>1×10⁹ células). Usando las condiciones empíricamente establecidas, la mayoría de las proteínas en lisados celulares crudos generados a partir de células HEK293 transfectadas se precipitan selectivamente, mientras que se retienen más del 95 % de rAAV9 en solución. A continuación, un rAAV9 previamente purificado se somete a cromatografía de intercambio iónico en sefarsa 5 ml de SP (HiTrap SP HP, GE Healthcare), y las fracciones del pico de elución se centrifugaron por el filtro de 150 de corte kD Apollo. Las partículas de alto peso molecular de AAV9 se retienen y concentran, mientras que las proteínas de tamaño más pequeño presentes después de la cromatografía con SP se retiran. Este protocolo simplificado da como resultado vector altamente purificado, y se retiene casi el 80 % de los virus originalmente presentes en el lisado crudo.

Ensayos de control de calidad.

20 Se valoraron la identidad, la pureza, los títulos del genoma del vector y los títulos de infectividad de preparaciones de rAAV9. La identidad bioquímica y la pureza se determinaron usando técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida. Las proteínas de cápside de AAV VP1, 2 y 3 se visualizaron por tinción con plata o azul de coomasie en presencia de controles apropiados. El nivel de impurezas se cuantifica por imágenes del gel utilizando el programa informático Quantity-One (Bio-Rad). Los títulos del genoma del vector se determinaron usando un protocolo de PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR) establecida que utiliza cebadores para la secuencia señal de poliadenilación de SV40 específica al genoma del vector. El ensayo de título infeccioso se realiza coinfectando células C12 (células HeLa que expresan AAV2 Rep y Cap) con preparaciones de rAAV9 y adenovirus WT. Las células infectadas se atraparon posteriormente sobre filtros de nitrocelulosa y se sondaron para transgén (ADNc de GAA) y solamente células que se han infectado productivamente con rAAV producen una mancha invisible sobre la película. La relación entre las cápsides llenas y vacías se determina mediante microscopía electrónica.

30 *Ejemplo 11 Tratamiento de la patología de la unión neuromuscular con vectores rAAV2/9*

En pacientes con enfermedad de Pompe, no hay contacto entre el nervio y los receptores de acetilcolina, indicando la presencia de patología de unión neuromuscular (NMJ). Como se muestra en la Figura 41, los animales *Gaa*^{-/-} tienen mala adaptación en la unión neuromuscular y en los nervios periféricos. Hay un incremento en la matriz extracelular y pérdida axonal en el nervio ciático de ratones con Pompe (FIG. 42). También, se examinaron la NMJ en los diafragmas de animales tipo silvestre y *Gaa*^{-/-} de nueve meses de vida. En animales con Pompe, hay un incremento significativo en el tamaño del receptor de acetilcolina del diafragma cuando se compara con los animales tipo silvestre (FIG. 41). También, alteraciones importantes son evidentes en la membrana presináptica en el diafragma de ratones *Gaa*^{-/-}. La sinaptotagmina se marca para identificar la hendidura presináptica en NMJ (FIG. 43). Hay una pérdida notable de la expresión de la sinaptotagmina en los animales con Pompe.

45 Los animales *Gaa*^{-/-} se inyectan con vectores AAV2/9 que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica *Gaa* (1×10¹¹gv) o vehículo (véase la FIG. 44 para el diseño experimental). El tratamiento de los animales *Gaa*^{-/-} con vectores AAV2/9-GAA atenúa la patogénesis de NMJ en los modelos específicos a tejido de la expresión de *Gaa*.

50 En un ratón *Gaa*^{-/-} de 23 meses de vida, dos meses después de la inyección de los vectores AAV2/9-DESMIN-GAA directamente en el músculo tibial anterior derecho, el tamaño del receptor de acetilcolina (AChR) en la pierna inyectada y la pierna contralateral se miden (FIG. 45). Los resultados muestran un descenso en el tamaño de los receptores de la acetilcolina en la pierna del ratón *Gaa*^{-/-} inyectado con AAV2/9-DESMIN-GAA. Los animales *Gaa*^{-/-} muestran un incremento significativo en el tamaño del AChR, mientras que un descenso en el tamaño del AChR después del tratamiento con AAV2/9-DESMIN-GAA proporciona efectos terapéuticos positivos frente a la patología de NMJ. Los resultados muestran que el tratamiento con AAV2/9-GAA se puede usar para restaurar o aumentar la transmisión neuromuscular entre el nervio frénico y el diafragma. Además del tratamiento con AAV-GAA, también se pueden administrar inhibidores de acetilcolinesterasa (ACI) para mejorar la liberación de neurotransmisor en sujetos con enfermedad de Pompe.

60 Además, para determinar la eficacia retrógrada de AAV2/9 y el potencial para la reorganización de la NMJ, los vectores AAV2/9-DES-GAA se inyectan directamente en el tibial anterior (TA) de *Gaa*^{-/-} por la vía intramuscular. La FIG. 46 muestra la pérdida de la integridad pre y post-sináptica de la NMJ en animales afectados (*Gaa*^{-/-}) en comparación con el tipo silvestre. La FIG. 46 también muestra la reorganización de la NMJ en un animal con Pompe tras la administración de AAV2/9-DES-GAA intramuscular. El seccionado longitudinal del correspondiente nervio ciático AAV2/9-GAA revela una señal incrementada en la marcación de la proteína 43 (Gap43) asociada a crecimiento (FIG. 47). Gap43 se ha asociado a la regeneración axonal, la potenciación a largo plazo, y es un componente crucial del terminal presináptico. 65 Los efectos positivos del tratamiento están mediados por alto número de copia de genoma del vector y la expresión de GAA en el sitio de inyección (TA) y en la médula espinal lumbar.

5 Como se muestra en la FIG. 48, las inyecciones intraespinales (C3-C5) de AA2/5V-GAA se realizaron a animales $Gaa^{-/-}$ para dirigir el conjunto de neurona motora frénica. Los animales tratados con vector demuestran altos niveles de GAA en el sitio de inyección, reducción de glucógeno, y función respiratoria mejorada a niveles cerca de los valores de tipo silvestre (FIG. 48).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Pompe, en donde la composición comprende un vector rAAV2/8, en la que el vector rAAV2/8 comprende una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica α -glucosidasa ácida, en donde el ácido nucleico heterólogo está unido de manera operativa a un promotor de desmina, un elemento potenciador del factor potenciador específico al miocito 2, y un elemento potenciador de MyoD, en donde la composición se administra a un sujeto que lo necesita, mediante inyección intramuscular, intratorácica, intraespinal, intratecal, intracisternal o intravenosa.
- 10 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al sujeto se le administra además un inhibidor de acetilcolinesterasa.
3. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el sujeto es un ser humano.

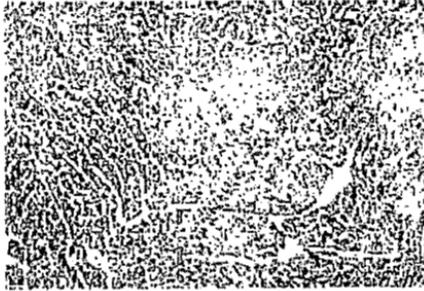


FIG. 1A



FIG. 1B



FIG. 1C

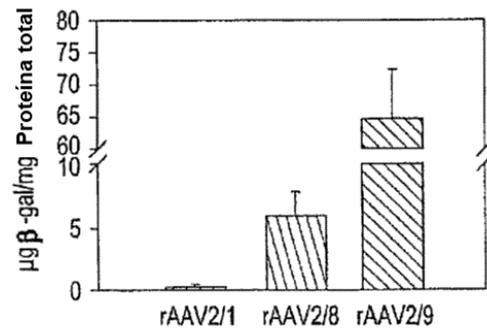


FIG. 1D

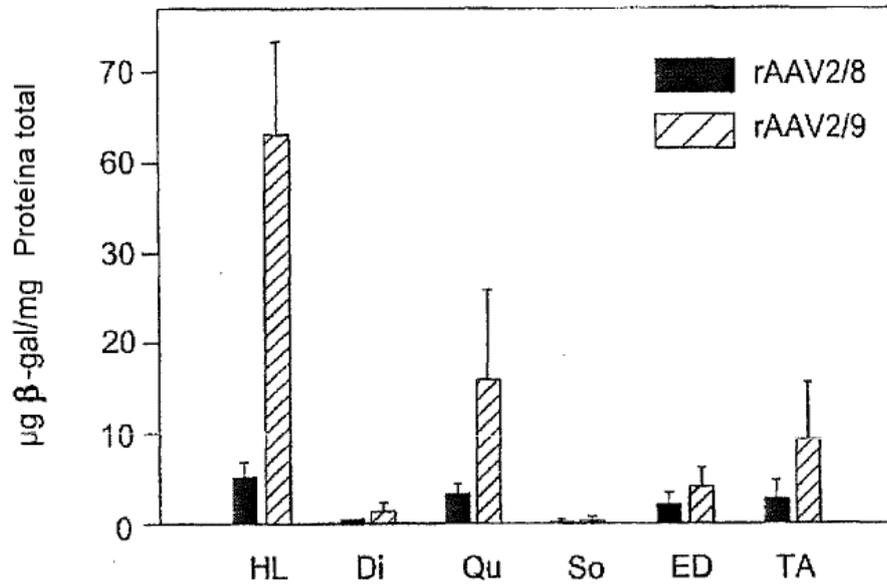


FIG. 2A

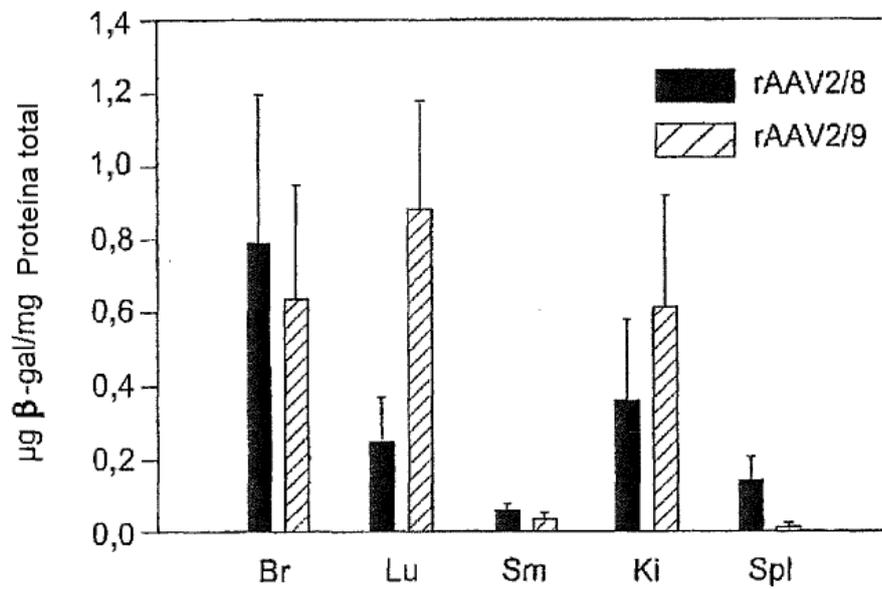


FIG. 2B

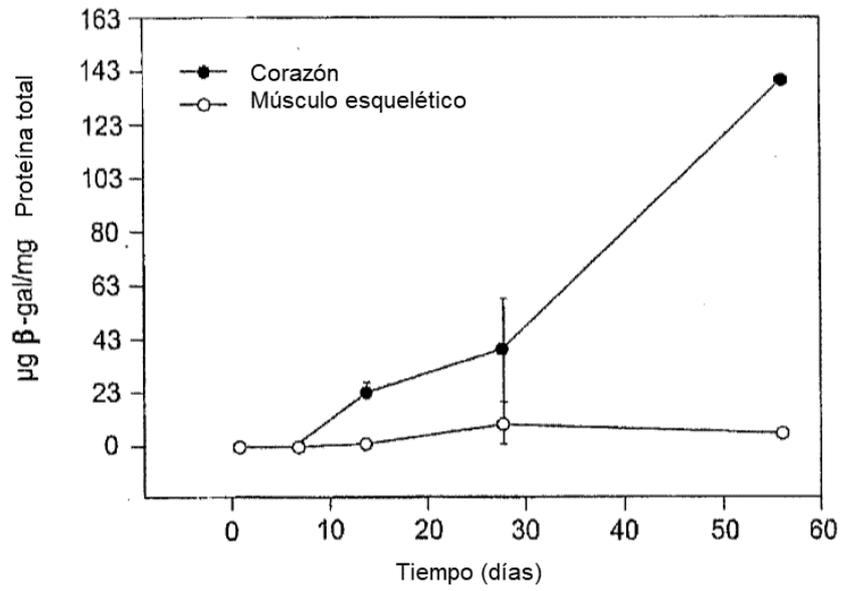


FIG. 3A

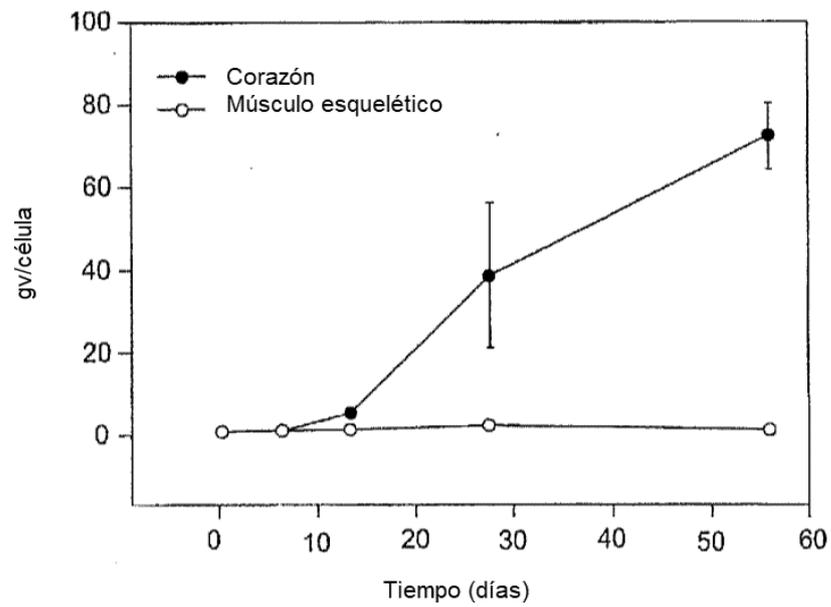


FIG. 3B

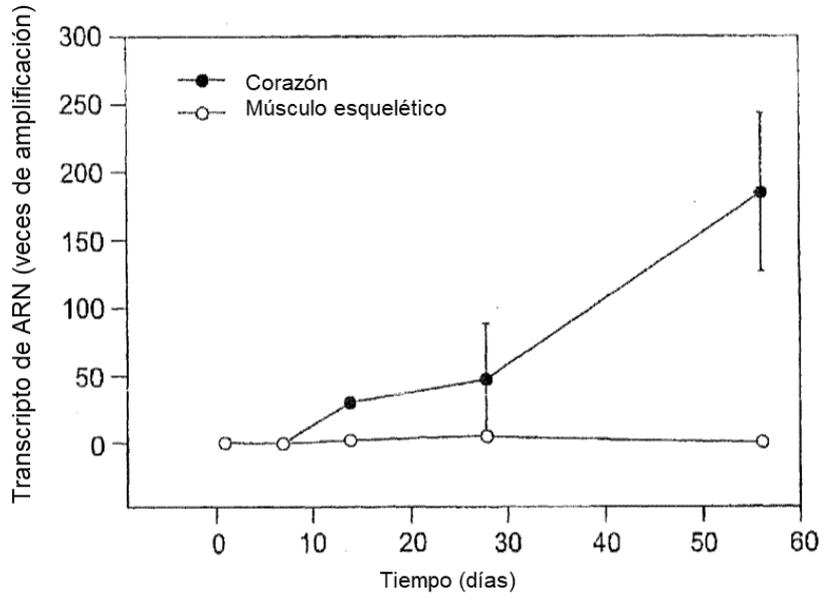


FIG. 3C

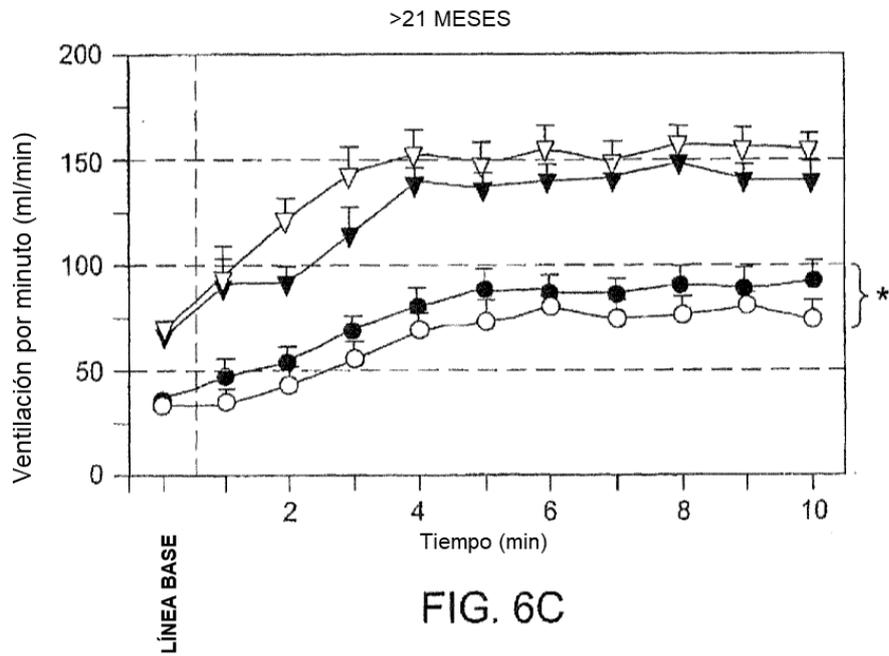


FIG. 6C

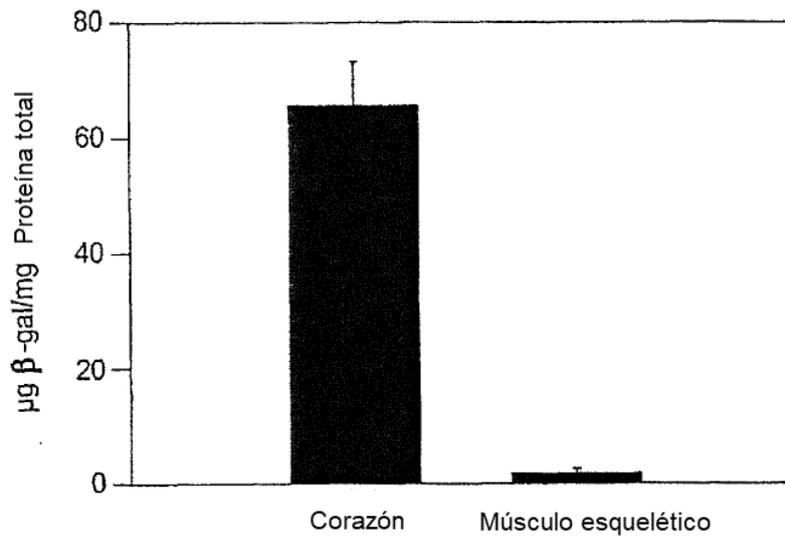


FIG. 4A

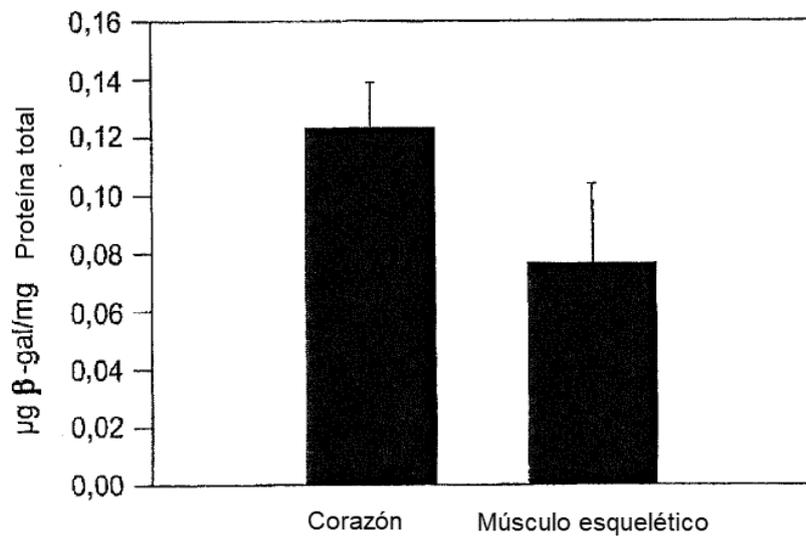


FIG. 4B

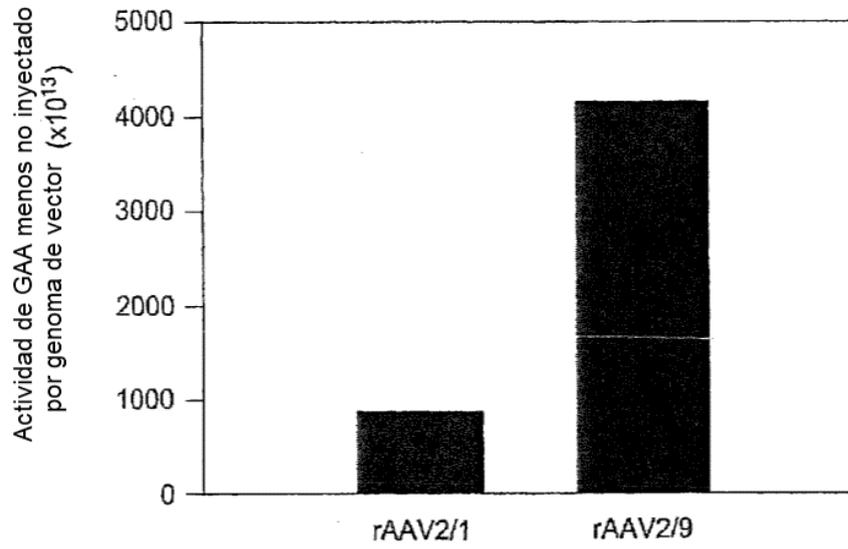


FIG. 5A

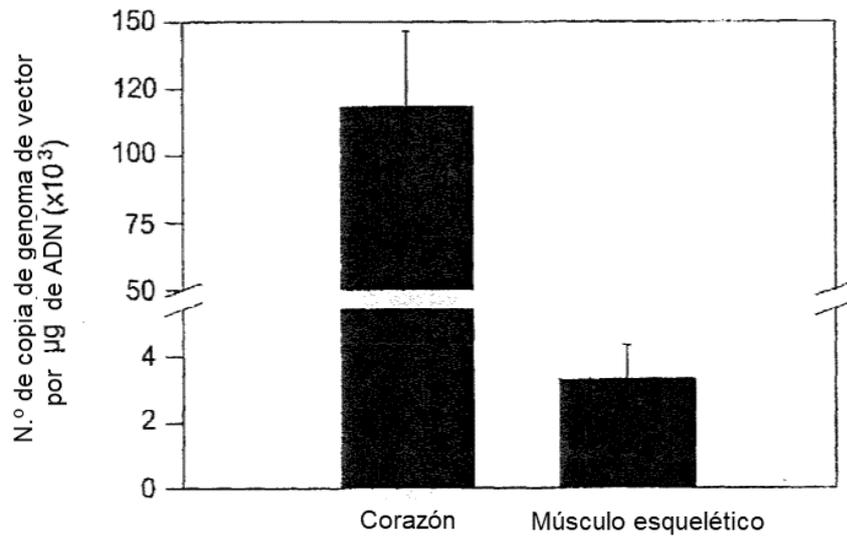
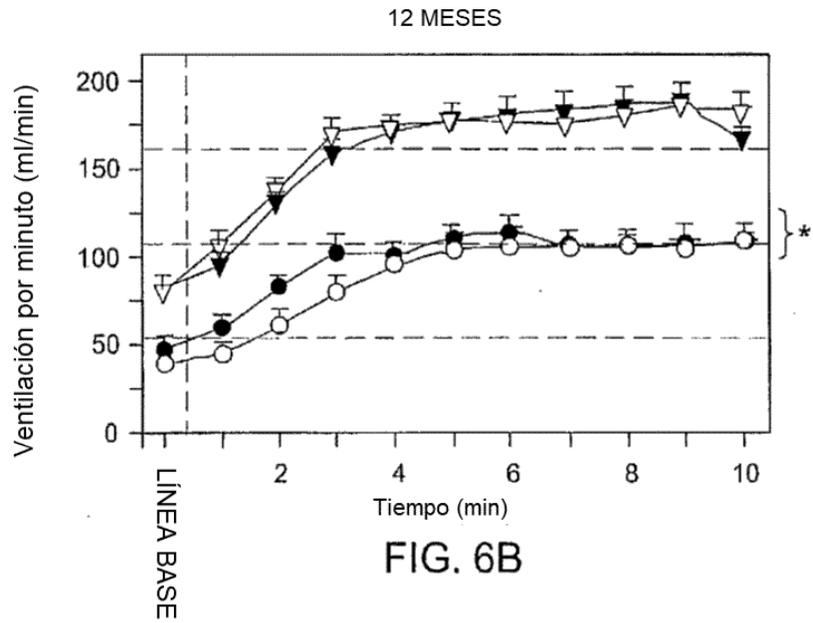
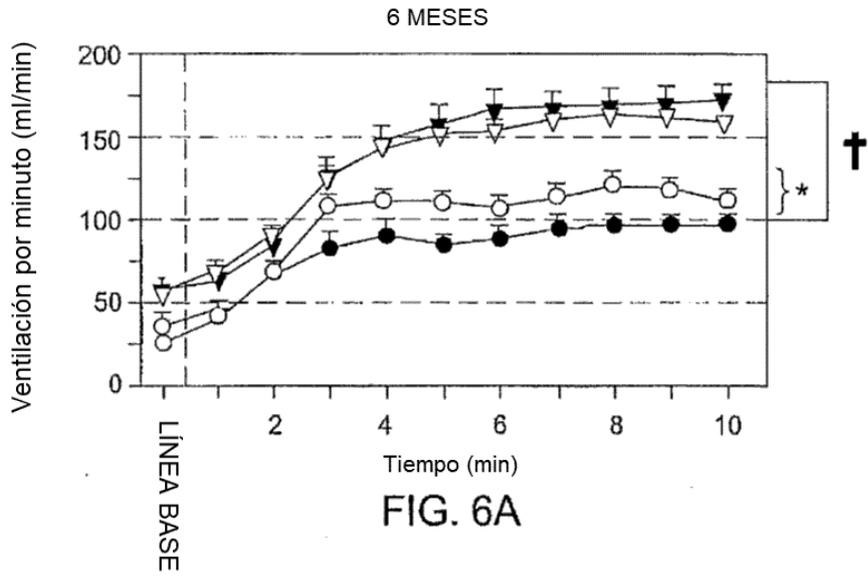


FIG. 5B



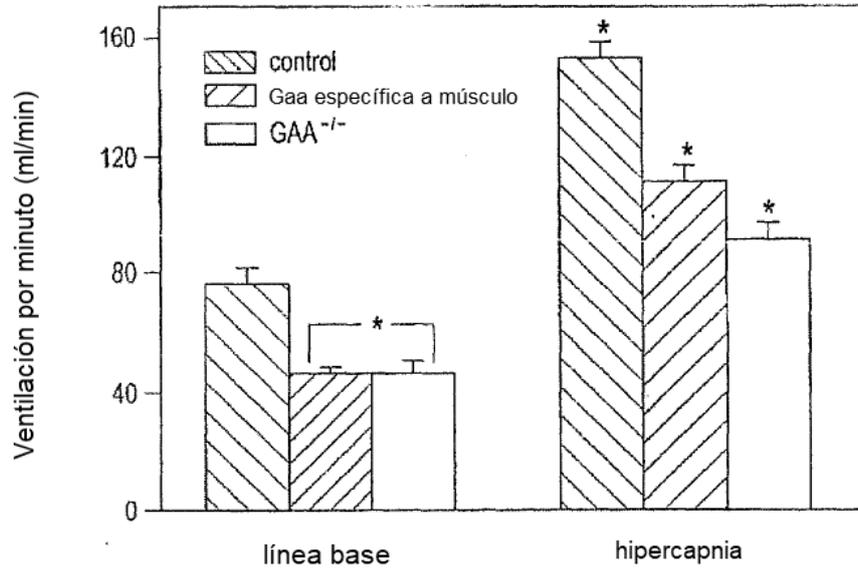


FIG. 7A

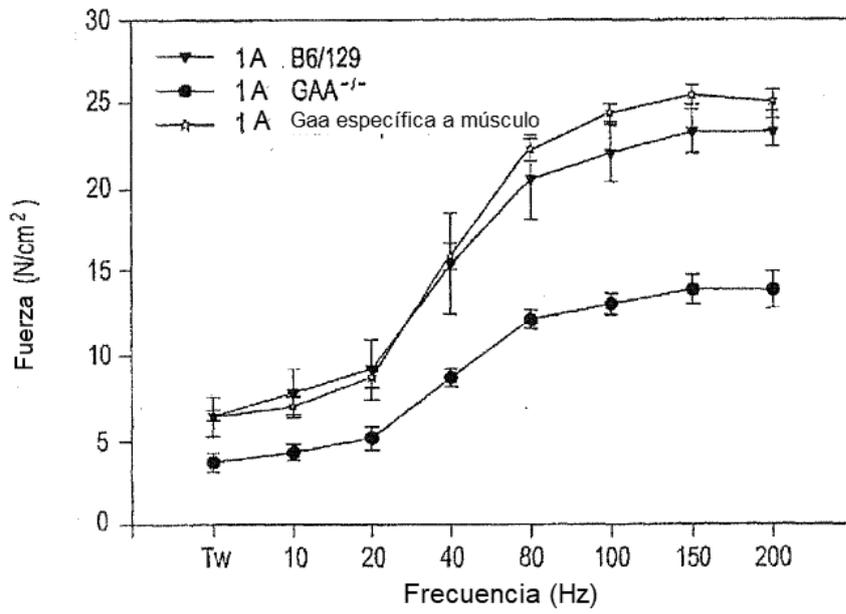


FIG. 7B

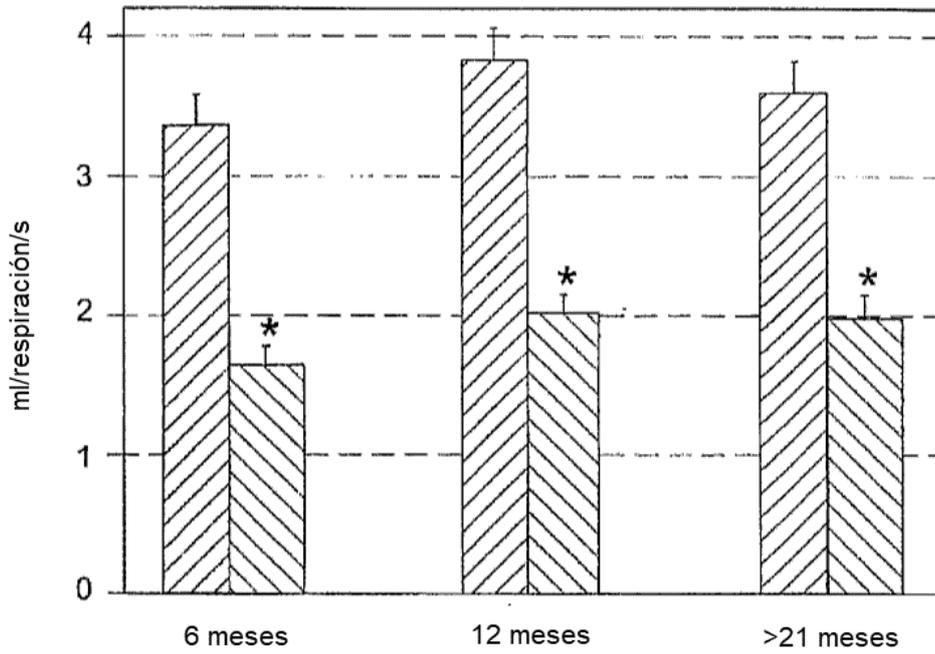


FIG. 8

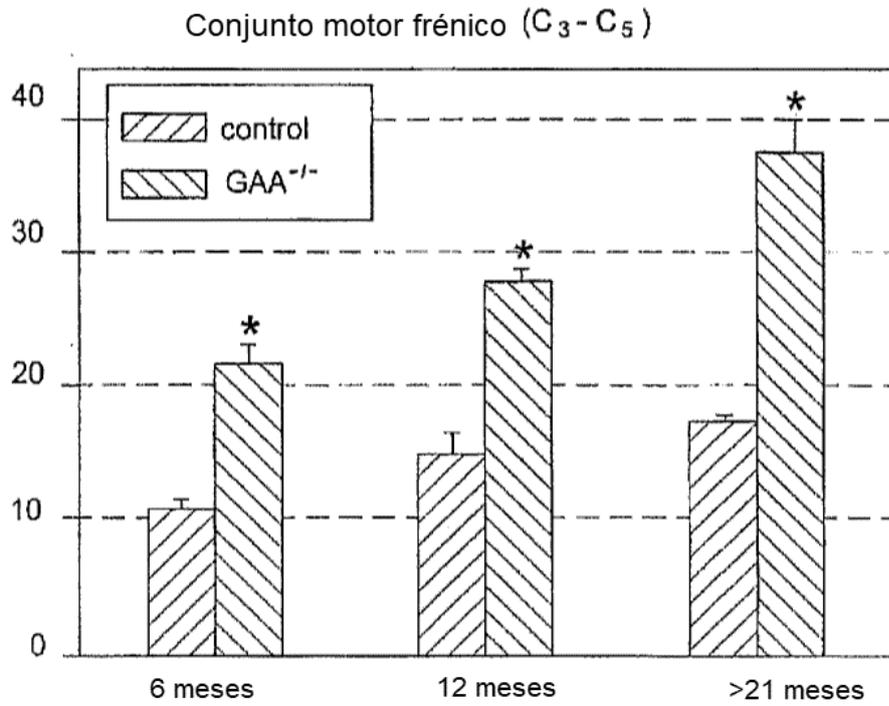


FIG. 9A

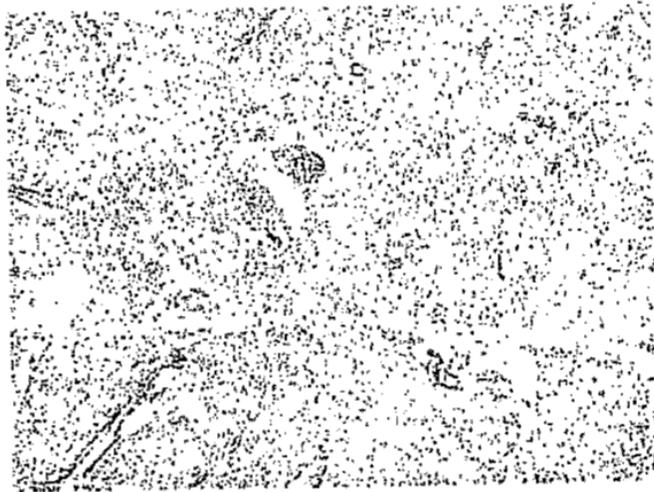


FIG. 9B

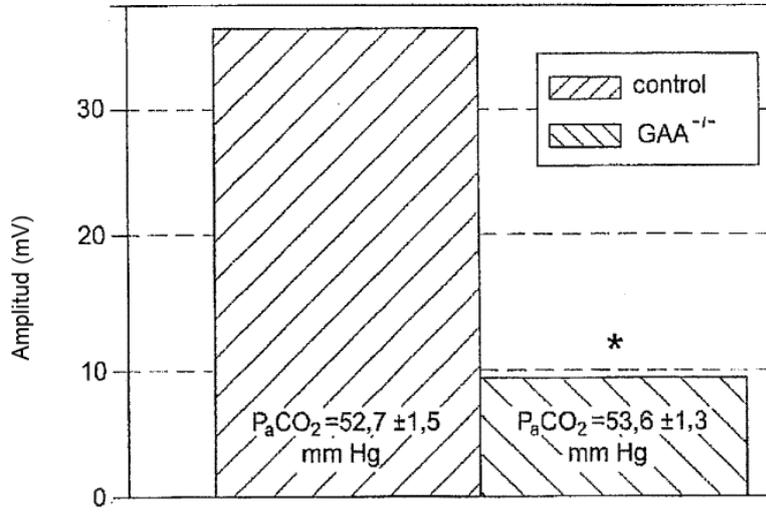


FIG. 10A

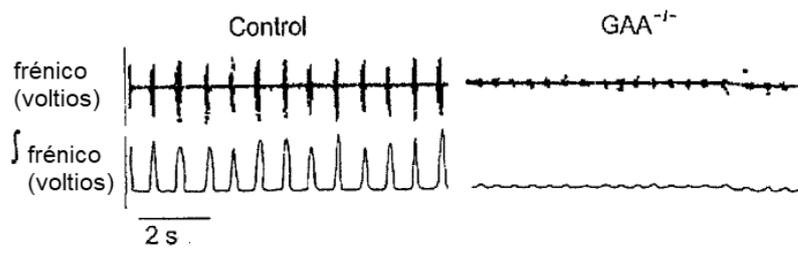


FIG. 10B

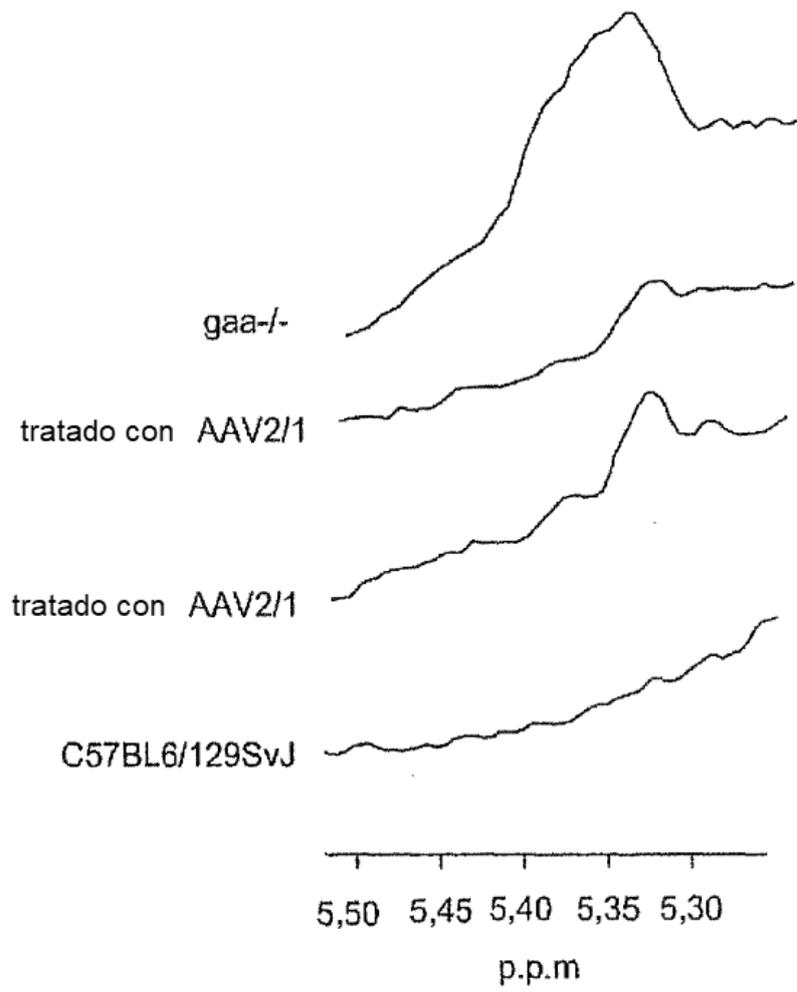


FIG. 11

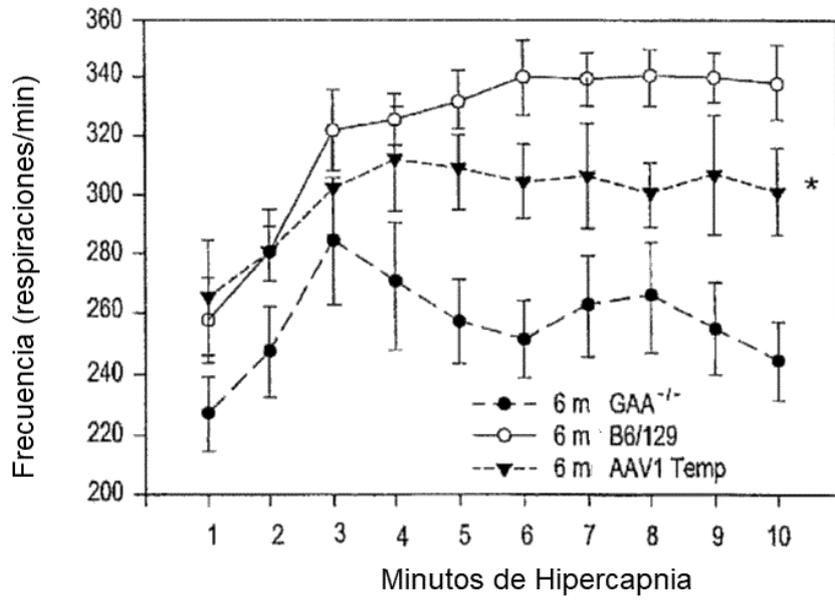


FIG. 12A

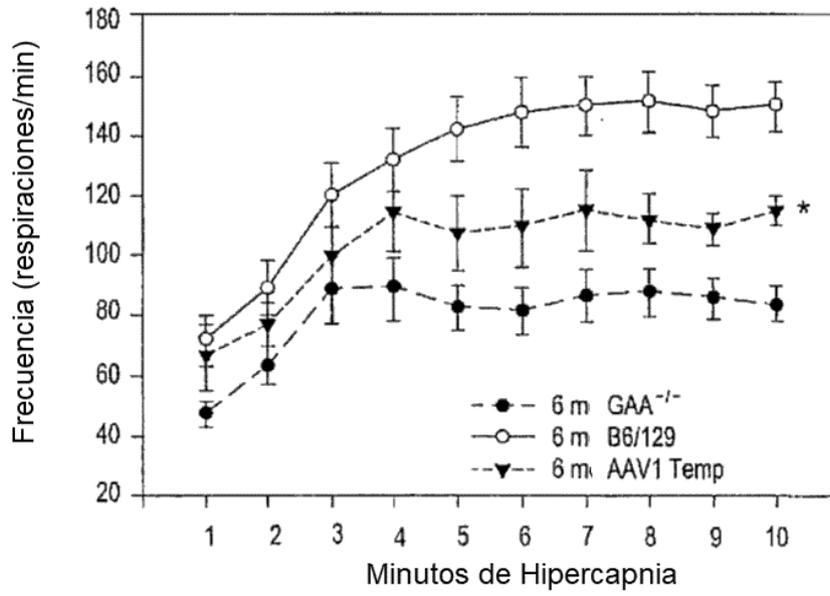


FIG. 12B

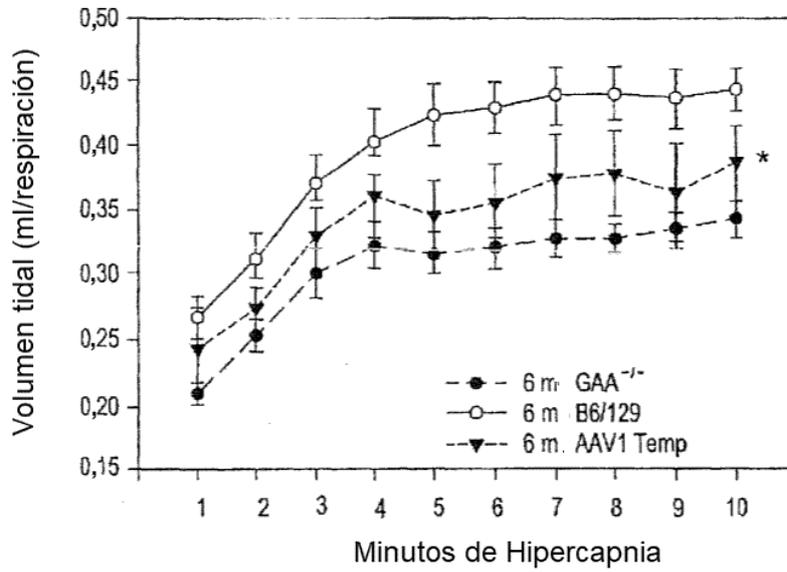


FIG. 12C

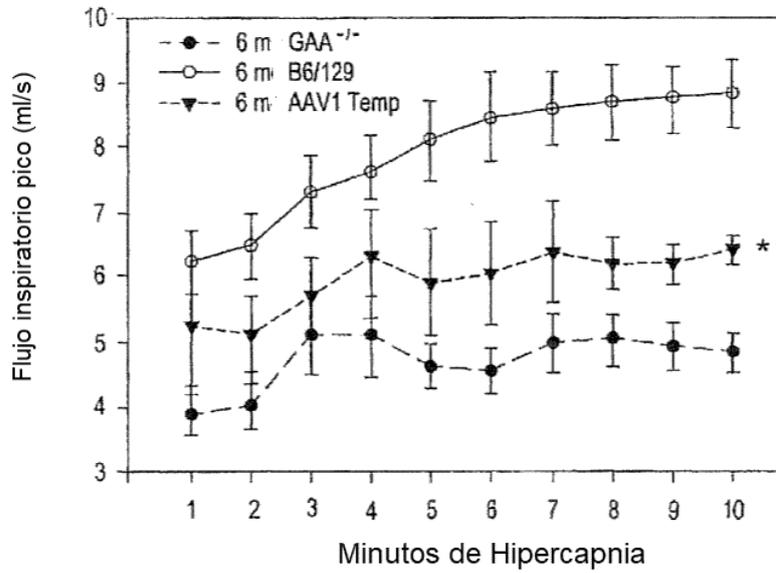


FIG. 12D

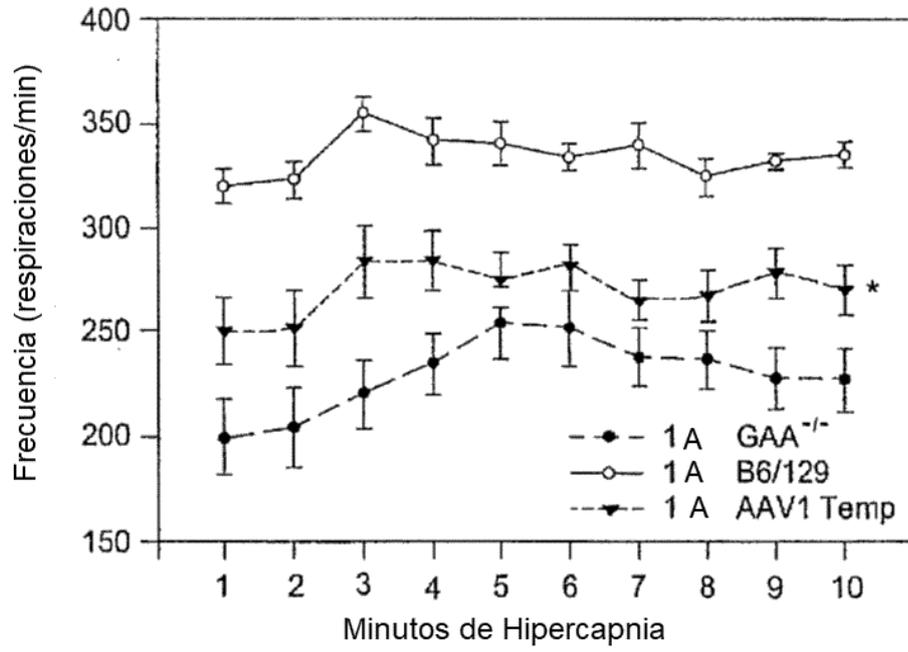


FIG. 13A

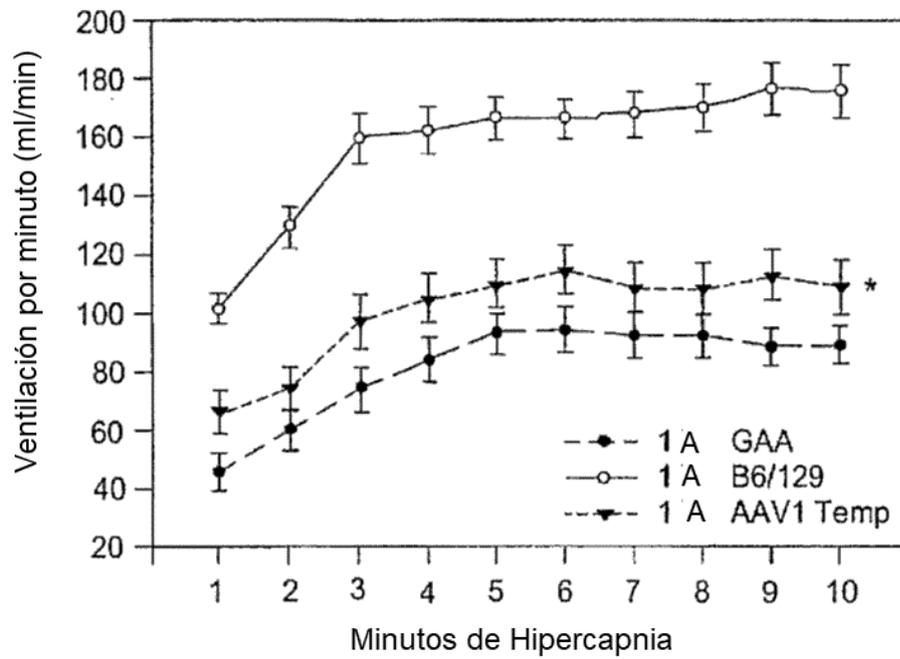


FIG. 13B

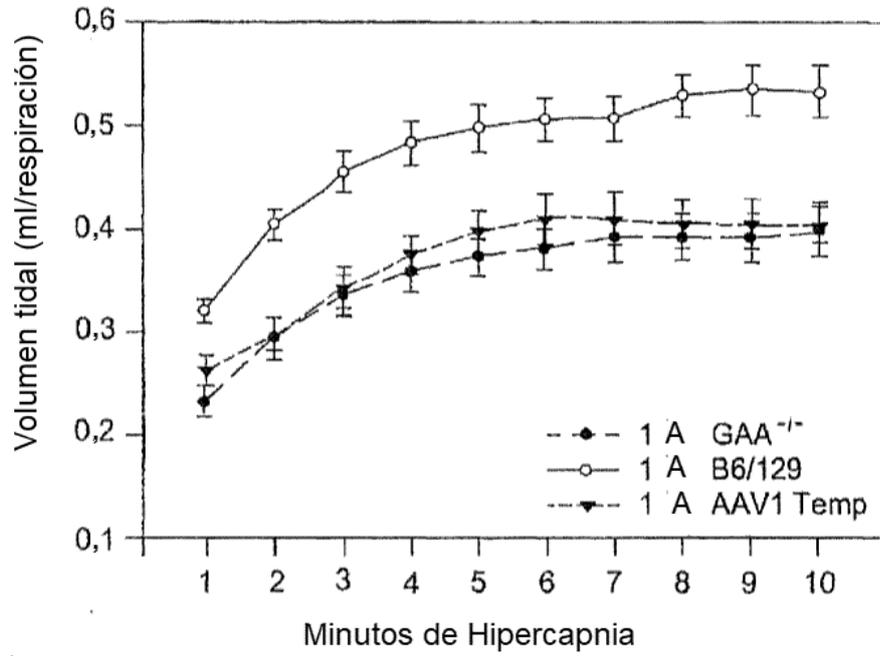


FIG. 13C

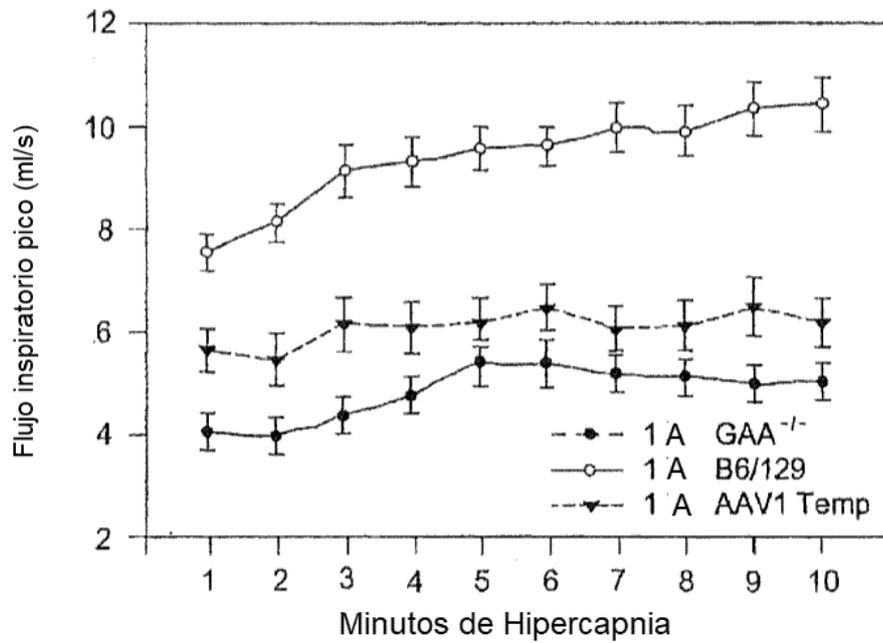


FIG. 13D

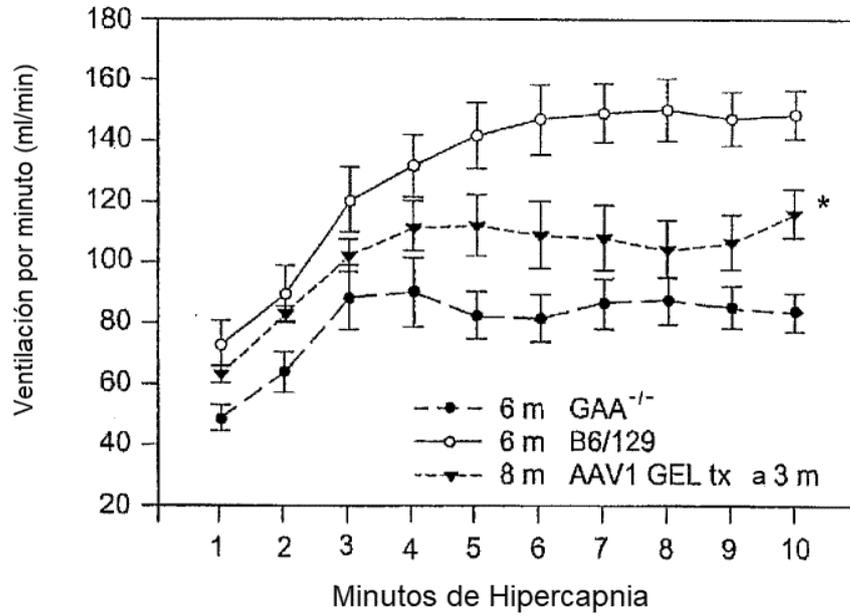


FIG. 14A

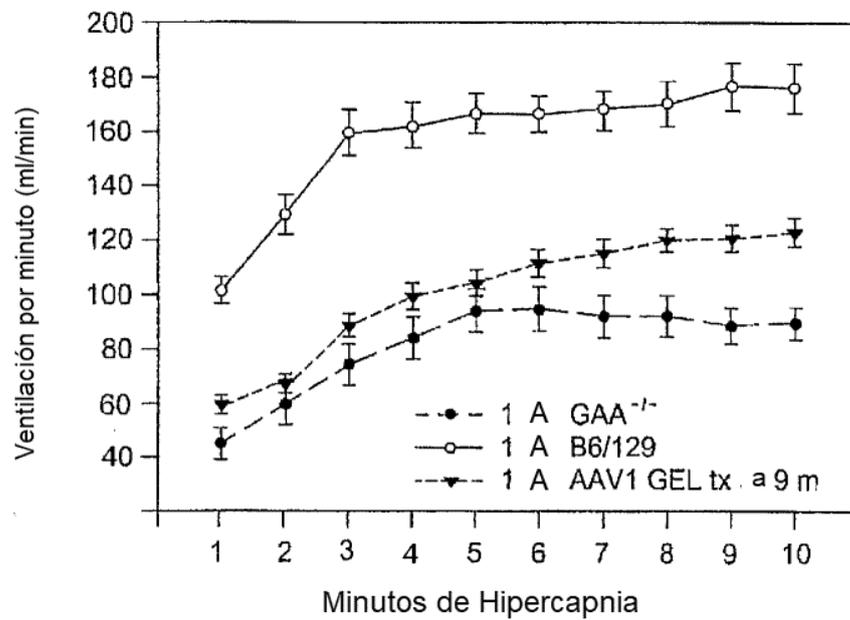


FIG. 14B

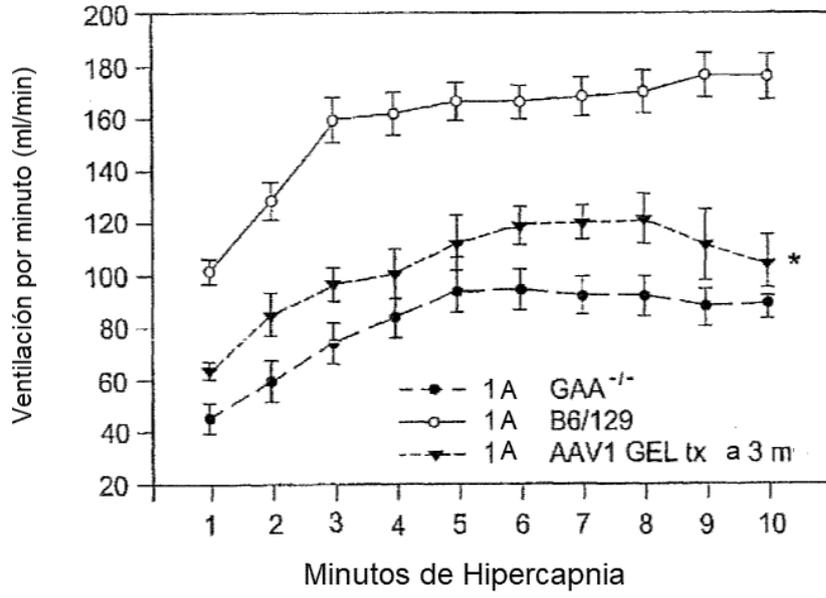


FIG. 14C

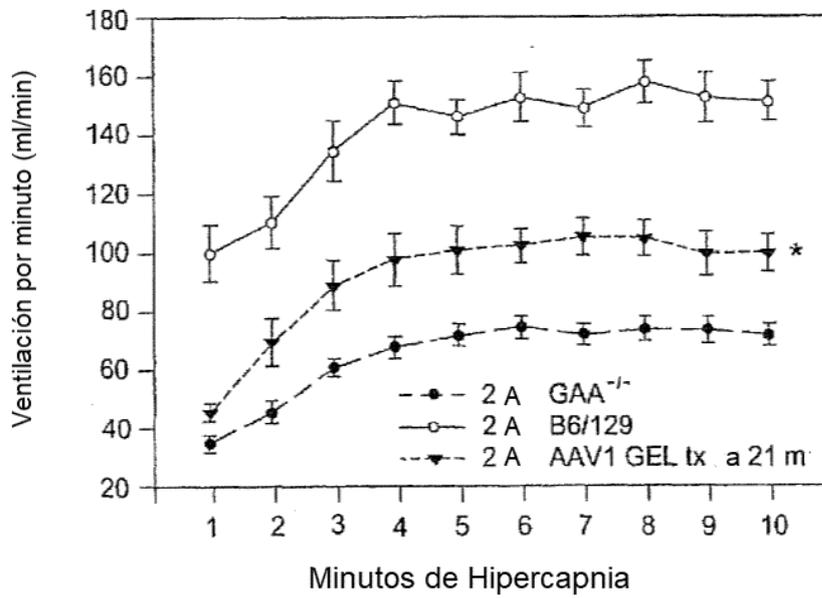


FIG. 14D

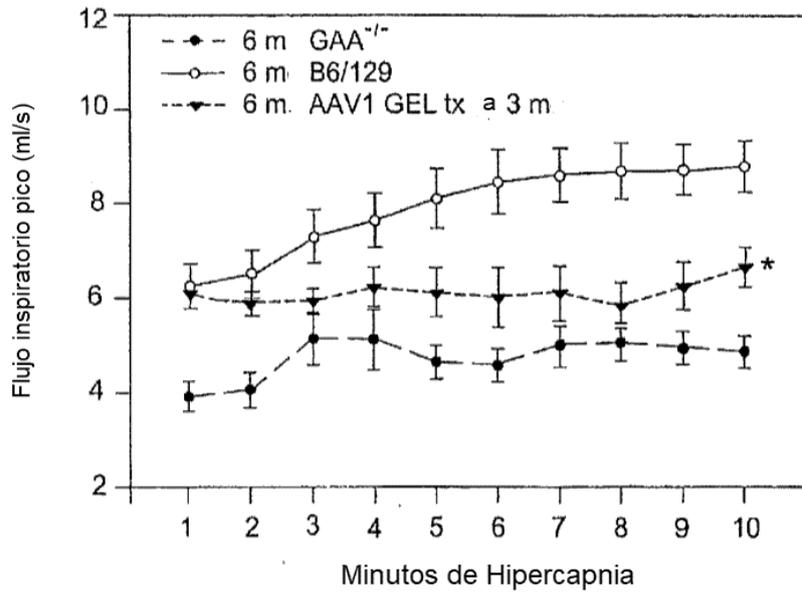


FIG. 15A

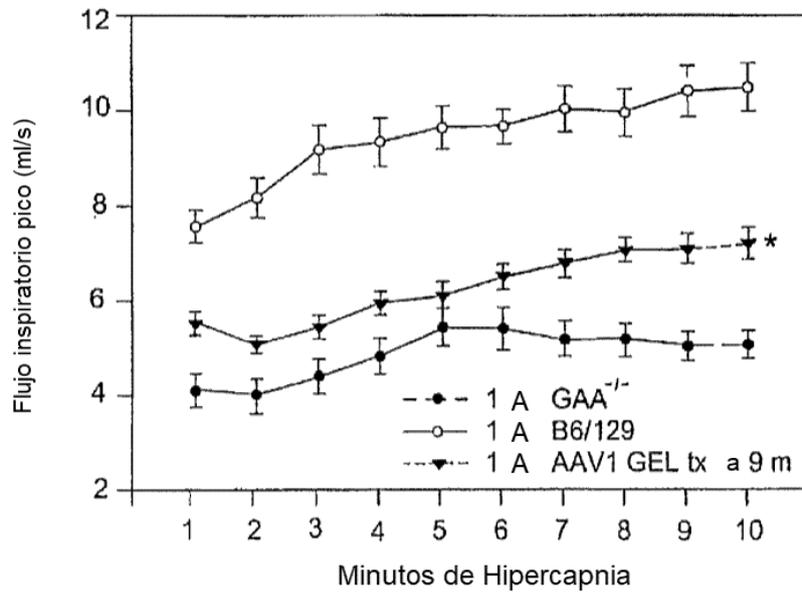


FIG. 15B

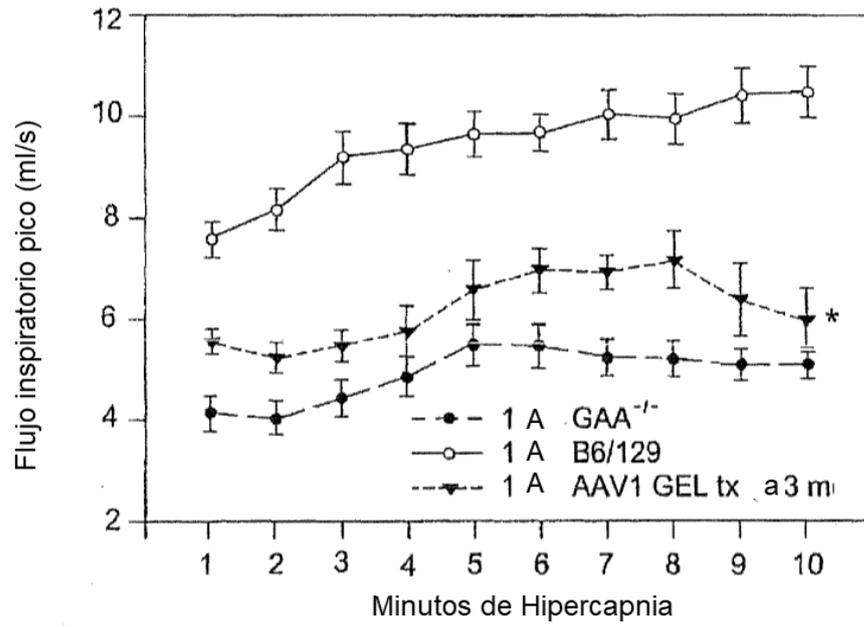


FIG. 15C

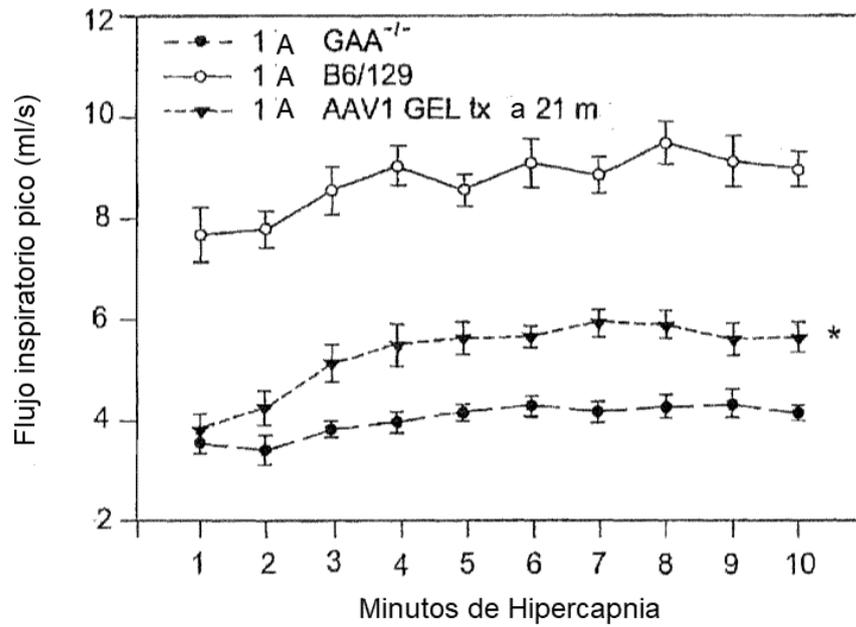


FIG. 15D

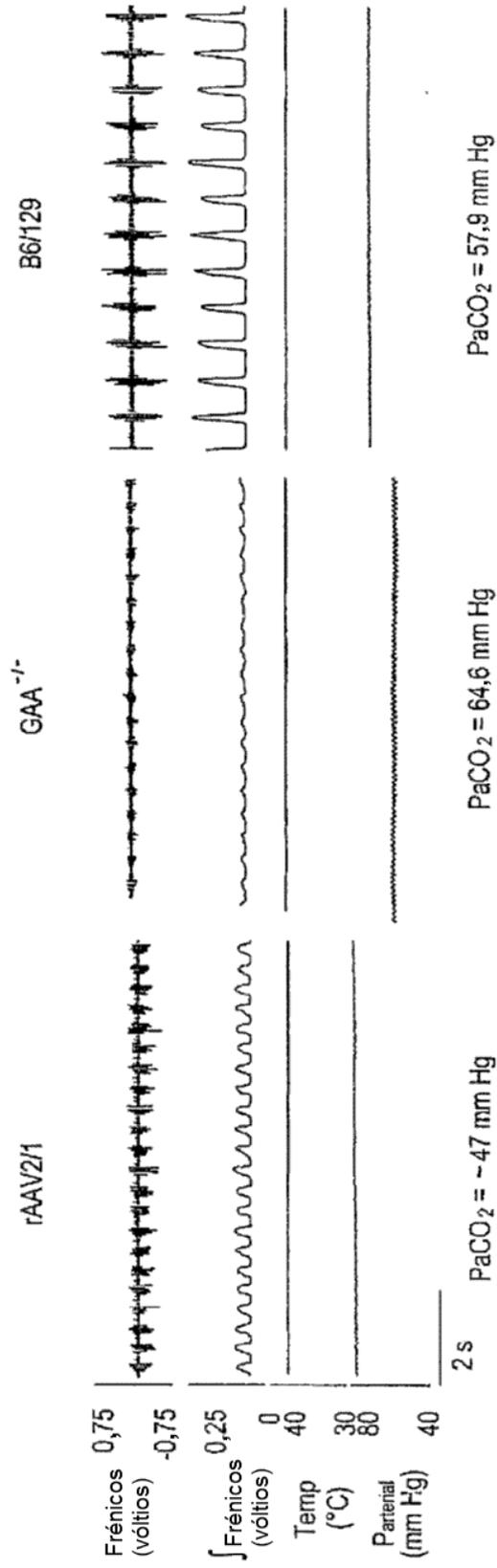


FIG. 16

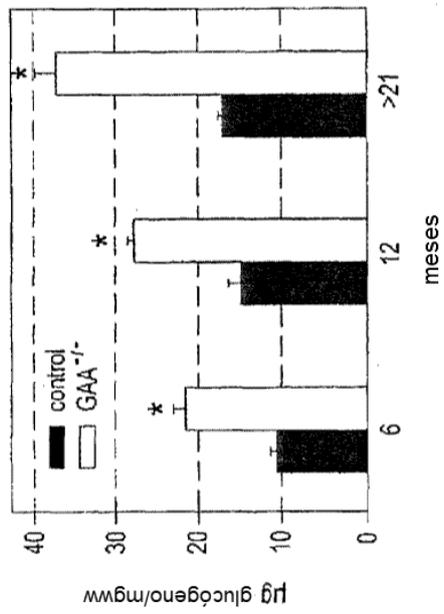


FIG. 17A

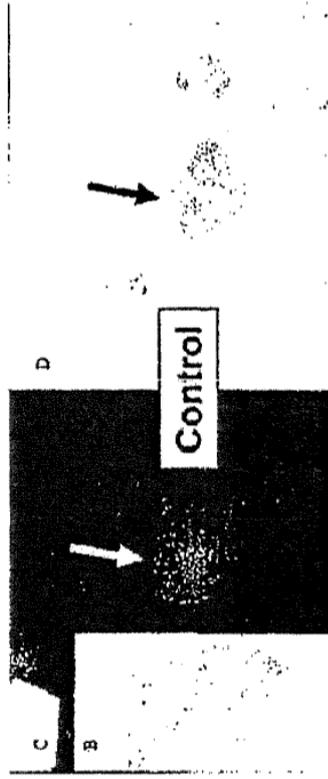


FIG. 17B

FIG. 17D

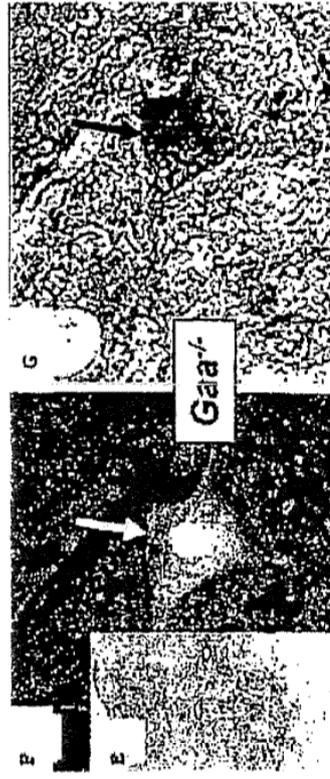


FIG. 17E

FIG. 17G

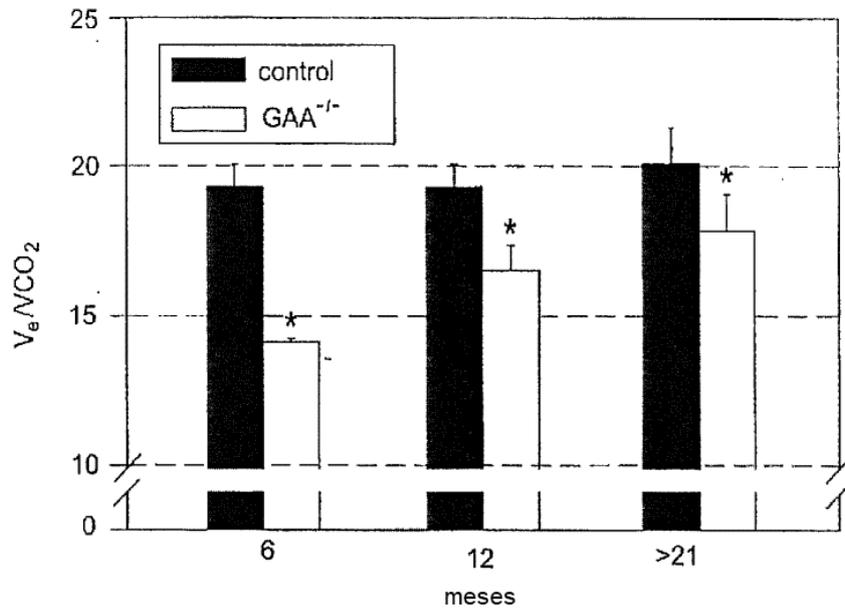


FIG. 18A

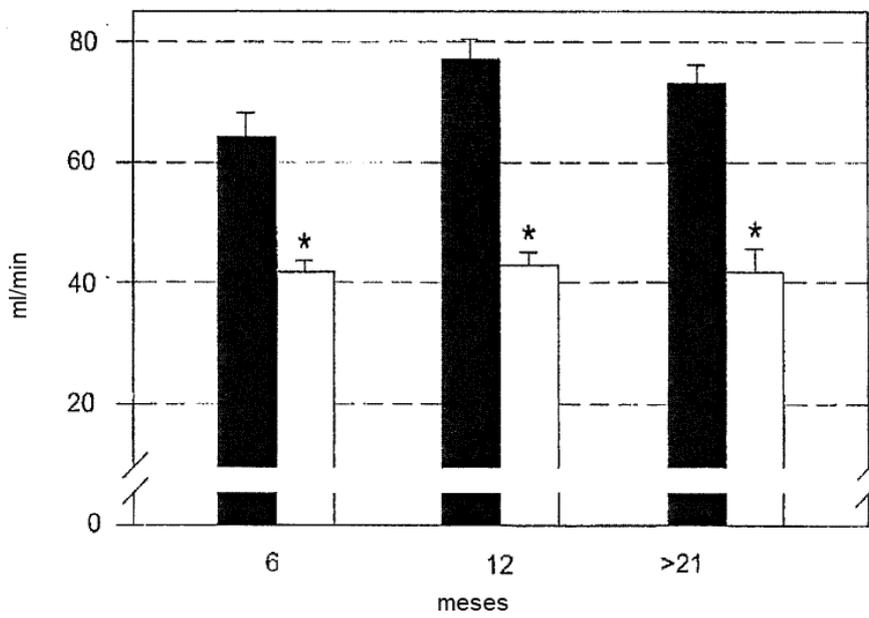


FIG. 18B

FIG. 19A

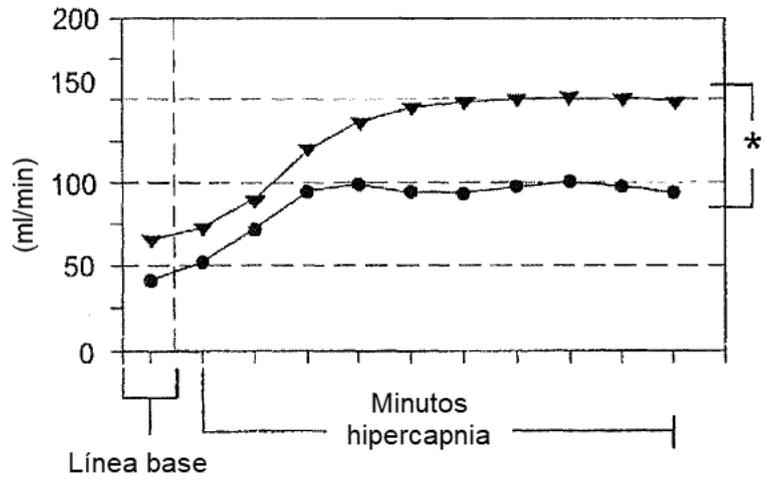


FIG. 19B

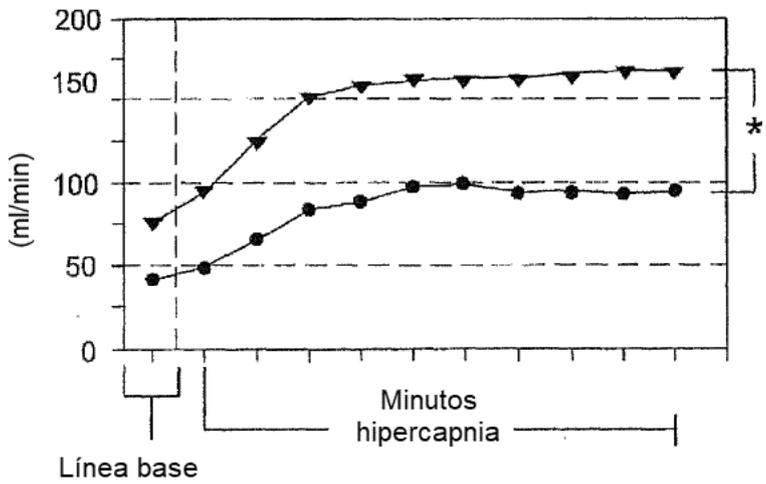
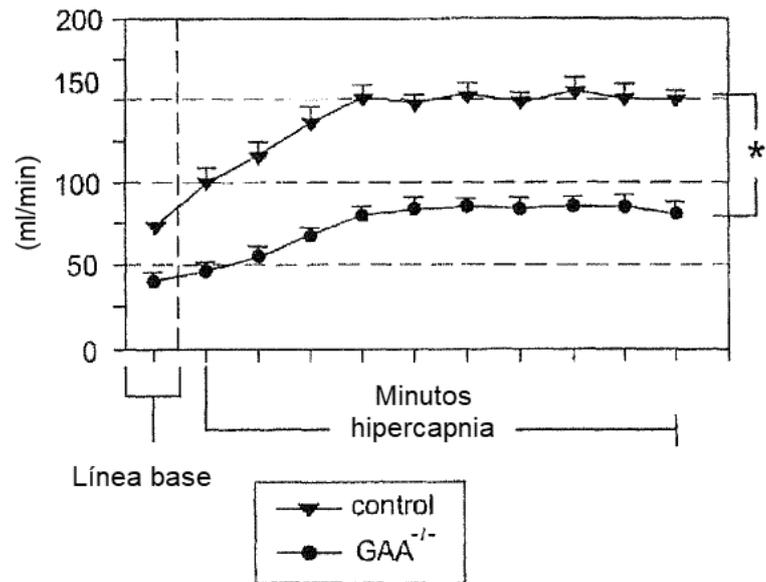


FIG. 19C



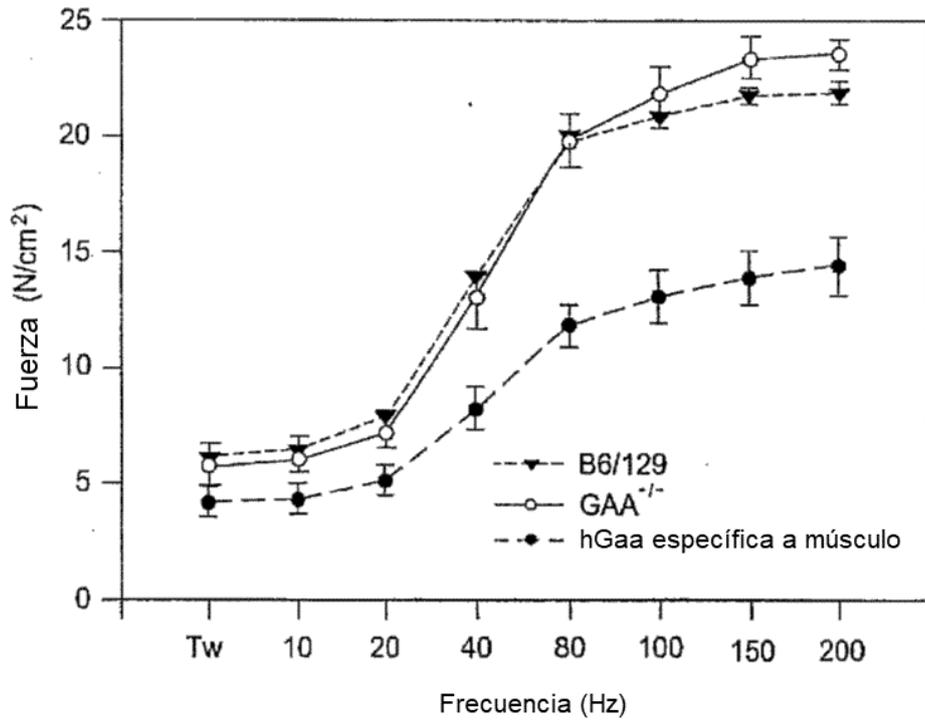


FIG. 20A

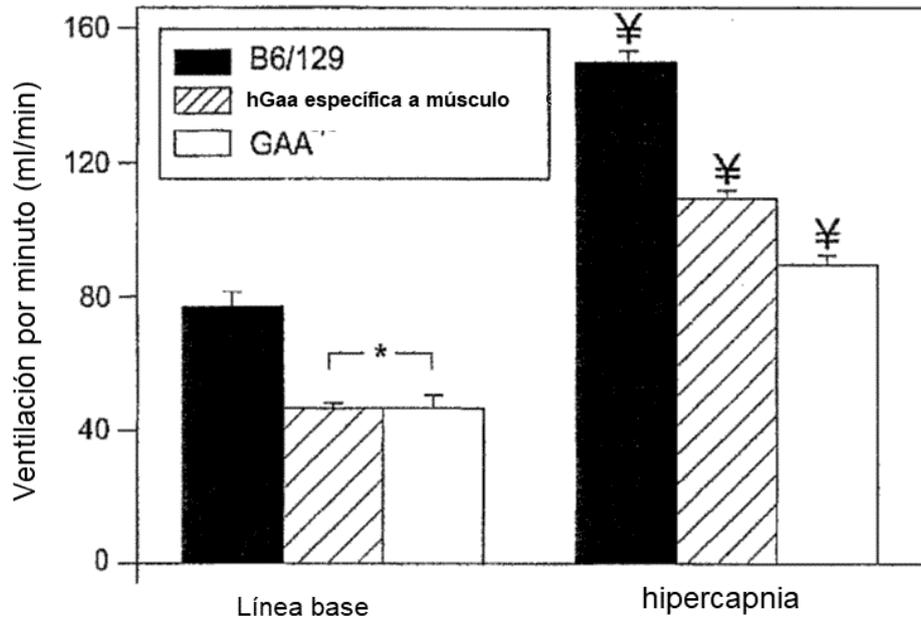


FIG. 20B

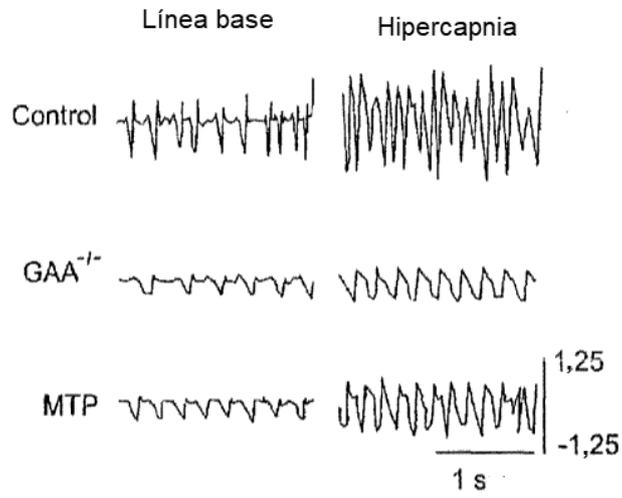


FIG. 20C

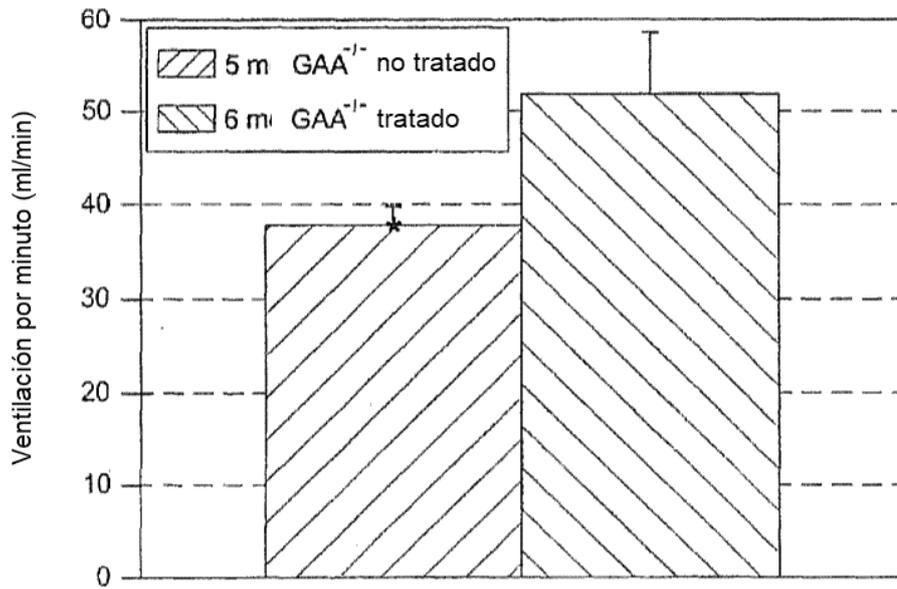


FIG. 24

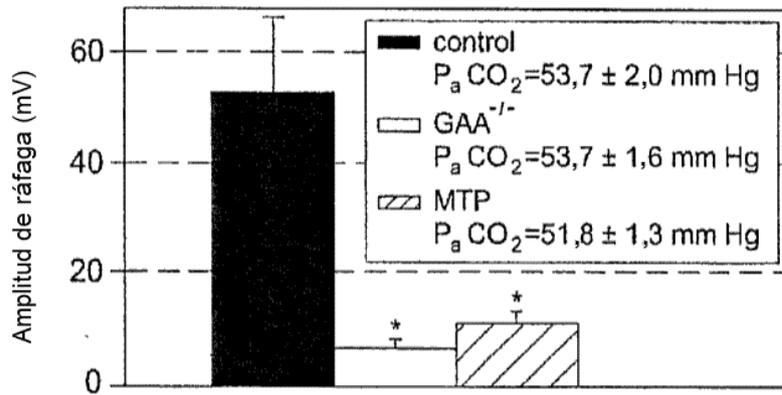


FIG. 21A

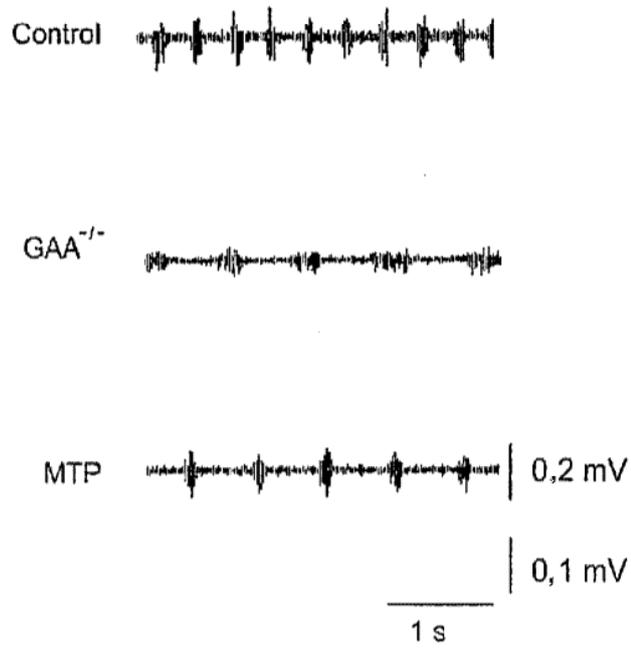


FIG. 21B

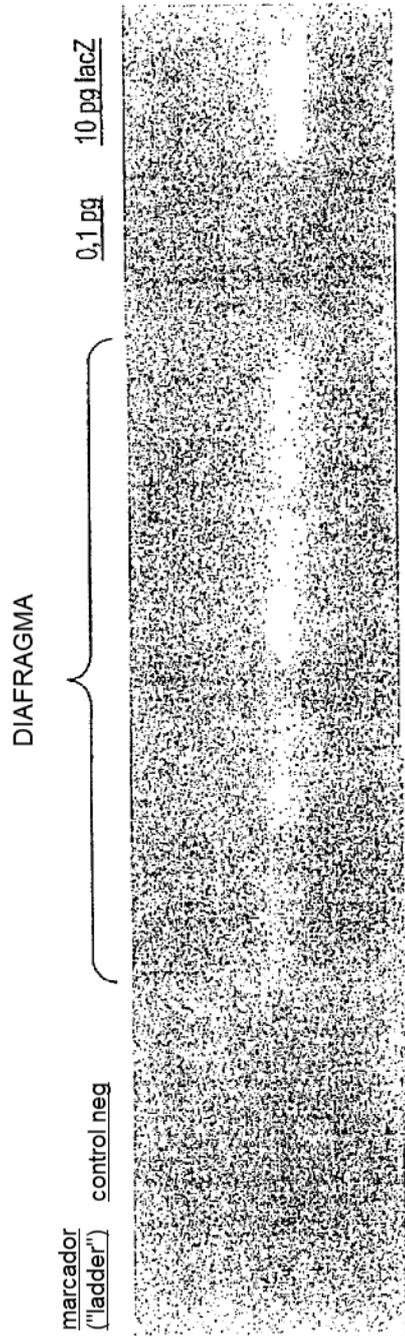


FIG. 22

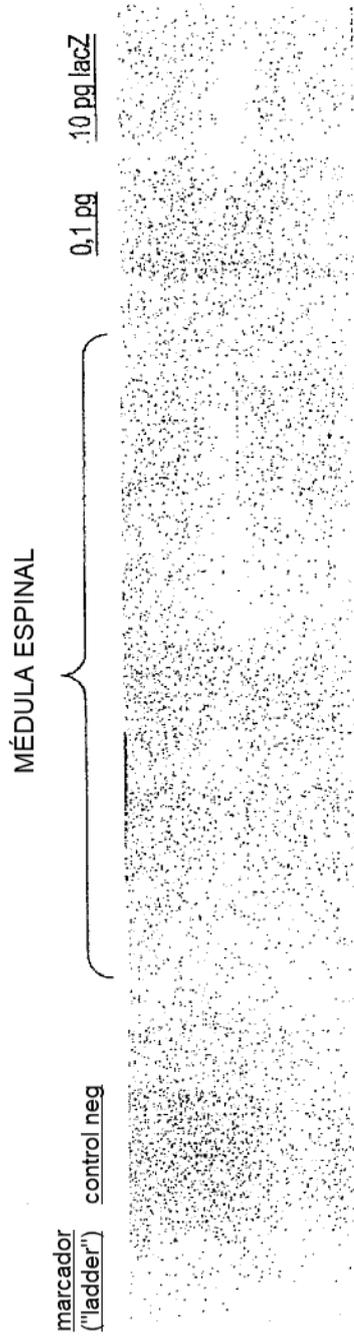


FIG. 23

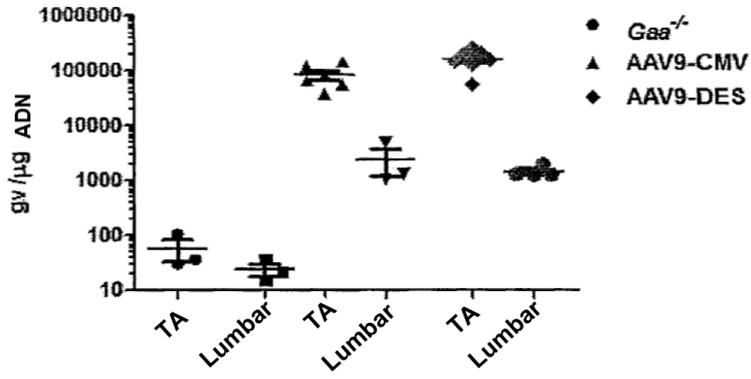


FIG. 25

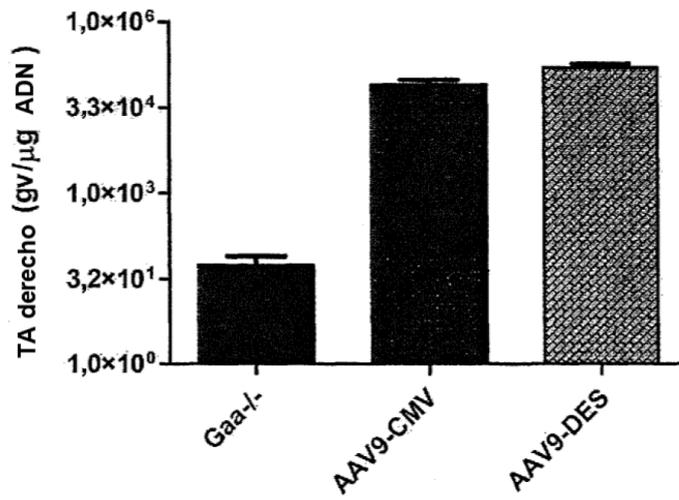


FIG. 26A

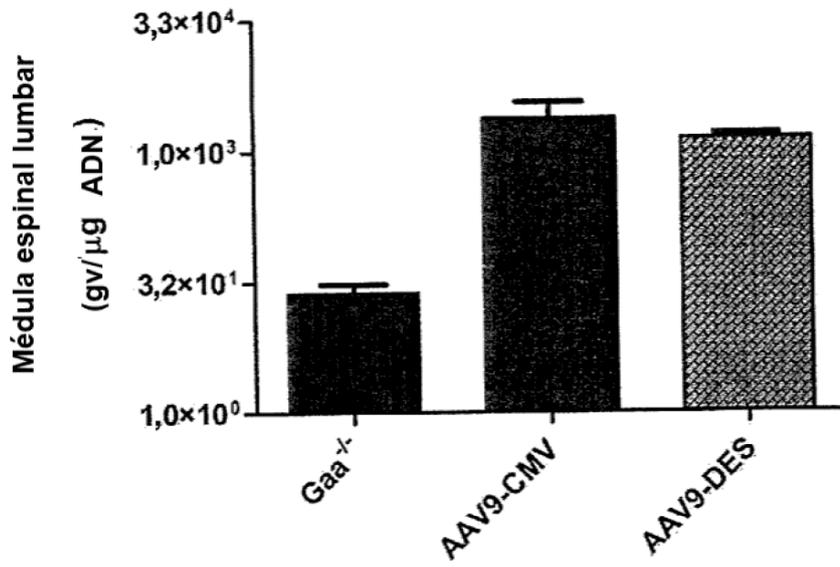


FIG. 26B

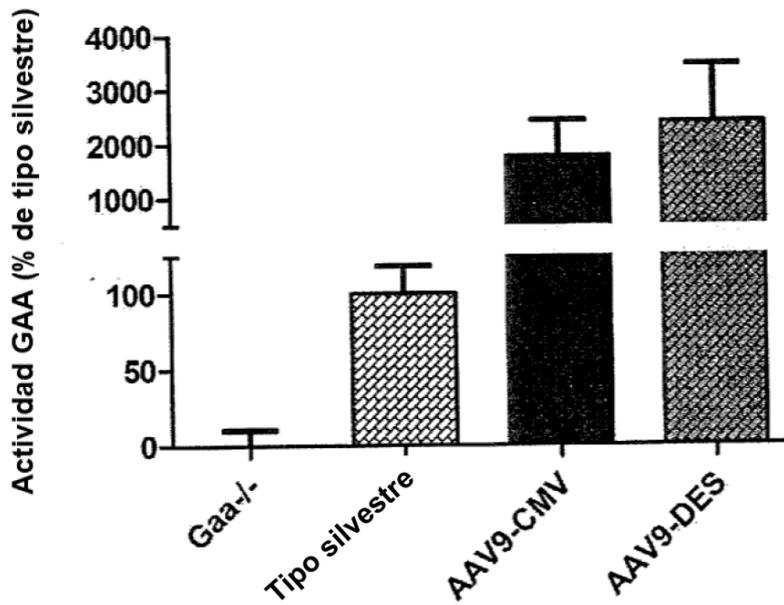


FIG. 26C

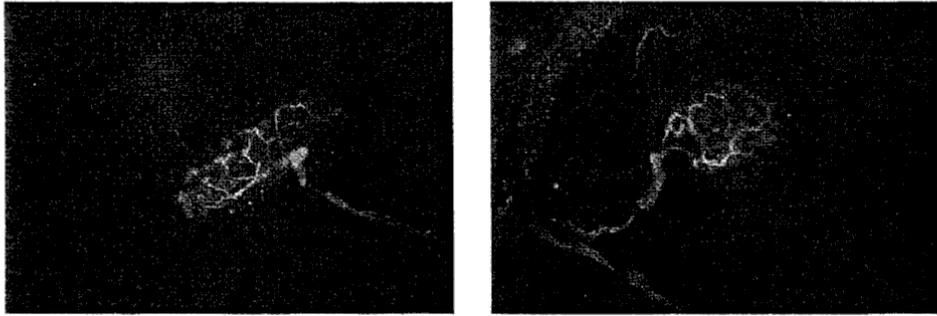


FIG. 27



FIG. 28A



FIG. 28B

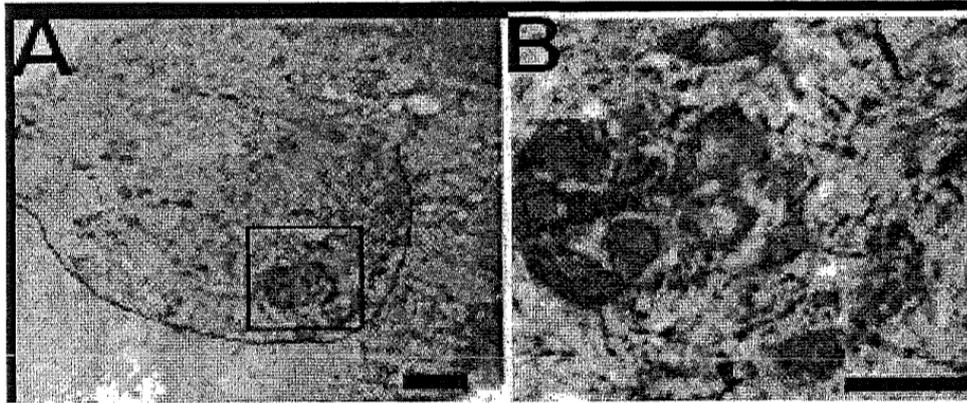


FIG. 29



FIG. 30

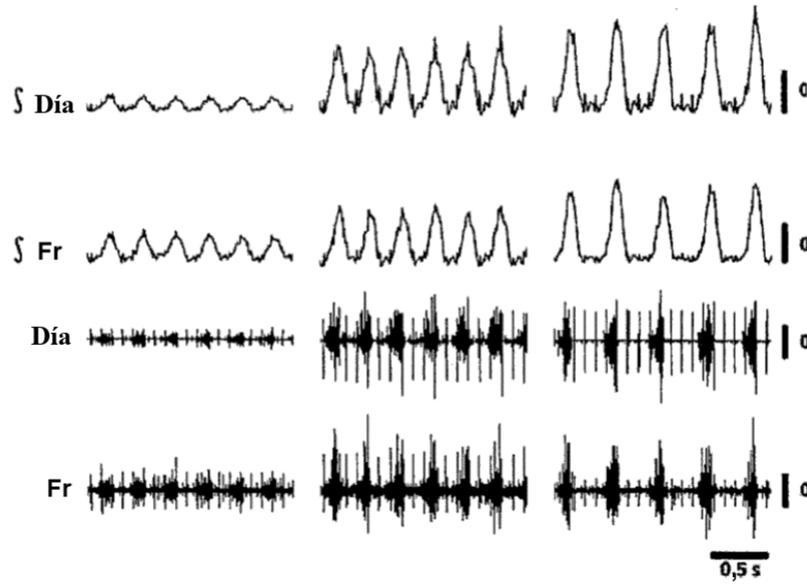


FIG. 31

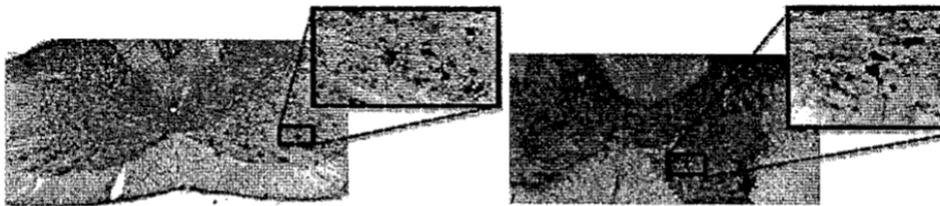


FIG. 32

AAV9 Intratorácico

EMG Diafragma

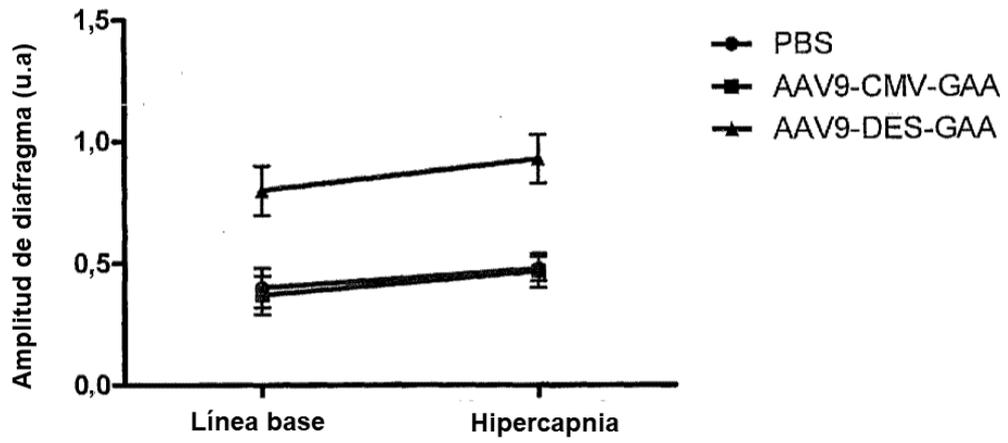


FIG. 33A

AAV9 Intratorácico

Copias genoma

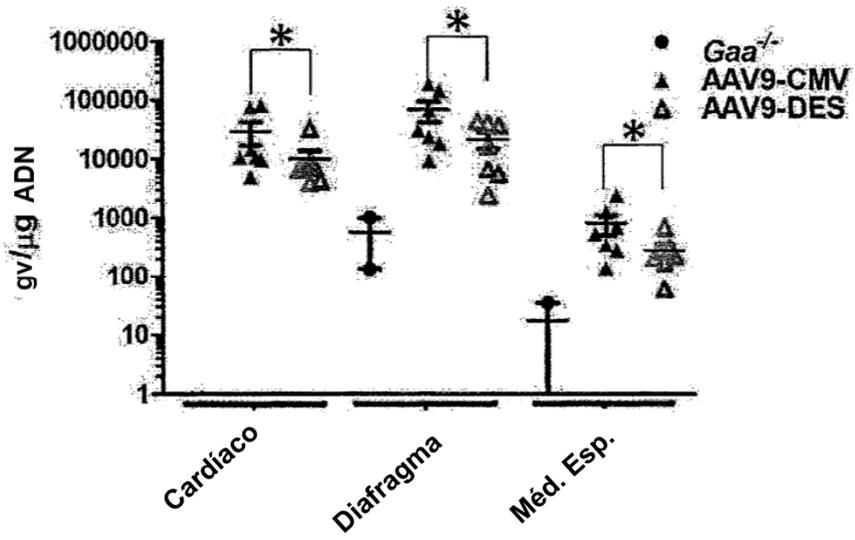


FIG. 33B

AAV9 Intratorácico

AAV9 = mejora significativa en propagación señal n. frénico

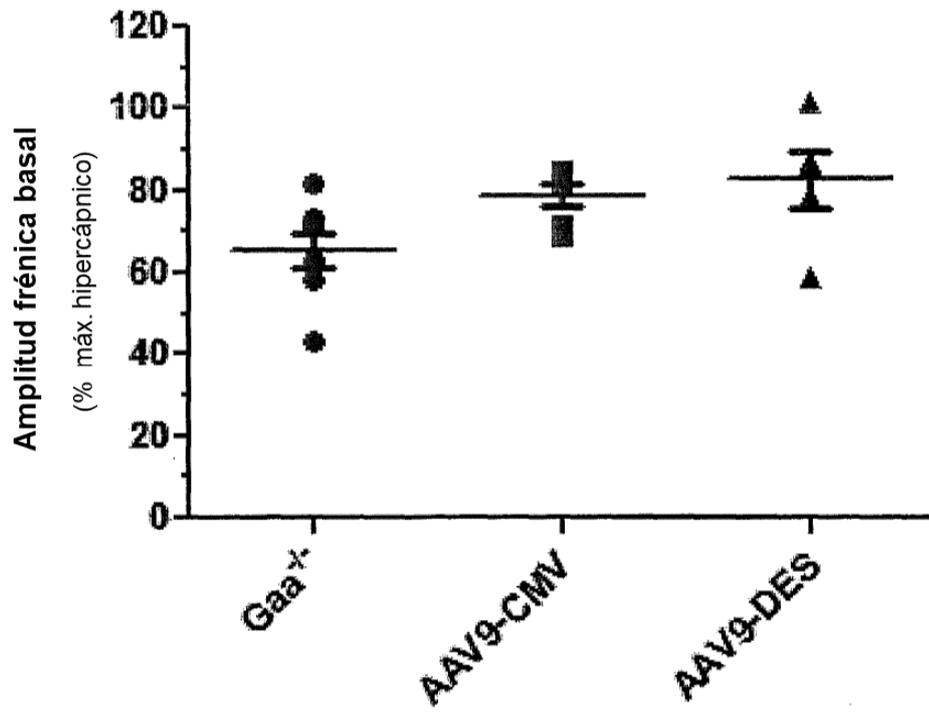


FIG. 33C

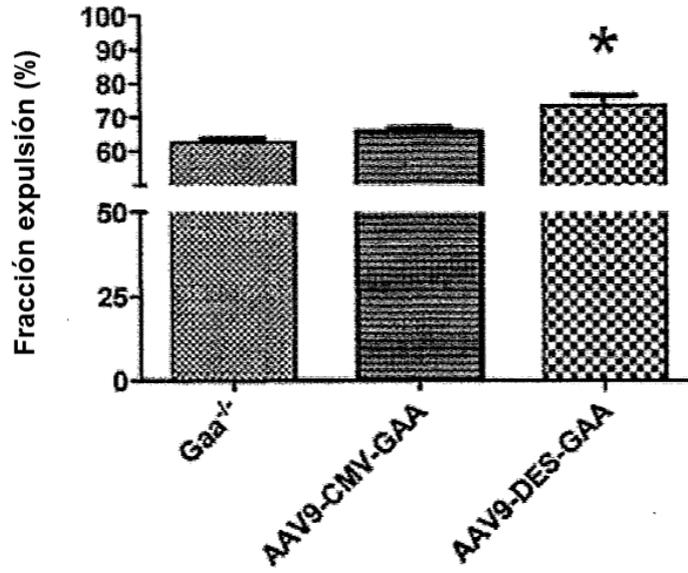


FIG. 34A

AAV9 Sistémico

Peso corporal

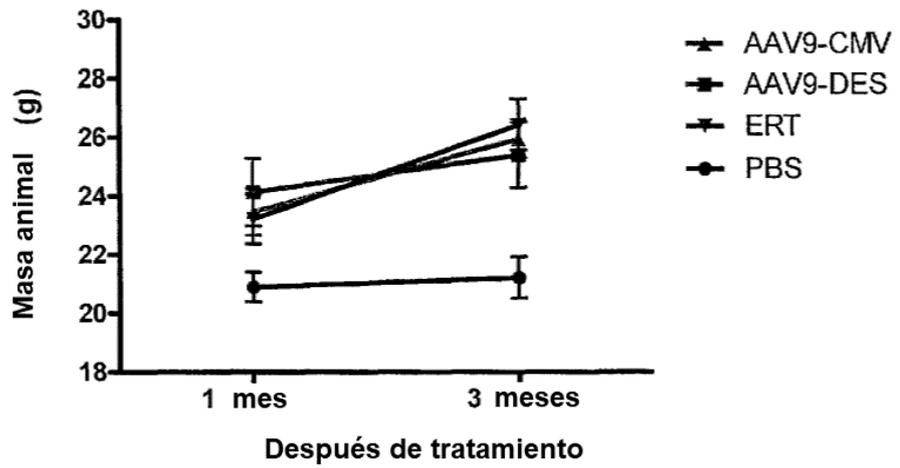


FIG. 34B

AAV9 Sistémico

ECG – Intervalo PR

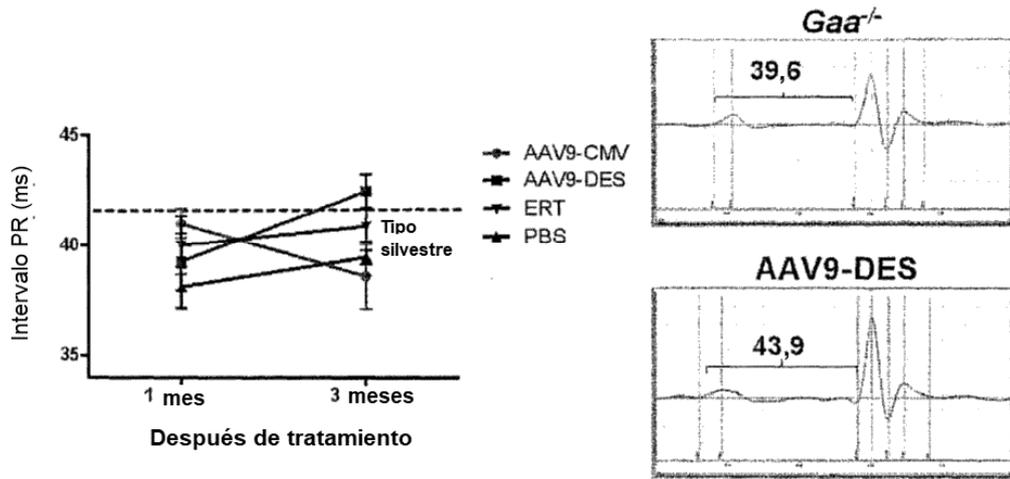


FIG. 34C

AAV9 Sistémico

Función cardíaca

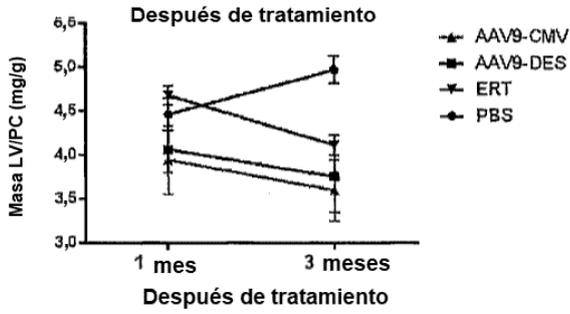
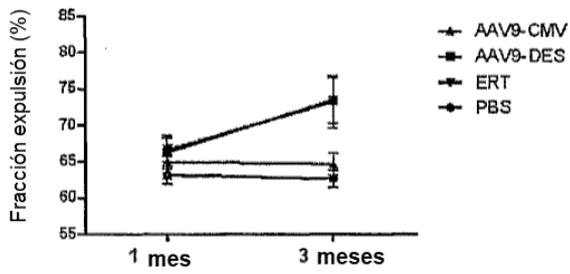
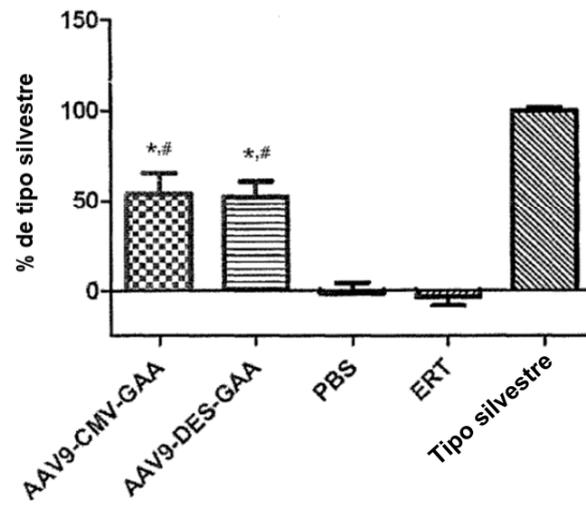


FIG. 34D

AAV9 Sistémico

Actividad de la enzima GAA - cardíaca



* Significativo frente a PBS
Significativo frente a Miozima

FIG. 34E

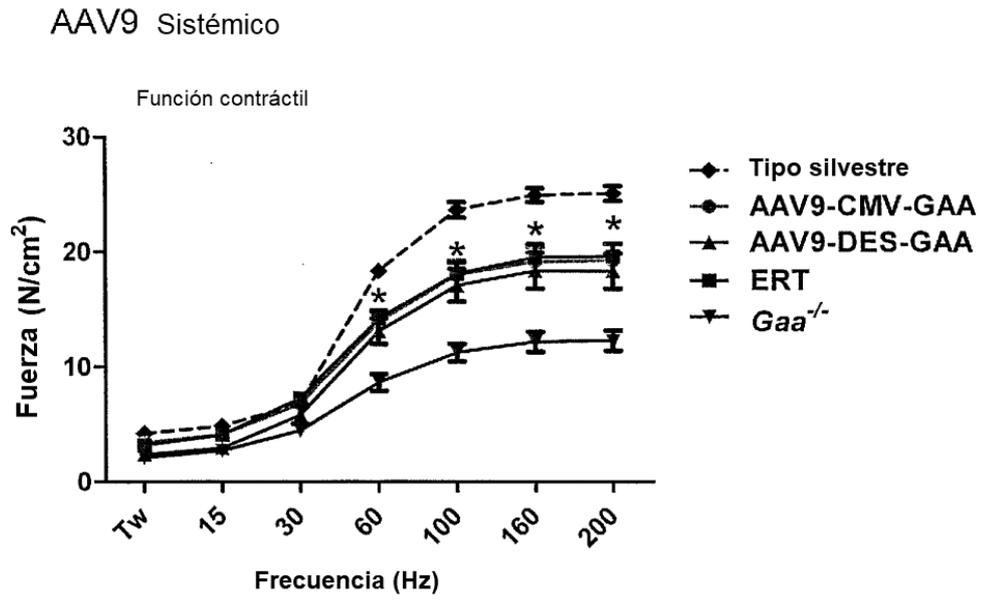


FIG. 34F

AAV9 Sistémico

Actividad de enzima GAA - músculo respiratorio

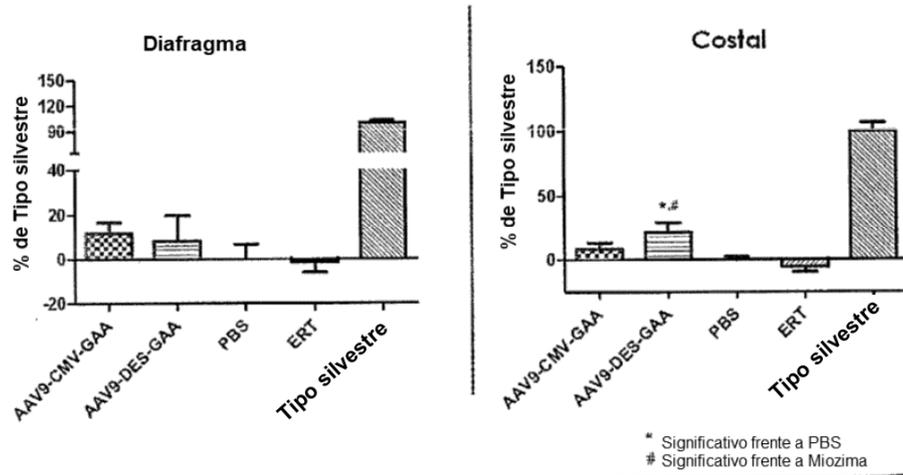


FIG. 34G

AAV9 Sistémico

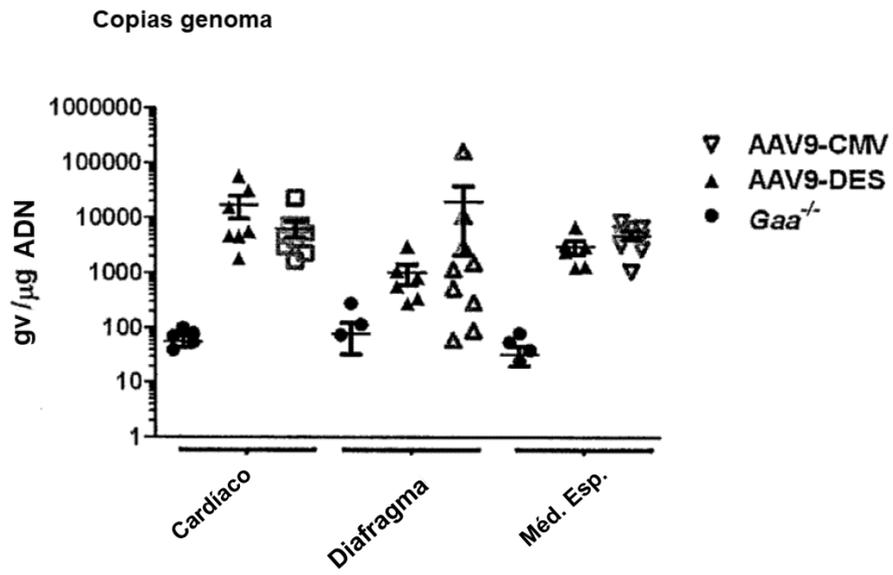


FIG. 34H

AAV9 Sistémico

ELISA Anti-GAA

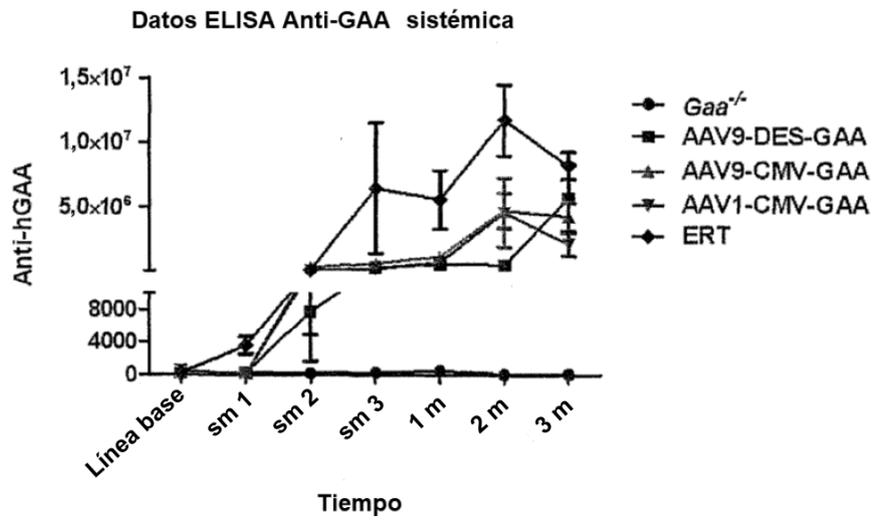


FIG. 34I

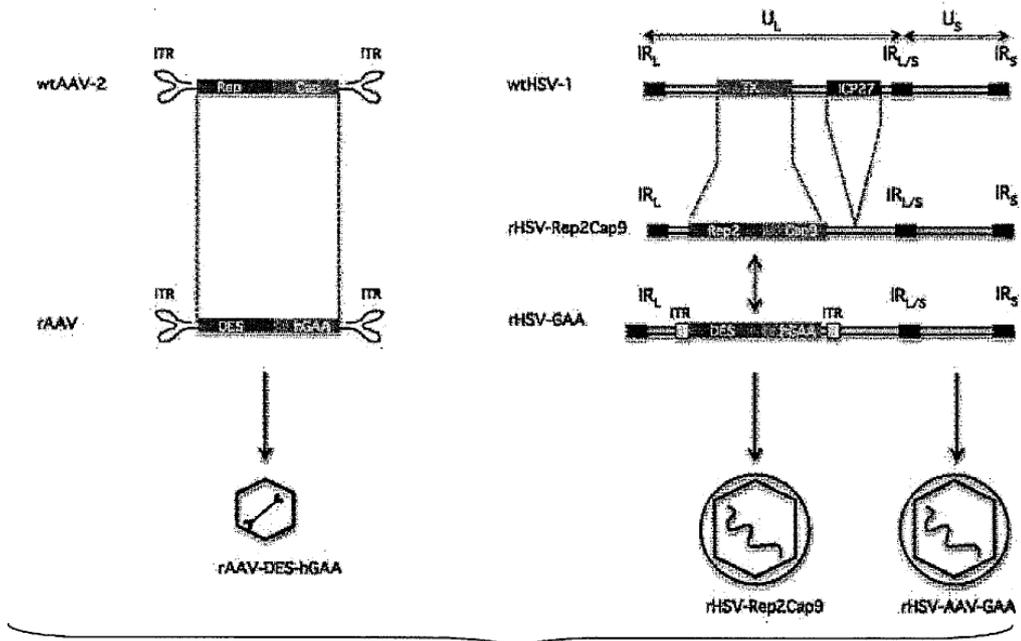


FIG 35

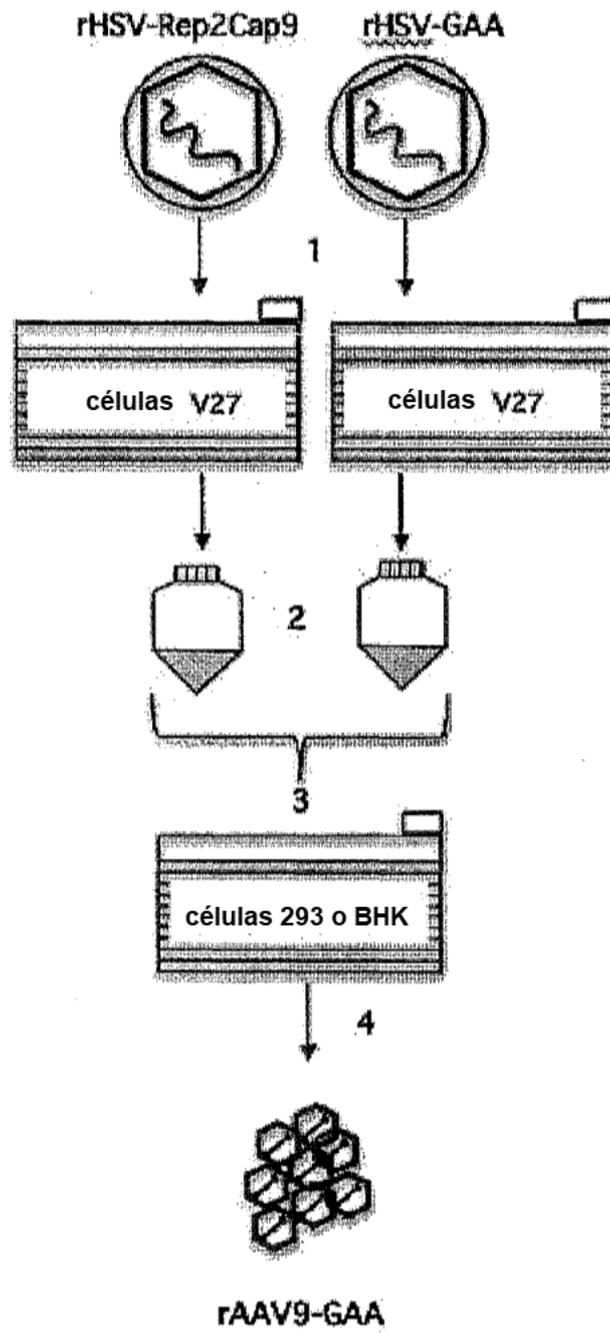


FIG. 36

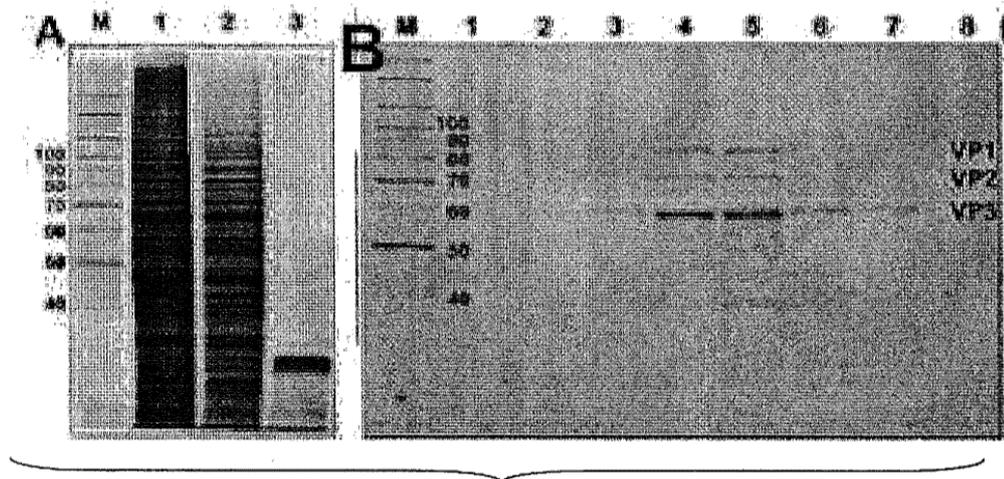


FIG. 37

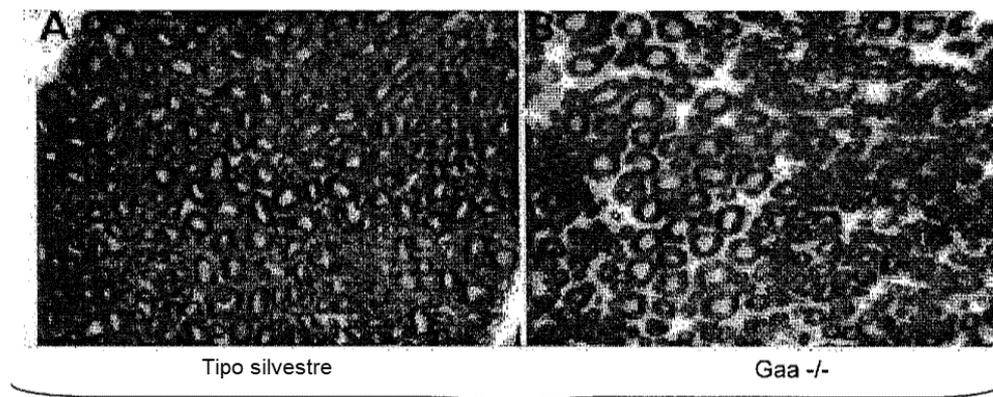


FIG. 38

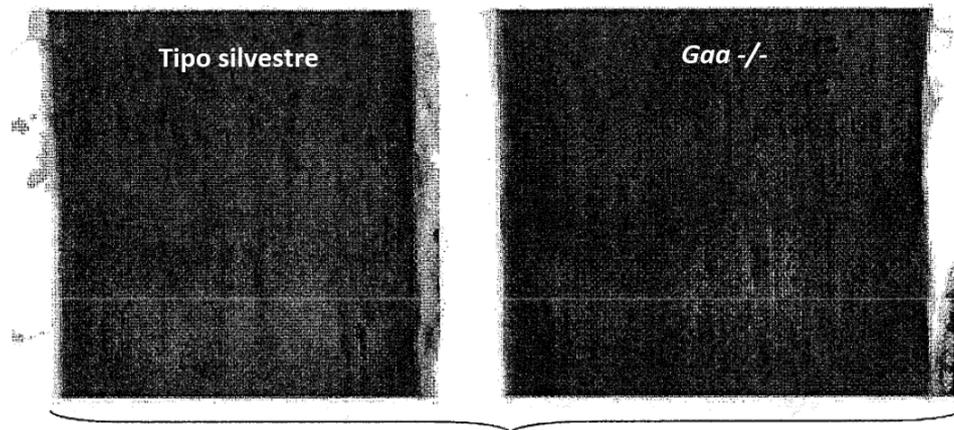


FIG. 39

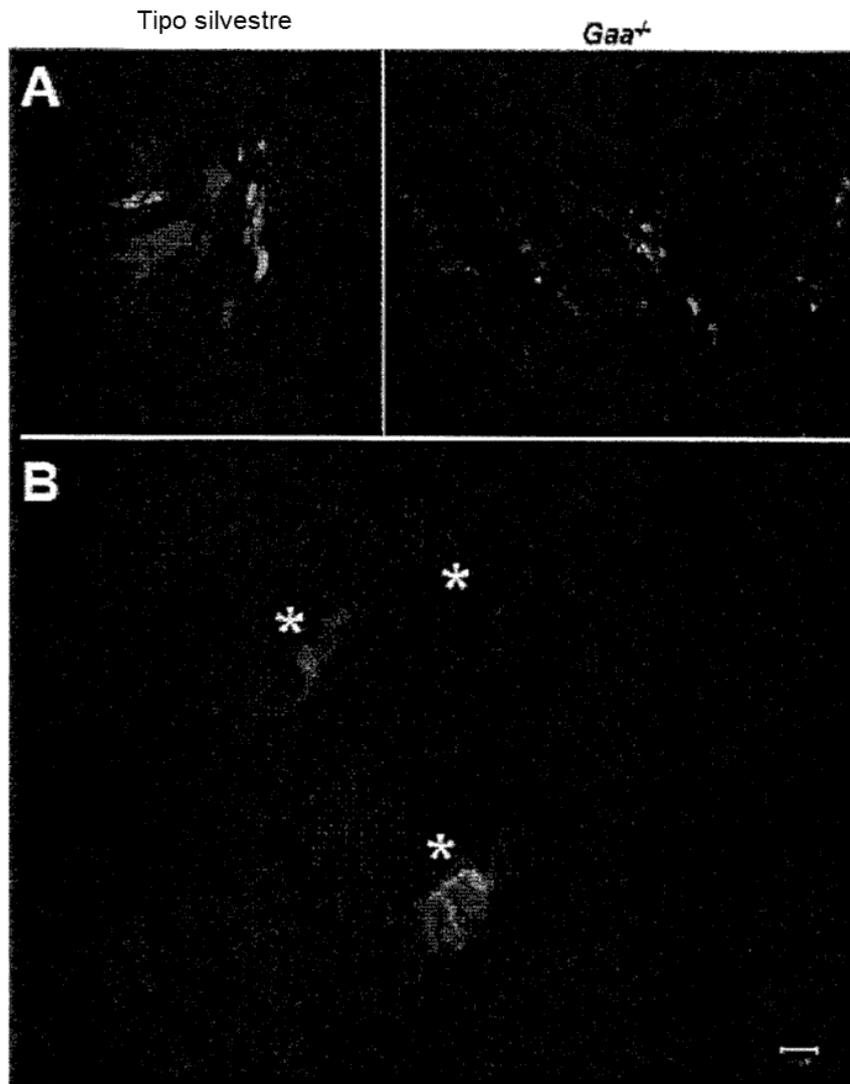


FIG. 40

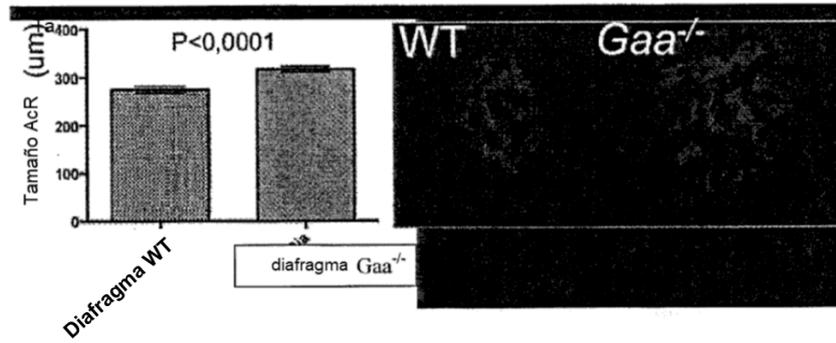


FIG 41

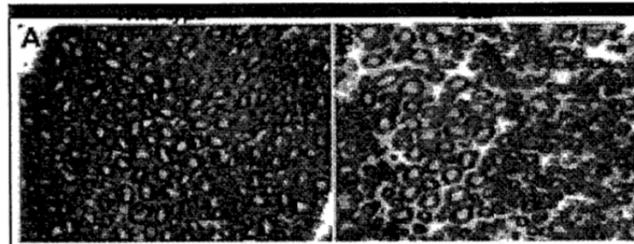


FIG 42

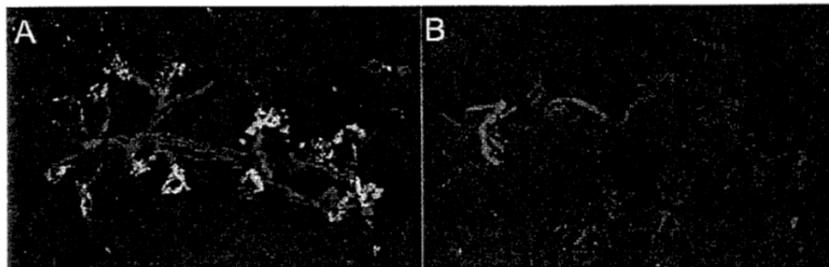


FIG 43

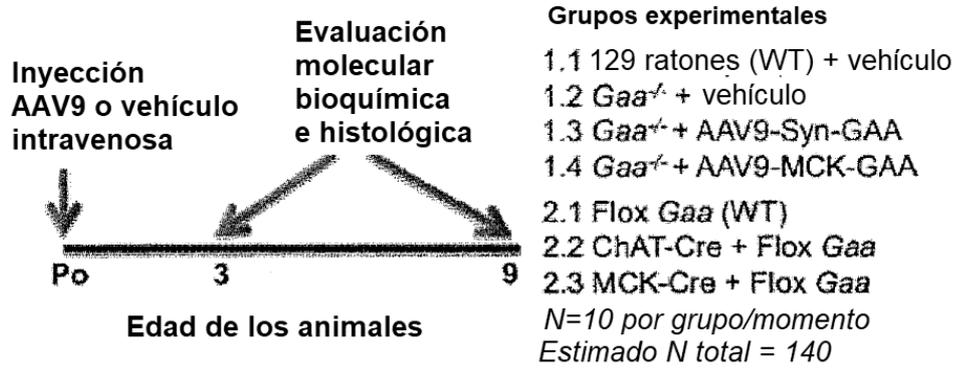


FIG 44

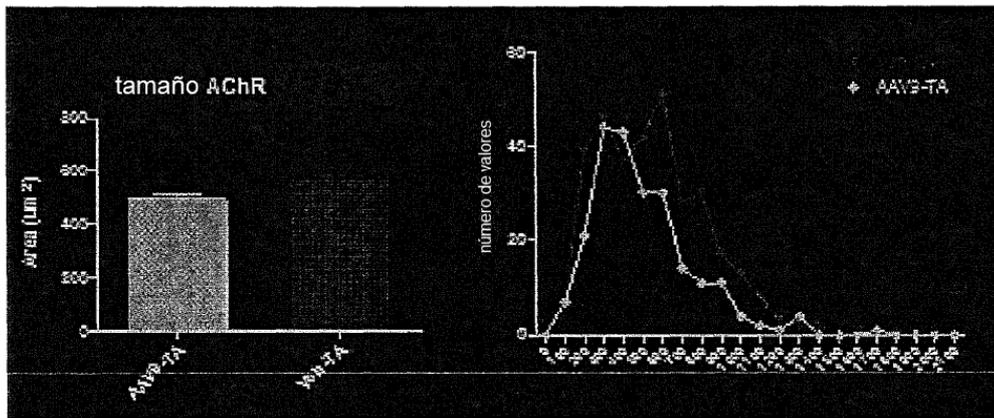


FIG 45

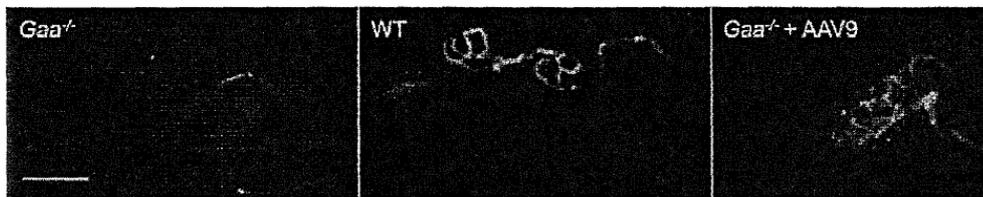


FIG 46



FIG 47

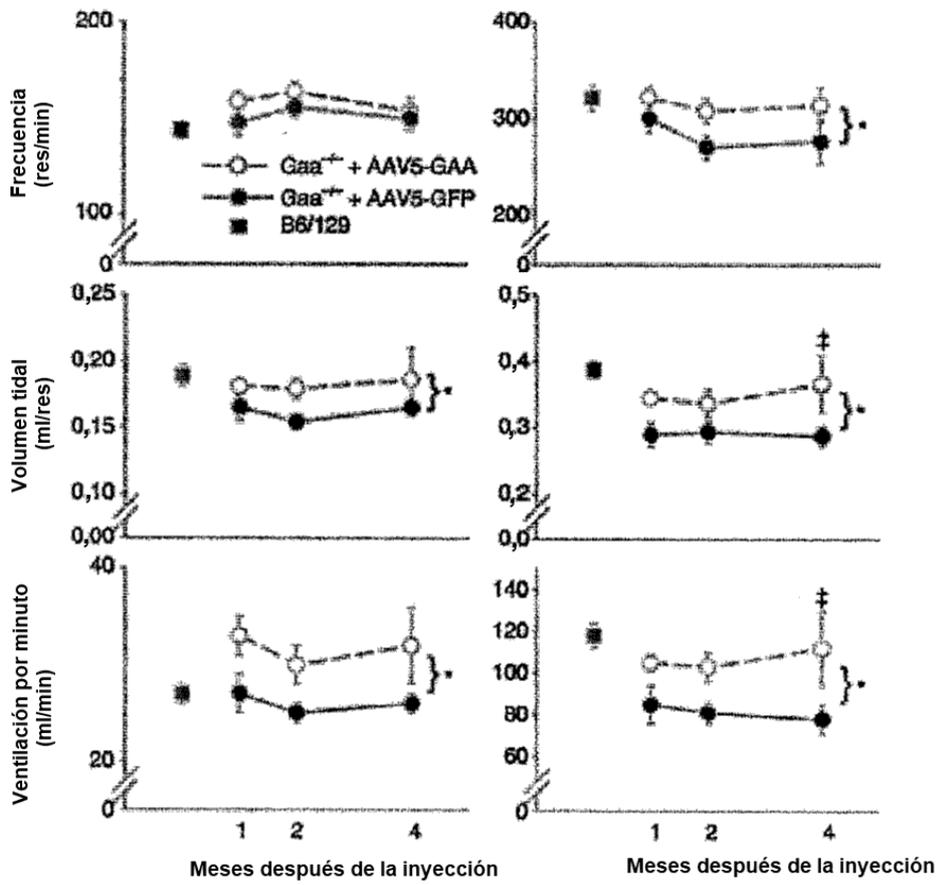


FIG 48