

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 936 220**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2014** **E 20165345 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2022** **EP 3702466**

54 Título: **Productos y métodos para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica**

30 Prioridad:

27.08.2013 US 201361870585 P

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

15.03.2023

73 Titular/es:

**RESEARCH INSTITUTE AT NATIONWIDE
CHILDREN'S HOSPITAL (50.0%)**

700 Children's Drive

Columbus, Ohio 43205, US y

**LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH
(50.0%)**

72 Inventor/es:

KASPAR, BRIAN, K.;

FOUST, KEVIN y

CLEVELAND, DON, W.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Nuria

Observaciones:

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

ES 2 936 220 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

Productos y métodos para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica

5 Declaración de interés gubernamental

Esta invención se realizó con apoyo gubernamental del Instituto Nacional de la Salud de EE. UU. R21-NS067238, NS027036, ROI NS064492 y RC2 NS69476-01. El gobierno posee determinados derechos sobre la invención.

10 Incorporación por referencia de material enviado electrónicamente

Se incorpora por referencia en su totalidad una lista de secuencias de nucleótidos/aminoácidos legible por ordenador presentada junto con el presente documento e identificada de la siguiente manera: Archivo ACII (texto) de 14.350 bytes denominado "47886PCT_SeqListing.txt", creado el 26 de agosto de 2014.

15 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos realizados en ARN para inhibir la expresión del gen de la superóxido dismutasa 1 (SOD-1). Los dependoparvovirus recombinantes de la invención suministran ADN que codifican ARN que atenúan la expresión de SOD-1. Los métodos tienen aplicación en el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

Antecedentes

25 La ELA es una enfermedad neurodegenerativa de aparición en la edad adulta, de progresión rápida y mortal, caracterizada por la degeneración selectiva de las neuronas motoras superiores e inferiores. Caracterizada por primera vez por Charcot en 1869, la ELA es responsable de una de cada 2000 muertes, afectando a casi 5 de cada 100.000 personas. La ELA se da cuando células nerviosas específicas del cerebro y la médula espinal que controlan el movimiento voluntario se degeneran. En un plazo de dos a cinco años de la aparición de los síntomas, la pérdida de estas neuronas motoras conduce a la atrofia progresiva de los músculos esqueléticos, lo que produce la pérdida de la función muscular generando parálisis, deficiencias en el habla y muerte por insuficiencia respiratoria.

La mayoría de los casos de ELA carece de un vínculo genético claro y se denominan esporádicos, pero en el 10 % de los casos la enfermedad es familiar con herencia dominante. El veinte por ciento de los casos familiares están provocados por mutaciones en la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1), habiendo más de 140 mutaciones distintas identificadas hasta la fecha^{1,2}. Los numerosos esfuerzos que se han realizado por identificar cómo las mutaciones alteran la función de la SOD1 han generado la opinión consensuada de que las mutaciones de SOD1 adquieren una o más toxicidades, cuya naturaleza sigue siendo controvertida³, pero hay pruebas claras de que una proporción de SOD1 mutada se pliega incorrectamente y posteriormente forma agregados^{4,5}. Los agregados de SOD1 son, de hecho, una de las características histológicas de los casos de ELA relacionados con la SOD1⁴.

En los últimos 20 años, se han generado muchos modelos animales que expresan formas mutadas de SOD1 humana. Estos modelos constituyen una recopilación de los rasgos distintivos de la ELA, con la que se desarrolla la degeneración de los axones motores dependiente de la edad y la denervación muscular, la inflamación glial y la posterior pérdida de neuronas motoras que la acompañan. Los experimentos de escisión selectiva de genes han determinado que la expresión de SOD1 mutada dentro de las propias neuronas motoras contribuye al inicio y la progresión de la primera fase de la enfermedad⁶, al igual que la síntesis de mutaciones en las células NG2⁷, que son precursoras de los oligodendrocitos. Sin embargo, la expresión de la proteína SOD1 mutada en la microglía y los astrocitos impulsa significativamente la rápida progresión de la enfermedad^{6,8}, cuyos hallazgos han llevado a la conclusión de que la fisiopatología de la ELA no es autónoma a nivel celular³.

Además, se ha descubierto que los astrocitos son tóxicos para las neuronas motoras en muchos modelos *in vitro* en los que se sobreexpresaron formas mutadas de SOD1 humana⁹⁻¹¹. Un estudio reciente obtuvo astrocitos de la médula espinal de cadáveres de pacientes con ELA con o sin mutaciones en SOD1. En todos los casos, los astrocitos de los pacientes con ELA esporádica eran tan tóxicos para las neuronas motoras como los astrocitos portadores de mutaciones genéticas en SOD1¹². Aún más sorprendentemente, la reducción de SOD1 en astrocitos obtenidos de pacientes con ELA tanto esporádica como familiar disminuyó la toxicidad derivada de los astrocitos que es selectiva para las neuronas motoras, pero no para el GABA. Este notable hallazgo, junto con informes de que se han encontrado inclusiones de SOD1 plegadas incorrectamente en la médula espinal de pacientes con ELA familiar y de algunos con ELA esporádica^{13,14,15}, ha proporcionado pruebas muy sólidas de un papel patógeno de la SOD1 de tipo natural en la ELA esporádica.

A pesar de los conocimientos que los modelos animales que expresan mutaciones de SOD1 han proporcionado para comprender los mecanismos implicados en la degeneración de las neuronas motoras, su utilidad para el desarrollo de enfoques terapéuticos ha sido cuestionada¹⁶, tampoco se ha demostrado la eficacia de ningún fármaco con un beneficio para la supervivencia informado en ratones con mutación SOD1^{G93A} en ensayos clínicos con pacientes de

ELA esporádica. En todos los casos excepto en uno, se informó que los fármacos probados en seres humanos solo prolongaron la supervivencia del ratón con SOD 1 mutada cuando se aplicaron de forma presintomática, y ni siquiera entonces fueron beneficiosos para la supervivencia, pues únicamente retrasaron el inicio de la enfermedad sin producir beneficio alguno en la desaceleración de la progresión de esta. La única excepción a esto fue el riluzol, que como ocurre con los seres humanos, solo prolongó moderadamente la supervivencia de los ratones con mutación SOD1^{G93A} y lo hizo al desacelerar la progresión de la enfermedad¹⁷. Reconociendo que el éxito en los ensayos con seres humanos requerirá la desaceleración de la progresión de la enfermedad, los ratones con SOD1 mutada han predicho perfectamente el éxito del riluzol y el fracaso de la eficacia de cada uno de los otros fármacos que se probaron en los ensayos con seres humanos. Lo que falta son tratamientos adicionales que tengan impacto en la progresión de la enfermedad en estos ratones.

Por tanto, el riluzol es el único fármaco aprobado en la actualidad por la FDA como tratamiento para la ELA, proporcionando un beneficio moderado para la supervivencia²¹. Para el 20 % de los casos de ELA familiar provocados por la mutación en SOD1, los intentos de mejorar el tratamiento mediante la síntesis de SOD1 han sido el foco de múltiples enfoques de desarrollo terapéutico. Se probaron oligonucleótidos antisentido y la interferencia de ARN suministrado en virus (iARN) en modelos de rata²² y de ratón²³⁻²⁵ que desarrollaron una parálisis mortal debido a la sobreexpresión de SOD1^{G93A} humana. Los oligonucleótidos antisentido infundidos al inicio de la enfermedad produjeron una reducción de SOD1 y una desaceleración moderada de la progresión de la enfermedad²². Se ha probado clínicamente la infusión directa en el LCR de oligonucleótidos antisentido²⁶, conduciendo a resultados alentadores en términos de tolerabilidad y seguridad, pero sin una reducción significativa en los niveles de SOD1 a las dosis bajas utilizadas. En cada uno de los estudios víricos previos²³⁻²⁵, se logró la atenuación de SOD1 antes de iniciarse la enfermedad mediante inyección directa en el sistema nervioso o aprovechando el transporte retrógrado axonal al inyectar un virus por vía intramuscular^{23,24}. Estos estudios condujeron a diversos grados de éxito en la prolongación de la supervivencia o la mejora del rendimiento motor, dependiendo del tiempo de tratamiento, así como del nivel de atenuación de SOD1 logrado en la médula espinal. Aunque estos estudios proporcionaron una importante prueba de principio, los enfoques estaban lejos de traducirse fácilmente en estrategias clínicas. En efecto, ha habido informes controvertidos en torno a estos estudios iniciales de inhibición de SOD1 mediada por virus^{23,24,27-29}.

Se han utilizado vectores de dependoparvovirus (AAV, *Adeno-Associated Virus*) en varios ensayos clínicos recientes para el tratamiento de trastornos neurológicos [Kaplitt *et al.*, *Lancet* 369: 2097-2105 (2007); Marks *et al.*, *Lancet Neurol* 7: 400-408 (2008); Worgall *et al.*, *Hum Gene Ther* (2008)].

El AAV es un parvovirus de replicación deficiente, cuyo genoma de ADN monocatenario tiene una longitud de aproximadamente 4,7 kb, incluidas las repeticiones terminales invertidas (ITR, *Inverted Terminal Repeat*) de 145 nucleótidos. La secuencia de nucleótidos del genoma de AAV de serotipo 2 (AAV2) se presenta en Srivastava *et al.*, *J Virol*, 45: 555-564 (1983) corregido por Ruffing *et al.*, *J Gen Virol*, 75: 3385-3392 (1994). Las secuencias activas en *cis* que dirigen la replicación (rep), la encapsidación/empaquetado del ADN vírico y la integración cromosómica de la célula hospedadora están contenidas en las ITR. Tres promotores de AAV (denominados p5, p19 y p40 por sus ubicaciones relativas en el mapa) impulsan la expresión de los dos marcos de lectura abiertos internos de AAV que codifican los genes rep y cap. Los dos promotores rep (p5 y p19), junto con el corte y empalme diferencial del único intrón de AAV (en los nucleótidos 2107 y 2227), producen cuatro proteínas rep (rep 78, rep 68, rep 52 y rep 40) del gen rep. Las proteínas rep poseen múltiples propiedades enzimáticas que, en última instancia, son las responsables de replicar el genoma vírico. El gen cap se expresa a partir del promotor de p40 y codifica las tres proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3. El corte y empalme alternativo y los sitios de inicio de la traducción no consenso son responsables de la producción de las tres proteínas de la cápside relacionadas. Un solo sitio de poliadenilación de consenso está ubicado en la posición 95 del mapa del genoma de AAV. El ciclo de vida y la genética de los AAV se revisan en Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

El AAV posee características únicas que lo hacen atractivo como vector para suministrar ADN extraño a las células, por ejemplo, en la terapia génica. La infección por AAV de células en cultivo no es citopática, y la infección natural de los seres humanos y otros animales es silenciosa y asintomática. Por otra parte, el AAV infecta muchas células de mamíferos, lo que le permite la posibilidad de dirigirse a muchos tejidos diferentes *in vivo*. Por otra parte, el AAV transduce células que se dividen lentamente y que no se dividen, y puede persistir esencialmente a lo largo de la vida de esas células como un episoma nuclear activo transcripcionalmente (elemento extracromosómico). El genoma provírico del AAV es infeccioso como ADN clonado en plásmidos, lo que hace factible la construcción de genomas recombinantes. Asimismo, dado que las señales que dirigen la replicación de AAV, la encapsidación y la integración del genoma están contenidas dentro de las ITR del genoma de AAV, parte o la totalidad de los aproximadamente 4,3 kb internos del genoma (que codifican la replicación y las proteínas estructurales de la cápside, rep-cap) puede reemplazarse con ADN extraño, tal como un casete génico que contiene un promotor, un ADN de interés y una señal de poliadenilación. Las proteínas rep y cap pueden proporcionarse *in trans*. Otra característica importante de AAV es que es un virus sumamente estable y abundante. Soporta fácilmente las condiciones utilizadas para inactivar adenovirus (de 56 °C a 65 °C durante varias horas), haciendo que la conservación en frío de AAV no sea tan importante. El AAV se puede incluso liofilizar. Por último, las células infectadas con AAV no son resistentes a la superinfección.

Existen múltiples serotipos de AAV y ofrecen un variado tropismo tisular. Los serotipos conocidos incluyen, por

ejemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV 10, AAV11 y AAVrh74. Los avances en el suministro de AAV6 y AAV8 han hecho posible la transducción por estos serotipos de músculo esquelético y cardíaco después de inyecciones intravenosas o intraperitoneales sistémicas simples. Véase Pacak *et al.*, *Circ. Res.*, 99(4): 3-9 (1006) y Wang *et al.*, *Nature Biotech.*, 23(3): 321-8 (2005). El uso de AAV para dirigirse a tipos de células dentro del sistema nervioso central ha implicado una inyección intraparenquimatosa quirúrgica. Véase, Kaplitt *et al.*, *supra*; Marks *et al.*, *supra* y Worgall *et al.*, *supra*. Con respecto al uso de AAV para dirigirse a tipos de células dentro del sistema nervioso, véase la publicación internacional n.º WO 2010/071832. Las publicaciones internacionales n.º WO 2009/043936 y WO 2009/013290 establecen que se refieren al suministro de genes al sistema nervioso central. La publicación internacional n.º WO 2011/133890 establece que se refiere a dependoparvovirus recombinantes útiles para dirigir transgenes al tejido del sistema nervioso central.

Ding H. *et al.*: "Selective silencing by RNAi of dominant allele that causes amyotrophic lateral sclerosis", *AGING CELL*, BLACKWELL PUBLISHING, Reino Unido, vol. 2, 1 de enero de 2003 (01-01-2003), páginas 209-217 identificaron una secuencia de ARNip y ARNhc que puede regular a la baja selectivamente la expresión de SOD1 mutada, pero no de tipo natural.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de métodos y materiales para el tratamiento de la ELA.

Sumario

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un dependoparvovirus recombinante como se establece en las reivindicaciones.

En otro aspecto de la presente invención también se proporciona el dependoparvovirus recombinante de la presente invención para su uso en terapia.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona el dependoparvovirus recombinante de la presente invención para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición que comprende el dependoparvovirus recombinante de la presente invención.

La presente invención proporciona productos y su uso para reducir los niveles de proteína SOD1 mutada en sujetos que los necesitan. La invención proporciona el suministro de ARN mediado por AAV que incluyen, pero sin limitación, ARN horquillado corto, para reducir la síntesis de mutaciones de SOD1 humana causantes de ELA en sujetos que lo necesitan. Los AAV recombinantes (rAAV, *recombinant AAV*) contemplados por la invención incluyen, pero sin limitación, rAAV9, rAAV2 y rAAVrh74. Las vías de suministro contempladas por la invención incluyen, pero sin limitación, el suministro sistémico y el suministro intratecal. Se indica el uso de los métodos y productos de la invención, por ejemplo, en el tratamiento de la ELA.

La referencia a métodos de tratamiento en los párrafos posteriores de la descripción se interpreta como referencia a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

Descripción detallada

En un aspecto, la invención proporciona genomas de rAAV que comprenden una o más ITR de AAV que flanquean un polinucleótido que codifica uno o más ARN (incluidos, pero sin limitación, ARN horquillados cortos, ARN antisentido y/o microARN) que se dirigen a polinucleótidos SOD1 mutados. Los ejemplos describen el uso de rAAV ilustrativo que codifica ARN horquillado corto (ARNhc). En los genomas de rAAV, el polinucleótido codificante de ARNhc está unido operativamente al ADN de control de la transcripción, específicamente, el ADN promotor que es funcional en las células diana. Proveedores comerciales tales como Ambion Inc. (Austin, TX), Dharmacon Inc. (Lafayette, CO), InvivoGen (San Diego, CA) y Molecular Research Laboratories, LLC (Herndon, VA) genera moléculas de ARN inhibidoras personalizadas. Adicionalmente, hay kits en el mercado para producir moléculas de ARNip personalizadas, tales como el kit de construcción de ARNip SILECER™ (Ambion Inc., Austin, TX) o el sistema ARNip (InvivoGen, San Diego, CA). En algunas realizaciones, el genoma de rAAV comprende un ADN que codifica un ARNhc dirigido a SOD1 tal como:

GCATCATCAATTCGAGCAGAAGGAA (SEQ ID NO: 1),

GAAGCATTAAGGACTGACTGAA (SEQ ID NO: 2),

CTGACTGAAGGCCTGCATGGATT (SEQ ID NO: 3),

CATGGATTCCATGTTTCATGA (SEQ ID NO: 4) ("ARNhc 130" o "ARNhc dirigido a SOD1" en el presente documento),

GCATGGATTCCATGTTTCATGA (SEQ ID NO: 5),
 5 GGTCTGGCCTATAAAGTAGTC (SEQ ID NO: 6),
 GGGCATCATCAATTTTCGAGCA (SEQ ID NO: 7),
 GCATCATCAATTTTCGAGCAGA (SEQ ID NO: 8),
 10 GCCTGCATGGATTCCATGTTTC (SEQ ID NO: 9),
 GGAGGTCTGGCCTATAAAGTA (SEQ ID NO: 10),
 GATTCCATGTTTCATGAGTTTG (SEQ ID NO: 11),
 15 GGAGATAATACAGCAGGCTGT (SEQ ID NO: 12),
 GCTTTAAAGTACCTGTAGTGA (SEQ ID NO: 13),
 20 GCATTAAAGGACTGACTGAAG (SEQ ID NO: 14),
 GCATCATCAATTTTCGAGCAGAAGGAA (SEQ ID NO: 1),
 GAAGCATTAAAGGACTGACTGAA (SEQ ID NO: 2),
 25 CTGACTGAAGGCCTGCATGGATT (SEQ ID NO: 3),
 CATGGATTCCATGTTTCATGA (SEQ ID NO: 4),
 30 GCATGGATTCCATGTTTCATGA (SEQ ID NO: 5),
 GGTCTGGCCTATAAAGTAGTC (SEQ ID NO: 6),
 GGGCATCATCAATTTTCGAGCA (SEQ ID NO: 7),
 35 GCATCATCAATTTTCGAGCAGA (SEQ ID NO: 8),
 GCCTGCATGGATTCCATGTTTC (SEQ ID NO: 9),
 40 GGAGGTCTGGCCTATAAAGTA (SEQ ID NO: 10),
 GATTCCATGTTTCATGAGTTTG (SEQ ID NO: 11),
 GGAGATAATACAGCAGGCTGT (SEQ ID NO: 12),
 45 GCTTTAAAGTACCTGTAGTGA (SEQ ID NO: 13),
 GCATTAAAGGACTGACTGAAG (SEQ ID NO: 14),
 50 TCATCAATTTTCGAGCAGAA (SEQ ID NO: 15),
 TCGAGCAGAAGGAAAGTAA (SEQ ID NO: 16),
 GCCTGCATGGATTCCATGT (SEQ ID NO: 17),
 55 TCACTCTCAGGAGACCATT (SEQ ID NO: 18) o
 GCTTTAAAGTACCTGTAGT (SEQ ID NO: 19).

60 Los genomas de rAAV de la invención carecen de ADN rep y cap de AAV. El ADN de AAV en los genomas de rAAV (p. ej., ITR) puede ser de cualquier serotipo de AAV del que se pueda derivar un virus recombinante, incluidos, pero sin limitación, serotipos de AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10 y AAV-11. Las secuencias de nucleótidos de los genomas de los serotipos de AAV son conocidas en la técnica. Por ejemplo, el genoma completo de AAV-1 se proporciona en el número de acceso del GenBank NC_002077; el genoma completo de AAV-2 se proporciona en el número de acceso del NC_001401 y Srivastava *et al.*, *J. Virol.*, 45: 555-564 {1983}; el genoma completo de AAV-3 se proporciona en el número de acceso del GenBank NC_1829; el genoma completo de

AAV-4 se proporciona en el número de acceso del GenBank NC_001829; el genoma de AAV-5 se proporciona en el número de acceso del GenBank AF085716; el genoma completo de AAV-6 se proporciona el número de acceso del GenBank NC_001862; al menos partes de los genomas de AAV-7 y AAV-8 se proporcionan en los números de acceso del GenBank AX753246 y AX753249, respectivamente; el genoma de AAV-9 se proporciona en Gao *et al.*, *J. Virol.*, 78: 6381-6388 (2004); el genoma de AAV-10 se proporciona en *Mol. Ther.*, 13(1): 67-76 (2006); y el genoma de AAV-11 se proporciona en *Virology*, 330(2): 375-383 (2004). El genoma de AAVrh74 se proporciona en la publicación internacional n.º WO 2013/078316.

En otro aspecto, la invención proporciona plásmidos de ADN que comprenden genomas de rAAV de la invención. Los plásmidos de ADN se transfieren a células permisibles para la infección con un virus auxiliar de AAV (p. ej., adenovirus, adenovirus con E1 eliminado o herpesvirus) para ensamblar el genoma de rAAV en partículas víricas infecciosas. Las técnicas para producir partículas de rAAV, en las que se va a empaquetar un genoma de AAV, los genes rep y cap, y las funciones de virus auxiliares que se proporcionan a una célula son convencionales en la técnica. La producción de rAAV requiere que los siguientes componentes estén presentes dentro de una sola célula (denominada en el presente documento célula de empaquetamiento): un genoma d rAAV, los genes rep y cap de AAV separados de (es decir, no en) el genoma de rAAV y las funciones del virus auxiliar. Los genes rep y cap de AAV pueden ser de cualquier serotipo de AAV del que se pueda derivar un virus recombinante y pueden ser de un serotipo de AAV diferente al de las ITR del genoma de rAAV, incluidos, pero sin limitación, serotipos de AAV AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10 y AAV-11. La producción de rAAV pseudotipado se describe en, por ejemplo, WO 01/83692, que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad. En diversas realizaciones, las proteínas de la cápside de AAV pueden modificarse para potenciar el suministro del vector recombinante. Las modificaciones de las proteínas de la cápside se conocen en general en la técnica. Véase, por ejemplo, los documentos US 20050053922 y US 20090202490, cuyas divulgaciones se incorporan por referencia en el presente documento en su totalidad.

Un método para generar una célula de empaquetamiento es crear una estirpe celular que exprese de manera estable todos los componentes necesarios para la producción de partículas de AAV. Por ejemplo, un plásmido (o múltiples plásmidos) que comprende un genoma de rAAV que carece de los genes rep y cap de AAV, los genes rep y cap de AAV separados del genoma de rAAV, y un marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia a la neomicina, se integran en el genoma de una célula. Los genomas de AAV se han introducido en plásmidos bacterianos mediante procedimientos como la cola de GC (Samulski *et al.*, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 79:2077-2081), adición de enlazadores sintéticos que contienen sitios de escisión de endonucleasas de restricción (Laughlin *et al.*, 1983, *Gene*, 23:65-73) o mediante unión directa de extremos romos (Senapathy y Carter, 1984, *J. Biol. Chem.*, 259:4661-4666). A continuación, la estirpe celular de empaquetamiento se infecta con un virus auxiliar como el adenovirus. Las ventajas de este método son que las células son seleccionables y son adecuadas para la producción a gran escala de rAAV. Otros ejemplos de métodos adecuados emplean adenovirus o baculovirus en lugar de plásmidos para introducir genomas de rAAV y/o genes rep y cap en células de empaquetamiento.

Los principios generales de la producción de rAAV se revisan en, por ejemplo, Carter, 1992, *Current Opinions in Biotechnology*, 1533-539; y Muzyczka, 1992, *Curr. Topics in Microbial, and Immunol.*, 158:97-129). Varios enfoques se describen en Ratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 4:2072 (1984); Hermonat *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 81:6466 (1984); Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5:3251 (1985); McLaughlin *et al.*, *J. Virol.*, 62: 1963 (1988); y Lebkowski *et al.*, 1988 *Mol. Cell. Biol.*, 7:349 (1988). Samulski *et al.* (1989, *J. Virol.*, 63:3822-3828); patente de EE. UU. n.º 5.173.414; documento WO 95/13365 y patente de Estados Unidos n.º 5.658.776 correspondiente; documentos WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin *et al.* (1995) *Vaccine* 13: 1244-1250; Paul *et al.* (1993) *Human Gene Therapy* 4:609-615; Clark *et al.* (1996) *Gene Therapy* 3: 1124-1132; patente de EE. UU. n.º 5.786.211; patente de EE. UU. n.º 5.871.982; y la patente de EE. UU. n.º 6.258.595. Se contemplan específicamente los rAAV monocatenarios. Los documentos anteriores se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad, con especial énfasis en aquellos apartados de los documentos relacionados con la producción de rAAV.

Por tanto, la realización proporciona células de empaquetamiento que producen rAAV infeccioso. En una realización, las células de empaquetamiento pueden ser células cancerosas transformadas de manera estable tales como células HeLa, 293 células y células PerC.6 (una estirpe 293 afín). En otra realización, las células de empaquetamiento son células que no son células cancerosas transformadas, como las células 293 de pase bajo (células de riñón fetal humano transformadas con E1 de adenovirus), células MRC-5 (fibroblastos fetales humanos), células WI-38 (fibroblastos fetales humanos), células Vero (células de riñón de mono) y células FRhL-2 (células de pulmón fetal de macaco de la India).

En otro aspecto más, la invención proporciona rAAV (es decir, partículas infecciosas de rAAV encapsidadas) que comprenden un genoma de rAAV de la invención. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV es un genoma autocomplementario. Los genomas del rAAV carecen de ADN de rep y cap del AAV, es decir, no hay ADN de rep o cap de AAV entre las ITR de los genomas. Las realizaciones incluyen, pero sin limitación, el rAAV ilustrativo que incluye un genoma que codifica el ARNhc dirigido a SOD1 denominado "AAV-ARNhc-SOD1". Una secuencia que incluye el genoma AAV-ARNhc-SOD1 se establece a continuación como una secuencia invertida de un plásmido

utilizado en la producción.

	CLAVES DE CARACTERIZACIÓN Ubicación/Modificadores
5	misc_feature 662..767 /gen = "ITR mutada" /SECDrawAs = "Región" /SECStyleId = 1
10	CDS complemento(901..965) /gen = "ARNhc dirigido a SOD" /SECDrawAs = "Gen" /SECStyleId = 1
15	misc_feature complemento(966..1064) /gen = "H1" /SECDrawAs = "Región" /SECStyleId = 1
20	misc_feature 1224.. 1503 /gen = "potenciador de CMV" /SECDrawAs = "Región" /SECStyleId = 1
25	misc_feature 510.. 1779 /gen = "Promotor de B-Actina" /producto = "Pollo" /SECDrawAs = "Región" /SECStyleId = 1
30	misc_feature 1845.. 1875 /gen = "SV40_late_19s_int" /SECDrawAs = "Región" /SECStyleId = 1
35	misc_feature 1845..1941 /gen = "modSV40_late_16s_int" /SECDrawAs = "Región" /SECStyleId = 1
40	CDS 2015..2734 /gen = "GFP" /SECDrawAs = "Gen" /SECStyleId = 1
45	misc_feature 2783..2929 /gen = "BGHpA" /SECDrawAs = "Región" /SECStyleId = 1
50	misc_feature 3009..3149 /gen = "ITR" /SECDrawAs = "Región" /SECStyleId = 1
55	misc_feature 3983..4843 /gen = "amp r" /SECDrawAs = "Región" /SECStyleId = 1
	misc_feature 4997..5618 /gen = "origen de pBR322" /SECDrawAs = "Región" /SECStyleId = 1
	(SEQ ID NO: 20)

```

1  gcccaatacg caaacccgct cccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctgattct
61  aacgagggaaa gcacgttata cgtgctcgtc aaagcaacca tagtacgcgc cctgtagcgg
121 cgcattaagc gcggcggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc
181 cctagcgcgc gctcctttcg ctttcttccc ttctttctc gccacgttcg ccggtcttcc
241 ccgtcaagct ctaaatcggg ggctcccttt agggttccga tttagtgett tacggcacct
301 cgaccccaaa aaacttgatt agggtgatgg ttacgtagt gggccatcgc cctgatagac
361 ggtttttcgc cttttgacgt tggagtcac gttctttaat agtggactct tgttccaaac
421 tggacaaca ctcaacccta tctcggctca ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat
481 ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa
541 aatattaacg cttacaattt aaatatgtgc ttatacaatc ttctgtttt tggggctttt
601 ctgattatca accggggtac atatgattga catgctagtt ttacgattac cgttcacgc
661 cctgcgcgct cgctcgctca ctgagggcgc ccgggcaaag cccgggcgc gggcgacctt
721 tggtcgcgcg gcctcagtga gcgagcgcgc gcgcagagag ggagtggaat tcacgcgtgg
781 atctgaattc aattcacgcg tggtaacctac actttatgct tccggctcgt atgttggtg
841 gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgacctgat tacgccaagc
901 tttccaaaaa agcatggatt ccatgttcat gatctcttga atcatgaaca tggaaatccat
961 ggatccgagt ggtctcatat agaacttata agattcccaa atccaaagac atttcacggt
1021 tatggtgatt tcccagaaca catagcgaca tgcaaatatg aattcactgg ccgtcgtttt
1081 acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatgccttg cagcacatcc
1141 ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgacc gatcgccctt cccaacagtt
1201 gcgcagcctg tggtaacctc ggtcggttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga
1261 ccgccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca
1321 atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccacttggca
1381 gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtac cccctattg acgtcaatga cggtaaattg
1441 cccgcctggc attatgccc gtacatgacc ttatgggact ttctacttg gcagtacatc
1501 tactcgaggc cacttctgc ttcactctcc ccatctccc cccctccca ccccaattt
1561 tgtatttatt tattttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcgggggg ggggggggc
1621 gcgcgccagg cggggcgggg cggggcgagg ggcgggcgg ggcgaggcg agaggcgcg
1681 cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttcctt tatggcgagg cggcgcgcg
1741 ggcggcccta taaaaagcga agcgcgcggc gggcgggagc gggatcagcc accgcggtg
1801 cggcctagag tcgacgagga actgaaaaac cagaaagtta actggttaag ttagtctttt
1861 tgtcttttat ttcaggtccc ggatccgggt gtggtgcaaa tcaaagaact gctcctcagt
1921 ggatgttgcc tttacttcta ggctgtacg gaagtgttac ttctgctcta aaagctgcg
1981 aattgtacce gcggccgatc caccggtcgc caccatggtg agcaaggcg aggagctgtt
2041 caccggggtg gtgccatcc tggtcgagct ggacggcgac gtaaacggcc acaagttcag
2101 cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgacctga agttcatctg
2161 caccaccggc aagctgccc tgccctggcc caccctcgtg accacctga cctacggcgt
2221 gcagtgttcc agccgtacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgccat
2281 gccgaaggc tacgtccagg agcgcaccat cttcttcaag gacgacggca actacaagac
2341 ccgcgcgcgag gtgaagttcg agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc tgaagggcat
2401 cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acaacagcca

```

ES 2 936 220 T3

```

2461 caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact tcaagatccg
2521 ccacaacatc gaggacggca gcggtgcagct gcgcgaccac taccagcaga acacccccat
2581 cggcgacggc cccgtgctgc tgcccgcacaa ccactacctg agcaccagc cgcgcctgag
2641 caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagttcgtga ccgcgcgcgg
2701 gatcactctc ggcatggacg agctgtacaa gtaaagcggc catcaagctt atcgataccg
2761 tcgactagag ctcgctgata agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt
2821 tgccccctcc cegtgccttc cttgacctg gaaggtgcc accccactgt cctttcctaa
2881 taaaatgagg aaattgcata gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg
2941 gtggggcgag acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggagaga
3001 tcgatctgag gaaccctag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg ctcgctcgct
3061 cactgaggcc gggcgaccaa aggtgcgccg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt
3121 gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc ccccccccc cccccccgg cgattctctt
3181 gtttgctcca gactctcagg caatgacctg atagcctttg tagagacctc tcaaaaatag
3241 ctaccctctc cggcatgaat ttatcagcta gaacggttga atatcatatt gatggtgatt
3301 tgactgtctc cggcctttct caccgctttg aatcctttac tacacattac tcaggcattg
3361 catttaaaat atatgagggt tctaaaaaatt tttatccttg cgttgaaata aaggcttctc
3421 ccgcaaaagt attacagggt cataatgttt ttggtacaac cgatttagct ttatgctctg
3481 aggcctttatt gcttaatttt gctaattctt tgcccttgct gtatgattta ttggatgttg
3541 gaatgcgctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcataatg
3601 gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc gcgcatagta agccagcccc gacacccgcc
3661 aacacccgct gacgcgcctt gacgggcttg tctgctccc gcatccgctt acagacaagc
3721 tgtgaccgct tccgggagct gcattgtgtc gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc
3781 gagacgaaag ggccctcgtg tacgcctatt tttataggtt aatgtcatga taataatggt
3841 ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccta tttgtttatt
3901 tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taacctgat aaatgcttca
3961 ataatttga aaaaggaaga gtatgagat tcaacatttc cgtgtcgccc ttatctctt
4021 ttttgcgcca ttttgccctt cgttttttgc tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga
4081 tgetgaagat cagttgggtg cagcagtggt ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa
4141 gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt ttaaagtctt
4201 gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgcggggcaa gagcaactcg gtcgcccgat
4261 acactattct cagaatgact tgggttagta ctaccagtc acagaaaagc atcttacgga
4321 tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtata acactgcggc
4381 caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggageta accgcttttt tgcacaacat
4441 gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa
4501 cgcagacgct gacaccacga tgccctgtag aatggcaaca acgttgcgca aactataaac
4561 tggcgaaacta cttactctag cttcccgcca acaattaata gactggatgg aggcggataa
4621 agttgcagga ccacttctgc gctcgccctt tccggtggc tggtttattg ctgataaatc
4681 tggagccggg gagcgtgggt ctgcgggtat cattgcagca ctggggccag atggtaaagg
4741 ctcocgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag
4801 acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttta
4861 ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatTTTTTaa tttaaaagga tctaggtgaa
4921 gatccttttt gataatctca tgaccaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc
4981 gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc tgcgcgtaat
5041 ctgctgcttg caaacaaaaa aaccacgcct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga
5101 gctaccaact ctttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt
5161 ccttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaa tctgtagcac cgctacata
5221 cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac
5281 cgggttgagc tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggt gaacgggggg
5341 ttcgtgcaca cagccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg
5401 tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaa ggcgacaggt atccggttaag
5461 cggcagggtc ggaacaggag agcgacagag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct
5521 ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgc gatgctctc
5581 agggggcgcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggc tttttacggt tcctggcctt
5641 ttgctggcct tttgctcaca tgttcttttc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg
5701 tattaccgcc tttgagttag ctgataaccg tcgcccgcag cgaacgaccg agcgacgca
5761 gtcagtgagc gaggaagcgg aagagc

```

Los nucleótidos 901-965 de ARNhc dirigido a SOD comprenden la secuencia horquillada completa, incluidos los brazos sentido y antisentido, estructura de lazo y tallo y secuencia de terminación. La secuencia en una orientación hacia adelante (con las secuencias diana contra SOD1 subrayadas) es:

5' AATTCATATTTGCATGTCGCTATGIGTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTT
GGATTIGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTCGGATCCATGGATTCCATGTTCA
TGATTCAAGAGATCATGAACATGGAATCCAIGCTTTTTTGGAAA 3' (SEQ ID NO:21)

El rAAV de la invención puede purificarse mediante métodos convencionales en la técnica tales como cromatografía en columna o gradientes de cloruro de cesio. Los métodos para purificar vectores de rAAV de virus auxiliares son conocidos en la técnica e incluyen métodos descritos en, por ejemplo, Clark *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 10(6): 1031-1039 (1999); Schenpp y Clark, *Methods Mol. Med.*, 69: 427-443 (2002); la patente estadounidense n.º 6.566.118 y el documento WO 98/09657.

En otro aspecto, la invención contempla composiciones que comprenden el rAAV de la presente invención. Las composiciones de la invención comprenden rAAV en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones también pueden comprender otros ingredientes tales como diluyentes y adyuvantes. Los vehículos, diluyentes y adyuvantes aceptables no son tóxicos para los receptores y preferentemente son inertes a las dosis y las concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato u otros ácidos orgánicos; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como Tween, pluronics o polietilenglicol (PEG).

Los títulos de rAAV que se van a administrar en los métodos de la invención variarán dependiendo, por ejemplo, del rAAV en particular, del modo de administración, del objetivo del tratamiento, del individuo y de los tipos de células a los que se dirigen, y pueden determinarse mediante métodos convencionales en la técnica. Los títulos de rAAV pueden variar de aproximadamente aproximadamente 1×10^2 , aproximadamente 1×10^3 , aproximadamente 1×10^4 , aproximadamente 1×10^5 , aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , de aproximadamente 1×10^{13} a aproximadamente 1×10^{14} , o más partículas resistentes a la desoxirribonucleasa (PRD) por ml. Las dosis también se pueden expresar en unidades de genomas víricos (gv). Las dosis también pueden variar según el momento de la administración a un ser humano. Estas dosis de rAAV pueden variar de aproximadamente 1×10^4 , aproximadamente 1×10^5 , aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} , aproximadamente 1×10^{14} , aproximadamente 1×10^{15} , aproximadamente 1×10^{16} o más genomas víricos por kilogramo de peso corporal en un adulto. Para un neonato, las dosis de rAAV pueden variar de aproximadamente aproximadamente 1×10^4 , aproximadamente 3×10^4 , aproximadamente 1×10^5 , aproximadamente 3×10^5 , aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 3×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 3×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 3×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 3×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 3×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 3×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 3×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} , aproximadamente 3×10^{13} , aproximadamente 1×10^{14} , aproximadamente 3×10^{14} , aproximadamente 1×10^{15} , aproximadamente 3×10^{15} , aproximadamente 1×10^{16} , aproximadamente 3×10^{16} o más genomas víricos por kilogramo de peso corporal.

En otro aspecto, la invención contempla composiciones que comprenden el rAAV de la presente invención. Las composiciones de la invención comprenden rAAV en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones también pueden comprender otros ingredientes tales como diluyentes y adyuvantes. Los vehículos, diluyentes y adyuvantes aceptables no son tóxicos para los receptores y preferentemente son inertes a las dosis y las concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato u otros ácidos orgánicos; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como Tween, pluronics o polietilenglicol (PEG).

En otro aspecto más, la invención proporciona métodos para transducir una célula diana con un rAAV de la invención, *in vivo* o *in vitro*. Los métodos *in vivo* comprenden la etapa de administrar una dosis eficaz o varias dosis eficaces, de una composición que comprende un rAAV de la invención a un sujeto, un sujeto (incluido un ser humano), que lo necesite. Si la dosis se administra antes del inicio/ desarrollo de un trastorno/enfermedad, la administración es profiláctica. Si la dosis se administra después del inicio/ desarrollo de un trastorno/enfermedad, la administración es terapéutica. En realizaciones de la invención, una dosis eficaz es una dosis que alivia (elimina o reduce) al menos un síntoma asociado con el trastorno/cuadro clínico que se está tratando, que retarda o previene la progresión a un trastorno/cuadro clínico, que retarda o previene la progresión de un trastorno/cuadro clínico, que disminuye la extensión de la enfermedad, que produce la remisión (parcial o total) de la enfermedad y/o que prolonga la supervivencia. Un ejemplo de una enfermedad contemplada para el tratamiento con métodos de la invención es la ELA. El "tratamiento" de acuerdo con la invención, por tanto, alivia (elimina o reduce) al menos un síntoma asociado con el trastorno/cuadro clínico que se está tratando (por ejemplo, la pérdida de peso se elimina o se reduce en al menos un 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % o más), que retarda o previene la progresión hacia (la aparición/ desarrollo) de un trastorno/cuadro clínico, que retarda o previene la progresión de un trastorno/cuadro clínico, que disminuye la extensión de la enfermedad, que produce la remisión (parcial o total) de la enfermedad y/o que

prolonga la supervivencia. En algunas realizaciones, la supervivencia se prolonga en al menos un 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % o más.

5 Las terapias combinadas también están contempladas por la invención. La combinación, como se usa en el presente documento, incluye tanto el tratamiento simultáneo como los tratamientos secuenciales. Se contemplan específicamente combinaciones de métodos de la invención con tratamientos médicos convencionales (p. ej., riluzol), al igual que las combinaciones con terapias novedosas.

10 La administración de una dosis eficaz de las composiciones puede realizarse por vías convencionales en la técnica que incluyen, pero sin limitación, intramuscular sistémica, parenteral, intravenosa, oral, bucal, nasal, pulmonar, intracraneal, intratecal, intraósea, intraocular, rectal o vaginal. La(s) vía(s) de administración y el (los) serotipo(s) de los componentes AAV del rAAV (en particular, las ITR de AAV y la proteína de la cápside) de la invención pueden ser elegidos y/o combinados por los expertos en la técnica teniendo en cuenta la infección y/o el cuadro clínico que se está tratando y las células/tejido(s) diana que van a expresar los ARNhc dirigidos a SOD1. En algunas realizaciones, la vía de administración es sistémica. En algunas realizaciones la vía de administración es intratecal. En algunas realizaciones la vía de administración es introcerebroventricular. En algunas realizaciones la vía de administración es por la cisterna magna. En algunas realizaciones la vía de administración es por punción lumbar.

20 La transducción de células con rAAV de la invención produce una expresión sostenida de ARNhc dirigidos a SOD1. En otro aspecto, por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para administrar/suministrar rAAV que expresan ARNhc dirigidos a SOD1 a un sujeto, preferentemente un ser humano. El término "transducción" se usa para referirse a la administración/el suministro de ARNhc dirigidos a SOD1 a una célula receptora *in vivo* o *in vitro*, a través de un rAAV de replicación deficiente de la invención que produce la expresión de un ARNhc dirigido a SOD1 por parte de la célula receptora.

25 Por tanto, la invención proporciona métodos para administrar una dosis eficaz (o dosis, administradas esencialmente de manera simultánea o dosis administradas a intervalos) de rAAV que codifican ARNhc dirigidos a SOD1 a un sujeto que lo necesita.

30 En un aspecto, la invención proporciona métodos para suministrar un polinucleótido que codifica un ARNhc de la invención a través de la BHE que comprende administrar sistemáticamente un rAAV con un genoma que incluye el polinucleótido a un sujeto. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV es un genoma autocomplementario. En otras realizaciones, el genoma de rAAV es un genoma monocatenario. En algunas realizaciones, el rAAV es un rAAV9. En algunas realizaciones, el rAAV es un rAAV2. En algunas realizaciones, el rAAV es un rAAVrh74.

35 En algunas realizaciones, los métodos suministran sistemáticamente polinucleótidos a través de la BHE al sistema nervioso central y/o periférico. Por consiguiente, se proporciona un método para suministrar un polinucleótido al sistema nervioso central que comprende administrar sistemáticamente un rAAV con un genoma autocomplementario que incluye el genoma a un sujeto. En algunas realizaciones, el polinucleótido se suministra al cerebro. En algunas realizaciones, el polinucleótido se suministra a la médula espinal. También se proporciona un método para suministrar un polinucleótido al sistema nervioso periférico que comprende la administración sistémica de un rAAV con un genoma autocomplementario que incluye el polinucleótido a un sujeto. En algunas realizaciones, el polinucleótido se suministra a una neurona motora inferior. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV es un genoma autocomplementario. En otras realizaciones, el genoma de rAAV es un genoma monocatenario. En algunas realizaciones, el rAAV es un rAAV9. En algunas realizaciones, el rAAV es un rAAV2. En algunas realizaciones, el rAAV es un rAAVrh74.

40 En otro aspecto, la invención proporciona métodos para suministrar un polinucleótido al sistema nervioso central de un sujeto que lo necesite, que comprenden el suministro intratecal de rAAV con un genoma que incluye el polinucleótido. En algunas realizaciones, el genoma de rAAV es un genoma autocomplementario. En otras realizaciones, el genoma de rAAV es un genoma monocatenario. En algunas realizaciones, el rAAV es un rAAV9. En algunas realizaciones, el rAAV es un rAAV2. En algunas realizaciones, el rAAV es un rAAVrh74. En algunas realizaciones, también se administra al sujeto un agente de contraste no iónico de baja osmolaridad, por ejemplo, iobitridol, iohexol, iomeprol, iopamidol, iopentol, iopromida, ioversol o ioxilano.

55 Las realizaciones de la invención emplean rAAV para suministrar polinucleótidos a células nerviosas, células gliales y células endoteliales. En algunas realizaciones, la célula nerviosa es una neurona motora inferior y/o una neurona motora superior. En algunas realizaciones, la célula glial es una célula microglial, un oligodendrocito y/o un astrocito. En otros aspectos, el rAAV se usa para suministrar un polinucleótido a una célula de Schwann.

60 Breve descripción de los dibujos

65 Figura 1. Patrón de transducción de AAV9 y persistencia en ratones con SOD1^{G93A}. Se inyectó AAV9-GFP-CB en ratones con SOD1^{G93A} por vía intravenosa en P1, P21 y se sacrificaron 21 días después de la inyección (n = 3 por punto de tiempo). Se examinaron las médulas espinales para determinar la expresión de GFP, ChAT (marcador de neurona motora) y GFAP (marcador de astrocito). La inyección en la vena temporal de AAV9-GFP-CB en P1

produjo una transducción eficaz de neuronas motoras y la neuroglía en ratones con SOD1^{G93A} (a, f, k, p). La inyección en la vena de la cola en P21 (b, g, l, q) se centró predominantemente en astrocitos con pocas neuronas motoras con expresión de GFP. Para probar la persistencia de las células transducidas, se inyectó AAV9-GFP-CB por vía intravenosa en P1 y P21 en animales con SOD1^{G93A} que fueron sacrificados en la fase terminal (~P130). El análisis de inmunofluorescencia del cuerno ventral lumbar (c, d, h, i, m, n, r, s) demostró que la expresión de GFP se mantuvo en los astrocitos durante todo el curso de la enfermedad. Para determinar si la inflamación y el daño mediados por SOD1 afectarían a la transducción de AAV9, se inyectaron por vía intravenosa ratones con SOD1^{G93A} en P85 y se recogieron las médulas espinales en la fase terminal. No se observaron diferencias en el patrón de transducción de los ratones con SOD1^{G93A} tratados en P21 o P85. Los recuadros de (r-t) muestran la localización conjunta entre la señal GFP y GFAP, (u) Cuantificación de células transducidas en médula espinal con ELA (para cada grupo, se analizaron tejidos de 3 animales). Las columnas de GFP y ChAT muestran el número de células contadas. Barras = 100 μ m. VAA, dependoparvovirus; P1, día posnatal 1; P21, día posnatal 21; P85, día posnatal 85; GFP, proteína fluorescente verde; ChAT, colina acetiltransferasa; GFAP, proteína ácida fibrilar glial.

Figura 2. Las construcciones de ARNhc muestran una reducción eficaz de la proteína SOD1 humana *in vitro* e *in vivo*. (a) Alineaciones de secuencias entre SOD1 humana y de ratón para las regiones diana de las 4 construcciones de ARNhc diferentes probadas. (b) las secuencias de ARNhc se clonaron en una construcción de expresión de H1 y se transfectaron transitoriamente en células 293. Los lisados se recogieron 72 horas después de la transfección y se analizaron mediante transferencia Western. (c) La cuantificación de la inhibición *in vitro* de SOD1 humana de tres transfecciones transitorias separadas mostró una reducción de > 50 % en SOD1. (d) Se empaquetó ARNhc 130 en AAV9 y se inyectó en ratones con SOD1^{G93A} en P1 o P21. Se recogieron médulas espinales ($n = 3$ por punto de tiempo) tres semanas después de la inyección y se analizaron mediante transferencia Western para determinar los niveles de proteína SOD1 humana. (e) Cuantificación de la inhibición *in vivo* de SOD1 humana dentro de la médula espinal de ratones con ELA. Las médulas espinales inyectadas en P1 y P21 mostraron reducciones del 60 % y 45 % en la proteína SOD1 mutada, respectivamente. SOD1h, superóxido dismutasa humana 1; mSOD1, superóxido dismutasa 1 de ratón; GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

Figura 3. El suministro intravenoso de AAV9-ARNhc-SOD1 mejora la supervivencia y el rendimiento motor en ratones con SOD1^{G93A}. Los ratones con SOD1^{G93A} recibieron una sola inyección intravenosa de AAV9-SOD1-ARNhc en P1 ($n = 6$, verde), P21 ($n = 9$, rojo) o P85 ($n = 5$, azul). Los ratones tratados se controlaron hasta la fase terminal y se compararon con los ratones con SOD1^{G93A} de control no inyectados ($n = 15$, gris). (a, c) La inyección de AAV9-ARNhc-SOD1 en ratones con SOD1^{G93A} P1 retrasó significativamente la mediana de la aparición de la enfermedad 39,5 días en comparación con los animales de control (no inyectados, 103 días; P1, 142,5 d; $p < 0,05$). La inyección en animales con ELA en P21 (rojo) o P85 (azul) no tuvo efecto sobre la aparición de la enfermedad (P21, 110 d; P85, 105 d). Sin embargo, AAV9-ARNhc-SOD1 administrada en P1, P21 o P85 aumentó significativamente la mediana de la supervivencia (b, e) (no inyectado, 132 d; P1, 183,5 d; P21, 171 d; P85, 162 d; todas las comparaciones con el control $p < 0,001$). El grupo de P21 tuvo una ampliación significativa en la mediana de la duración de la enfermedad (d), lo que indica una ralentización de la enfermedad (no inyectado, 29,5 d; P1, 41 d; P21, 49 d; P85, 40 d; prueba del orden con signo de Wilcoxon, $p = 0,06$, 0,01 y 0,12, respectivamente). (f-h) Los animales tratados en P1 y P21 mantuvieron sus pesos, tuvieron una mejor fuerza de agarre de las extremidades traseras y un mejor rendimiento en la prueba del cilindro giratorio en comparación con los controles de la misma edad, lo que indicó que los animales tratados conservaron el tono muscular y la función motora durante el período ampliado de supervivencia. Las líneas entre barras en (c-e) indican diferencias estadísticamente significativas. * $p < 0,05$. P1, día posnatal 1; P21, día posnatal 21; P85, día posnatal 85.

Figura 4. La inyección intravenosa de AAV9-ARNhc-SOD1 reduce la proteína mutada en la médula espinal de ratones con SOD1^{G93A}. (a-d) Imágenes de cortes de la médula espinal lumbar de ratón no inyectado (a), inyectado en P1 (b). Se capturaron ratones inyectados en P21 (c) y P85 (d) con configuraciones de microscopio idénticas para mostrar cualitativamente los niveles de SOD1 en la fase terminal. Los niveles de SOD1 son inversamente proporcionales a la supervivencia. (e-t) El comaraje con GFP, ChAT y SOD1 muestra que las neuronas motoras transducidas por AAV9 habían reducido la expresión de SOD1 (flechas) mientras que las células que carecían de GFP mantuvieron altos niveles de proteína mutada (puntas de flecha). Como se describe en la Figura 1u, se observó una mayor transducción de NM y la correspondiente reducción de SOD1 en ratones inyectados en P1 (i-l) en comparación con ratones inyectados en P21 (m-p) y ratones inyectados en P85 (q-t). Barra = 100 μ m. P1, día posnatal 1; P21, día posnatal 21; P85, día posnatal 85; SOD1, superóxido dismutasa 1; GFP, proteína fluorescente verde; ChAT, colina acetiltransferasa.

Figura 5. AAV9-ARNhc-SOD1 mejora la supervivencia y el rendimiento motor en ratones con SOD1^{G37R} tratados tras iniciarse la enfermedad. (a) No hubo diferencia en la mediana del inicio de la enfermedad entre los ratones tratados con AAV9-ARNhc-SOD1 y con el control. (edad promedio en el momento del tratamiento = 215 días frente a la mediana del inicio de 194 días del control y 197 días de tratamiento; prueba del orden logarítmico, $p = 0,46$). (b,f) La mediana de la supervivencia de los ratones con SOD1^{G37R} tratados con AAV9-ARNhc-SOD1 ($n = 25$) se amplió significativamente con respecto a los ratones de control ($n = 21$). (control, $n = 21$, 392 d; ARNhc dirigido a SOD1, $n = 25$, 478,5 d; Prueba del orden logarítmico, $p < 0,0001$) (c-e) La primera fase de la enfermedad se ralentizó significativamente en 73 días en los ratones tratados en comparación con los ratones de control (control,

89 d; ARNhc dirigido a SOD1, 162 d; $p < 0,0001$ prueba del orden con signo de Wilcoxon) mientras que la fase tardía de la enfermedad mostró una ralentización no significativa (control, 63d; ARNhc dirigido a SOD1, 81 d; $p = 0,14$, prueba del orden con signo de Wilcoxon). En conjunto, esto equivalió a un aumento de 66 días en la mediana de la duración de la enfermedad (control, 173 d; ARNhc dirigido a SOD1, 239 d; $p < 0,0001$, prueba del orden con signo de Wilcoxon). (g) Apareció una tendencia a mejorar la fuerza de agarre de las extremidades traseras en ratones tratados con AAV9-ARNhc-SOD1 en comparación con los ratones de control.

Figura 6. La inyección intravenosa de AAV9 en ratones adultos con SOD1^{G37R} se dirige a los astrocitos y las neuronas motoras dentro de la médula espinal. (a-h) El análisis de inmunofluorescencia reveló la transducción neuronal y glial en ratones tratados con AAV9-GFP-CB (a-d) y AAV9-ARNhc-SOD1 (e-h). (i-p) Los niveles de SOD1 humana parecían reducidos en ratones tratados con AAV9-ARNhc-SOD1 (o) en comparación con ratones tratados con AAV9-GFP (k). Barra = 100 μ m. GFP, proteína fluorescente verde; ChAT, colina acetiltransferasa; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; SOD1, superóxido dismutasa 1.

Figura 7. La infusión intratecal de AAV9-ARNhc-SOD1 en primates no humanos conduce a una reducción eficaz de los niveles de SOD1. (a) Un mielograma poco después de la infusión intratecal de AAV9-ARNhc-SOD1 mezclado con contraste muestra la administración adecuada en el espacio subaracnoideo de un macaco cangrejero. Las flechas muestran la difusión del medio de contraste a lo largo de toda la médula espinal. (b) Se recogieron cortes de la médula espinal lumbar de monos tratados ($n = 3$) dos semanas después de la inyección y se tiñeron para determinar la GFP mediante tinción con DAB. Los cortes tuvieron una expresión generalizada de GFP en toda la materia gris y blanca, (c-e) El análisis de inmunofluorescencia de los cortes de la médula espinal lumbar mostró una expresión potente de GFP (c) dentro de las células con expresión de ChAT (d), lo que indica la transducción de neuronas motoras (e, fusión). (f) El análisis de transferencia Western de las médulas espinales lumbares mostró una reducción significativa en los niveles de SOD1 en animales inyectados con AAV9-ARNhc-SOD1 en comparación con los controles. (g) La cuantificación *in vivo* de la atenuación de SOD1 en el homogeneizado de médula espinal lumbar de mono ($n = 3$) mostró una reducción del 87 % en los animales que recibieron AAV9-ARNhc-SOD1 en comparación con los controles no inyectados. (h) Se utilizó microdissección de captura con láser para recoger neuronas motoras o neurópilos circundantes de cortes lumbares de mono inyectados y de control. Las células recogidas se analizaron para determinar los niveles de SOD1 mediante qRT-PCR. Las neuronas motoras recogidas de animales tratados con AAV9-ARNhc-SOD1 ($n=3$) tuvieron una reducción del 95 ± 3 % en el ARN dirigido a SOD1. Las no neuronas tuvieron una reducción del 66 ± 9 % en el ARN dirigido a SOD1 en animales tratados con AAV9-ARNhc-SOD1. Barras de escala: b = 100 μ m; e = 50 μ m. SOD1: Superóxido dismutasa 1.

Figura 8. La infusión intratecal lumbar de AAV9-ARNhc-SOD1 conduce a una transducción eficaz de neuronas motoras y células no neuronales en la médula cervical, torácica y lumbar, que produce una reducción de SOD1. (a-c) El análisis de inmunofluorescencia de los tres segmentos de la médula espinal; cervical (a), torácica (b) y lumbar (c), mostró una expresión potente de GFP (verde) dentro de las células con expresión de Chat (rojas), lo que indica la transducción de neuronas motoras. (d) Las cifras de células con expresión de GFP⁺/Chat⁺ muestran un gradiente caudal a rostral de transducción de neuronas motoras que varía del 85 % de las células transducidas en la región lumbar a más del 50 % en la región cervical. (e) niveles de ARNm dirigido a SOD1 en homogeneizados de cortes de médula cervical, torácica y lumbar analizados mediante qRT-PCR muestran una reducción significativa en la transcripción de SOD1, que coincide con la transducción de neuronas motoras. Los niveles de SOD1 se normalizaron con respecto a β -actina y los animales inyectados con AAV9-ARNhc-SOD1 se compararon con un control inyectado con AAV9-GFP-CB. Barras de escala: (a-c) = 50 μ m; Barras de error: (d-e) = DT.

Figura 9. Diseño de una construcción clínica de ARNhc dirigido a SOD1. (a) La construcción original de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 contiene una secuencia de ARNhc contra SOD1 humana bajo el promotor de H1 seguido del casete de expresión para GFP que incluye el potenciador de CMV, promotor de CBA, intrón SV40 modificado y secuencia transgénica de GFP seguida del terminador PolyA de bGH. El casete de expresión de ARNhc dirigido a SOD1 y el casete de expresión de GFP están flanqueados por ITR de AAV2 que garantizan el empaquetamiento de la secuencia flanqueada completa en la cápside de AAV9. (b) En la construcción clínica de ARNhc dirigido a SOD1, el casete de expresión de GFP se reemplaza por un elemento de relleno que contiene secuencias no codificantes en tándem de vacunas de ADN aprobadas por la FDA. ITR: *Inverted Terminal Repeats*, repeticiones terminales invertidas; ARNhc, ARN horquillado corto; SOD1, superóxido dismutasa 1; CMV, potenciador del citomegalovirus; CBA, promotor de β -actina de pollo; GFP, proteína fluorescente verde; pA de bGH, terminador polyA de la hormona del crecimiento bovino.

Figura 10. Esquema de la construcción clínica de ARNhc dirigido a SOD1. Se colocan diferentes sitios de restricción en la construcción clínica de ARNhc dirigido a SOD1 que permiten la clonación de múltiples casetes de expresión de ARNhc mientras se mantiene la distancia total entre las dos ITR.

Figura 11. La transfección *in vitro* de la construcción clínica de ARNhc dirigido a SOD1 reduce de manera eficaz la proteína SOD1 humana en las células HEK293. Campos microscópicos representativos que muestran imágenes de campo claro de control no transfectado (a), AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 transfectado (b) y células HEK 293 transfectadas con vector lanzadera pJet de ARNhc dirigido a SOD1 (c,d), 72 horas después de la

transfección. Las imágenes de fluorescencia correspondientes revelan la falta de fluorescencia de GFP de las células HEK 293 transfectadas con pJet de ARNhc dirigido a SOD1 (g, h) en comparación con las células transfectadas con AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 (f). (i) El análisis de transferencia Western de los lisados celulares confirma la atenuación eficaz de la proteína SOD1 humana en células transfectadas con pJet de ARNhc dirigido a SOD1 en comparación con las células de control no transfectadas. El análisis de inmunotransferencia también confirma la eliminación del transgén GFP de la construcción de pJet de ARNhc dirigido a SOD1. (j) Cuantificación de la regulación a la baja *in vitro* de SOD1 por pJet de ARNhc dirigido a SOD1. pJet de ARNhc dirigido a SOD1 reduce los niveles de proteína de SOD1 humana en casi un 50 % en células HEK293 en comparación con el control. Esta reducción es similar a la lograda con la construcción de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1.

Figura 12. Esquema de la estrategia de clonación para el vector clínico de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1. La construcción clínica de ARNhc dirigido a SOD1 se clonó en el vector AAV-MCS-CB usando sitios Kpn1/SPH1. La digestión doble con Kpn1/SPH1 del plásmido AAV-MCS-CB produce la liberación del casete de expresión del transgén completo de este vector, que se reemplaza adicionalmente con la construcción clínica de ARNhc dirigido a SOD1 portadora del casete de expresión de ARNhc dirigido a SOD1 y la secuencia de relleno.

Figura 13. La construcción clínica de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 reduce de manera eficaz los niveles de SOD1 humana *in vitro*. Las células HEK293 se transfectaron con el plásmido clínico de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 mediante el método de fosfato de calcio. Campos microscópicos representativos que muestran imágenes de campo claro de control no transfectado, células transfectadas con AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 y construcción clínica de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 respectivamente, 72 horas después de la transfección (a-c). La eliminación exitosa de GFP de la construcción clínica de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 se confirmó por la falta de expresión de GFP en células transfectadas con la construcción clínica de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 (f, g). (g) Análisis de transferencia Western de lisados celulares, recogidos 72 horas después de la transfección confirmaron una regulación a la baja eficaz de SOD1 en células transfectadas con la construcción clínica de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 en comparación con el control. Se usó AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 como control positivo. (h) Cuantificación de la atenuación *in vitro* de SOD1 por la construcción clínica de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1.

Figura S1. La administración de AAV9-ARNhc-SOD1 se tolera bien en ratones TN. Se inyectaron animales TN hembras y machos con AAV9-ARNhc-SOD1 en P1 o P21 y se controlaron hasta los 6 meses de vida. (a,b) Los ratones tratados tanto machos como hembras mostraron un aumento constante en la masa corporal en comparación con los animales de control. (c, d) El rendimiento según la prueba del cilindro giratorio y (e,f) la fuerza de agarre de las extremidades traseras no se vieron afectados por el tratamiento en P1 o P21 en ambos grupos en comparación con los controles respectivos. $n = 5$ por grupo. TN, Tipo Natural; P1, día posnatal 1; P21, día posnatal 21.

Figura S2. Hematología y química sérica de animales TN tratados con AAV9-ARNhc-SOD1. (a-m) Se extrajo sangre de animales TN tratados en P1 (verde) o P21 (rojo) y de control (gris) a los 150 días de vida para estudios de hematología. No se observaron diferencias significativas entre los animales tratados y los de control, (n-w) Las muestras de suero recogidas a los 180 días de vida de los mismos ratones no mostraron diferencias significativas en el perfil químico del suero. Media $\pm$ ETM. $n = 5$ por grupo. P1, día posnatal 1; P21, día posnatal 21.

Figura S3. El tratamiento con AAV9-ARNhc-SOD1 en ratones con SOD1^{G93A} reduce la astrogliosis. Se recogieron cortes de la fase terminal del control y de los animales tratados con AAV9-ARNhc-SOD1 y se tiñeron para detectar GFAP, un marcador de activación de astrocitos. Los ratones inyectados en P1 (b) y P85 (d) mostraron niveles reducidos de astrogliosis en comparación con los ratones de control (a), mientras que los ratones inyectados en P21 (c) mostraron la reducción máxima. Esto coincidió con el porcentaje de transducción de astrocitos logrado en estos ratones (Figura 1u). Sin embargo, no se observó ningún efecto sobre la reactividad de la microglía (e-h). Barra = 100 μ m. P1, día posnatal 1; P21, día posnatal 21; P85, día posnatal 85.

Figura S4. La inyección intravenosa de AAV9-ARNhc-SOD1 reduce de manera eficaz los niveles de proteína SOD1 mutada en las médulas espinales de los ratones con SOD1^{G37R}. (a) Una vez iniciada la enfermedad, se inyectó AAV9-GFP-CB o AAV9-ARNhc-SOD1 en ratones con SOD1^{G37R} y se extrajeron las médulas espinales en la fase terminal y se analizaron mediante transferencia Western para determinar los niveles de proteína SOD1 humana. (b) La cuantificación de a) muestra la inhibición de SOD1 humana dentro de la médula espinal de ratones con SOD1^{G37R} ($n = 4$ por grupo). SOD1h, superóxido dismutasa humana 1; GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

Figura S5. El ARNhc 130 reduce eficazmente los niveles de SOD1 de mono *in vitro*. (a) Alineación de secuencias de la región a la que se dirige el ARNhc 130 dirigido a SOD1 y una única falta de coincidencia con la secuencia de mono. La secuencia del mono corresponde a la secuencia de SOD1 del macaco de la India (NM 001032804.1), macaco cangrejero (secuenciado internamente) y mono verde africano. (b) El casete de expresión de ARNhc 130 se clonó en un vector lentivírico y se usó para infectar células Cos-7. Los lisados se analizaron 72 horas después de la infección mediante qRT PCR para determinar la SOD1. ARNhc 130 redujo los niveles de transcripción de

SOD1 en un 75 % en células Cos-7.

Ejemplos

- 5 La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos. Si bien la presente invención se ha descrito en términos de varias realizaciones y ejemplos, se entiende que, a los expertos en la materia, se les ocurrirán variaciones y mejoras. Por lo tanto, solo deben imponerse a la invención las limitaciones que figuran en las reivindicaciones.

Ejemplo 1

- 10 Patrón de transducción de AAV9 y persistencia en ratones con SOD1^{G93A}

Primero se evaluó la eficacia de la transducción de AAV9 en un modelo de ratón con SOD1^{G93A} que desarrolla una enfermedad de parálisis mortal. Se obtuvieron ratones con SOD1^{G93A} de alta reproducción de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) y se criaron en el laboratorio de Kaspar. Los animales fueron genotipados antes del tratamiento para obtener ratones que expresaran SOD1^{G93A} y sus compañeros de camada de tipo natural. Solo se incluyeron ratones hembra en los experimentos de SOD1^{G93A}. A los animales se les inyectó por vía intravenosa el día 1 o el día 21 posnatal (que se denominarán P1 y P21, respectivamente) con AAV9 autocomplementario que expresaba GFP del potenciador de CMV/promotor de β -actina (CB) (AAV9-GFP-CB) ($n = 3$ por grupo). Tres semanas después de la inyección, se sacrificaron los animales y se examinaron las médulas espinales para determinar la expresión de GFP (Figs. 1a-u).

25 Todos los procedimientos con animales descritos en el presente documento se realizaron de acuerdo con las directrices del NIH y fueron aprobados por el Instituto de Investigación del Hospital Infantil Nacional de EE. UU. (Columbus, OH), Comités institucionales de cuidado y uso de animales de la Universidad de California (San Diego, CA) o la Fundación Mannheimer (Homestead, FL).

La eficiencia de transducción fue alta en astrocitos SOD1^{G93A} con GFP expresada en $34 \pm 2\%$ y $54 \pm 3\%$, respectivamente, de astrocitos de materia gris espinal inyectados EN P1 y P21 (definidos por inmunoreactividad para GFAP). Esta eficiencia fue similar a nuestro informe anterior de $64 \pm 1\%$ en animales de tipo natural inyectados en P21¹⁸. Las neuronas motoras fueron un tipo de célula destacado transducido en todos los niveles de la médula espinal de animales con SOD1^{G93A} inyectados en P1 ($62 \pm 1\%$), en comparación con un direccionamiento significativamente menor a las neuronas motoras en animales inyectados en P21 ($8 \pm 1\%$).

35 Aunque anteriormente los presentes inventores han informado que los astrocitos transducidos en las médulas espinales de tipo natural persisten con la acumulación continua de GFP durante al menos 7 semanas después de la inyección¹⁸, no se probó la longevidad de los astrocitos con SOD1 mutada (y su síntesis continua de genes codificados por el episoma AAV9) durante una enfermedad similar a la ELA activa. Por lo tanto, los ratones con SOD1^{G93A} fueron inyectados en P1 y P21 con AAV9-GFP-CB y recibieron un seguimiento hasta la fase terminal ($\sim$ P130, $n = 3$ por grupo) (Figs. 1c, d, h, i, m, n, r, s). El examen inmunofluorescente de las médulas espinales con SOD1^{G93A} en fase terminal de los animales inyectados en P1 y P21 mostraron un número comparable de astrocitos que expresaban GFP al que se encontró 21 días después de la inyección de AAV9 (P1: $42 \pm 2\%$, P21: $61 \pm 2\%$). Estos datos coinciden con la supervivencia de los astrocitos transducidos mientras duró la enfermedad ($\sim$ 110 días después de la inyección en P21) en ratones con SOD1^{G93A} y que se mantiene la expresión del gen codificado por AAV9.

Además, reconociendo que el daño mediado por la mutación de SOD1, incluida la activación astrocítica y microglial y los cambios en la primera fase en la barrera hematoencefálica que se desarrollan durante la enfermedad en ratones con mutación de SOD1²⁰, los presentes inventores probaron si este daño afectó la transducción de AAV9. Se inyectaron ratones con SOD1^{G93A} en P85 con AAV9-GFP-CB y se sacrificaron en la fase terminal ($n = 3$) (Figuras 1e, j, o, t). El análisis de la médula espinal reveló que el patrón de transducción observado en los animales P85 era similar al de los animales tratados en P21 con astrocitos como el tipo celular destacado transducido a todos los niveles ($51 \pm 6\%$ de células GFP⁺/GFAP⁺ en la materia gris lumbar).

Ejemplo 2

- 55 Desarrollo de una secuencia de ARNhc específica de SOD1 humana

Para dirigirse específicamente al ARNm de SOD1 humana, se generaron y obtuvieron cuatro construcciones de ARNhc dirigido a SOD1 humana a partir de la herramienta de diseño de Life Technologies. Las construcciones tenían un mínimo de cuatro faltas de coincidencia de bases en comparación con la secuencia de ARNm de ratón (Fig. 2a). Los números de bases para las secuencias humanas mostradas corresponden al número de registro CCDS33536.1 de la base de datos NCBI CCDS. Estas construcciones se clonaron en pSilencer 3.1 (Genscript) bajo el promotor de H1 humano y se probaron *in vitro*. El ARNhc 130 junto con el promotor de H1 se clonó adicionalmente en un vector AAV junto con una GFP indicadora bajo el promotor de β -actina de pollo para identificar las células transducidas. Se transfectaron células 293 humanas con cada casete. Las células HEK-293 se mantuvieron en medio IMDM que contenía FBS al 10 %, L-glutamina al 1 % y penicilina/estreptomicina al 1 %. Al alcanzar $\sim$ 60 % de confluencia, las

células se transfectaron con pSilencer 3.1 que contenía los ARNhc que se estaban probando. Los lisados proteicos se prepararon 72 horas después de la transfección y se analizaron los niveles de SOD1 mediante transferencia Western. Las cuatro secuencias redujeron los niveles de proteína SOD1 en > 50 % (Figs. 2b, c).

Se seleccionó ARNhc130 para experimentos adicionales porque produjo la caída más constante en tres experimentos de transfección separados. Se clonó en un vector AAV9 autocomplementario que también contenía un gen GFP cuya expresión identificaría las células transducidas (denominado AAV9-ARNhc-SOD1). El AAV9-ARNhc-SOD1 autocomplementario se produjo mediante procedimientos de transfección transitoria utilizando un vector GFP-CB basado en ITR de AAV2 bicatenario, con un plásmido codificante de la secuencia Rep2Cap9 como se ha descrito previamente junto con un plásmido auxiliar adenovírico pHelper (Stratagene, Santa Clara, CA) en 293 células¹⁸.

Para confirmar que el ARNhc podría inhibir la acumulación de SOD1 humana, se inyectaron ratones con SOD1^{G93A} ($n = 3$) por vía intravenosa con AAV9-ARNhc-SOD1 en P1 o P21. Para inyecciones de ratones neonatales, se utilizaron crías con SOD1^{G93A} 1-2 días posnatales. Se inyectó un volumen total de 50 μ l que contenía 5×10^{11} partículas víricas resistentes a la desoxirribonucleasa de AAV9-ARNhc-SOD1 (Virapur LLC, San Diego, CA) a través de la vena temporal como se ha descrito anteriormente¹⁸. Se verificó una inyección correcta notando la palidez de la vena. Después de la inyección, se devolvieron las crías a su jaula. Los animales se sacrificaron tres semanas después de la inyección y las médulas espinales se extrajeron y analizaron mediante inmunotransferencia para determinar la proteína SOD1 tanto humana (mutada) como murina (de tipo natural). Las médulas espinales inyectadas en P1 y P21 mostraron reducciones del 60 % y 45 % en la proteína SOD1 mutada, respectivamente (Figs. 2d, e). Los niveles de SOD1 murina se mantuvieron sin cambios en respuesta a la atenuación de SOD1 humana.

Ejemplo 3

AAV9-ARNhc-SOD1 es seguro y bien tolerado en ratones de tipo natural

Para determinar si la dosis alta de AAV9-ARNhc-SOD1 sería segura, se inyectaron ratones normales de ambos sexos por vía intravenosa en P1 o P21 (P1 = 5 machos, 5 hembras a 5×10^{11} gv; P21 = 5 machos, 5 hembras a 2×10^{12} genomas vectoriales (gv)) y luego se controlaron hasta los 6 meses de vida. Los ratones inyectados en P1 y P21 mostraron un aumento constante en la masa corporal similar a los ratones no tratados (Figura S1). Las pruebas de conducta semanales no observaron diferencias significativas entre los grupos inyectados y de control en las habilidades motoras (medidas con un cilindro giratorio), ni en la fuerza de agarre de las extremidades traseras. A los 150 y 180 días de vida, se extrajeron muestras de sangre. Los hemogramas completos y diferenciales de los grupos tratados y no tratados mostraron parámetros químicos sanguíneos similares (Figura S2). Las muestras de suero de ambos grupos no mostraron diferencias significativas en los niveles de fosfatasa alcalina, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, potasio, sodio y cloruro. Por último, todos los animales fueron sacrificados con 180 días de vida. Los análisis histopatológicos realizados por un anatomopatólogo con enmascaramiento al grupo de tratamiento no revelaron alteraciones significativas en los animales tratados con AAV9-ARNhc-SOD1 en comparación con los controles no inyectados (datos no mostrados). Los presentes inventores concluyen que tanto la administración de AAV9 como la expresión sostenida de ARNhc fueron aparentemente seguras y bien toleradas.

Ejemplo 4

Prolongación de la supervivencia de ratones con SOD1^{G93A} de

la reducción mediada por AAV9 en SOD1 mutada incluso cuando se inició a mitad de la enfermedad

Para probar la eficacia de la reducción de SOD1 mediada por AAV9, se trataron cohortes de ratones con SOD1^{G93A} con una sola inyección intravenosa de AAV9-ARNhc-SOD1 antes (P1, 5×10^{11} gv, $n = 6$ y P21, 2×10^{12} gv, $n = 9$) o después (P85, 3×10^{12} gv, $n = 5$) de iniciarse, reconociendo que muchos astrocitos, pero pocas neuronas motoras, se transducirían en los dos puntos de tiempo posteriores. Para las inyecciones en la vena de la cola de adultos, se colocó a los animales en una sujeción que situaba la cola de los ratones en una ranura iluminada y calentada. La cola se limpió con alcohol y luego se inyectó por vía intravenosa AAV9-ARNhc-SOD1.

El inicio de la enfermedad (medido por la pérdida de peso por atrofia muscular inducida por la denervación) se retrasó significativamente en una mediana de 39,5 días (Fig. 3a, c; no inyectados, 103 d; P1, 142,5 d; $p < 0,05$, prueba del orden con signo de Wilcoxon) en la cohorte inyectada en P1, pero permaneció invariable con las inyecciones posteriores (P21, 110 d; P85, 105 d). Los animales tratados en P1 y P21 mantuvieron su peso, tuvieron un mejor rendimiento en la prueba del cilindro giratorio y la fuerza de agarre de las extremidades traseras en comparación con los controles de la misma edad, lo que indica que los animales tratados mantuvieron el tono muscular y la función motora durante su supervivencia prolongada (Figs. 3f-h). La supervivencia se prolongó significativamente con la inyección de AAV9 en las tres edades, produciendo tiempos de supervivencia de 30 a 51,5 días más que los ratones con SOD1^{G93A} que no recibieron la inyección (no inyectados, 132 d; P1, 183,5 d; P21, 171 d; P85, 162 d; Prueba del orden logarítmico $p = 0,0001$, 0,0003 y 0,001, respectivamente) (Figs. 3b, e). La definición de la duración de la enfermedad como el tiempo desde el inicio hasta la fase terminal reveló que el grupo de tratamiento en P21 había aumentado significativamente la duración, indicativo de progresión lenta de la enfermedad, en comparación con los controles no inyectados (no inyectados, 29,5 d; P21, 49 d; prueba del orden con signo de Wilcoxon, $p = 0,01$), con

tendencias hacia una progresión más lenta en los animales inyectados en las otras dos edades (P1, 41d; P85, 40 d; $p = 0,06$ y $0,12$, respectivamente) (Fig. 3d). El porcentaje más bajo de células no neuronales dirigidas en P1 frente a las dirigidas en P21 (Figura 1u) sugiere que se debe dirigir una cantidad mínima de células no neuronales para retrasar la progresión de la enfermedad en el modelo SOD1^{G93A} de progresión rápida (Fig. 1u).

Ejemplo 5

Reducción de SOD1 mutada en células infectadas con AAV9 en ratones con SOD1^{G93A} tratados

Se utilizó la inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo que reconoce SOD1 humana, pero no murina, para determinar los niveles de SOD1 mutada acumulados en la médula espinal en fase terminal de los ratones tratados y de control. Los niveles de SOD1 humana en los cortes de la médula espinal en fase terminal fueron inversamente proporcionales al aumento de la supervivencia (Figs. 4a-d). En la fase terminal, los animales inyectados con AAV9-ARNhc-SOD1 en P1 (fig. 4b), P21 (Fig. 4c) y P85 (Fig. 4d) tenían niveles más bajos de SOD1 mutada en comparación con los animales con SOD1^{G93A} no inyectados (Fig. 4a). La expresión de SOD1 dentro de las neuronas motoras transducidas (identificadas por células que expresan GFP y ChAT) se redujo en comparación con las neuronas circundantes que no se habían transducido para expresar GFP codificada por virus (Figs. 4h, i, p, t; flechas frente a puntas de flecha). Por otra parte, las imágenes de inmunofluorescencia de la médula espinal en fase terminal revelaron la reducción correspondiente en la astrogliosis, pero no hay diferencia en la microgliosis en los animales tratados con AAV9-ARNhc-SOD1 frente a los controles (Figura S3).

Ejemplo 6

Ralentización terapéutica de la progresión de la enfermedad con inyección periférica de AAV9 después del inicio

Para determinar si la reducción de SOD1 mutada mediada por AAV9 retrasaría la progresión de la enfermedad, se inyectó AAV9-ARNhc-SOD1 a una cohorte de ratones con SOD1^{G37R6} por vía intravenosa tras iniciarse la enfermedad (edad promedio en el momento del tratamiento = 215 días frente a la mediana de inicio de 197 días en los animales tratados; Prueba del orden logarítmico, $p = 0,46$; Fig. 5a). Ratones con ELA *loxSOD1*^{G37R}, portadores de un transgén SOD1^{G37R} mutado humano flanqueado por sitios lox p bajo su promotor endógeno, se mantuvieron como se ha descrito anteriormente³⁷. Como control, se utilizó una combinación de AAV9-GFP-CB ($n=9$) y compañeros de la misma camada no inyectados ($n = 12$).

El análisis *post hoc* no mostró diferencias entre GFP y animales no inyectados, por lo tanto, los grupos se compilaban como "control" en la Fig. 5. Los animales fueron evaluados semanalmente en cuanto al peso corporal y la fuerza de agarre de las extremidades traseras y controlados hasta la fase terminal. El tratamiento con AAV9-ARNhc-SOD1 tras iniciarse la enfermedad prolongó significativamente la mediana de la supervivencia en 86,5 días sobre los animales de control (control, $n = 21$, 392 d; ARNhc dirigido a SOD1, $n = 25$, 478,5 d; Prueba del orden logarítmico, $p < 0,0001$). La duración de la primera fase de la enfermedad, definida por el tiempo desde el valor máximo de peso hasta el 10 % de pérdida de peso, fue significativamente más lenta (control, 89 d; Ratones tratados con ARNhc dirigido a SOD1, 162 días; prueba del orden con signo de Wilcoxon, $p < 0,01$; fig. 5c). También se observó una tendencia continua hacia la desaceleración de la segunda fase de la enfermedad (pérdida de peso del 10 % hasta la fase terminal) (control, 63 d; Ratones tratados con ARNhc dirigido a SOD1, 81 d; prueba del orden con signo de Wilcoxon, $p = 0,1389$; fig. 5d). La duración general de la enfermedad tras el tratamiento con AAV9-ARNhc-SOD1 aumentó a los 239 días del inicio de la enfermedad frente a 173 días en los ratones de control (prueba del orden con signo de Wilcoxon, $p < 0,0001$; fig. 5e). De acuerdo con la progresión ralentizada, el tratamiento con AAV9 mantuvo la fuerza de agarre en relación con los animales con SOD1 mutada de control (Fig. 5g). La prolongación de 86,5 días en la supervivencia superó la prolongación de 62 días observada en estudios transgénicos que utilizaron la expresión de Cre específica de los astrocitos para inactivar el transgén SOD1^{G37R} mutado⁸, reflejando presumiblemente la transducción eficaz de AAV9 de astrocitos después del suministro periférico y la posible transducción de otros tipos de células (especialmente microgliales⁶) cuya síntesis de SOD1 mutada acelera la progresión de la enfermedad.

El examen histológico de animales en fase terminal tratados con SOD1^{G37R} revelaron niveles similares de transducción de células intraespinales en animales tratados con AAV9-ARNhc-SOD1 o AAV9-GFP (Figura 6). La expresión de GFP se observó predominantemente dentro de las neuronas motoras y los astrocitos de ambos grupos, y la expresión de SOD1 disminuyó de manera detectable solo en los animales que recibieron AAV9-ARNhc-SOD1 (Figs. 6k, o). El inmunotransferencia de extractos de médula espinal entera de ratones SOD1^{G37R} en fase terminal reveló una reducción del 80 % de los niveles de proteína hSOD1 en los animales tratados con AAV9-ARNhc-SOD1 en comparación con los controles (Figura S4).

Ejemplo 7

Inhibición mediada por AAV9 de SOD1 en primates no humanos

Para probar si los niveles de SOD1 podrían reducirse de manera eficaz utilizando AAV9 en la médula espinal de primates no humanos, se inyectó AAV9 por vía intratecal a través de una punción lumbar. Se escogió este método

frente a la administración sistémica para disminuir la cantidad de virus necesaria y minimizar los efectos de la reducción de SOD1 en los tejidos periféricos. Para este estudio, se utilizaron macacos cangrejeros de un año (*Macaca fascicularis*) con un peso corporal promedio de 2 kg en la Fundación Mannheimer. Antes y después de las inyecciones se realizó un seguimiento regular de la salud general y el peso corporal para evaluar el bienestar de los animales.

La secuenciación de ADNc copiado de ARNm aislado de mono verde africano (células COS) y del macaco cangrejero verificó que el ARNhc 130 tenía una falta de coincidencia de una sola base con cualquiera de las secuencias (Figura S5). El casete de expresión de ARNhc 130 se insertó en un vector lentivírico que luego se usó para transducir células COS. Las células Cos-7 se mantuvieron en DMEM con FBS al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 %. Las células se infectaron con un vector lentivírico que expresaba ARNhc 130 dirigido a SOD1 bajo el promotor de H1 y RFP bajo el promotor de CMV. El ARN se extrajo de células infectadas y no infectadas 72 horas después de la infección utilizando un kit RNAeasy (Qiagen). Se preparó ADNc con el kit de síntesis de la primera cadena RT² (SABiosciences). Los niveles de transcripción de SOD1 se analizaron mediante qRT-PCR, lo que reveló que el ARNm de SOD1 de mono se redujo en ~75 % en células transducidas con ARNhc 130 en comparación con las células de control transducidas simuladas (Figura S5).

Se infundió el virus AAV9-ARNhc-SOD1 (1×10^{13} gv/kg) junto con el agente de contraste a través de una punción lumbar en el espacio subaracnoideo de tres macacos cangrejeros macho y a un sujeto de control se le inyectó AAV9-GFP-CB (1×10^{13} gv/kg) (Fig. 7a). Cada inyección intratecal se realizó mediante punción lumbar en el espacio subaracnoideo del saco tecal lumbar. Se volvió a suspender AAV9 con omnipaque (iohexol), un compuesto yodado utilizado habitualmente en el entorno clínico. El iohexol se usa para validar la canulación exitosa en el espacio subaracnoideo y se administró a una dosis de 100 mg/kg. El sujeto se colocó en posición de decúbito lateral y se identificó el sitio de inyección de la línea media posterior en el nivel L4/5 (debajo del cono de la médula espinal). En condiciones estériles, se introdujo una aguja espinal con estilete y se confirmó la canulación subaracnoidea con el flujo de LCR claro de la aguja. Para disminuir la presión en el espacio subaracnoideo, se drenaron 0,8 ml de LCR, seguido inmediatamente de una inyección con una mezcla que contenía 0,7 ml de iohexol (formulación de 300 mg/ml) mezclada con 2,1 ml de virus (2,8 ml en total).

No se identificaron efectos secundarios de los tratamientos. Dos semanas después de la inyección, se extrajeron las médulas espinales para el análisis de la expresión de GFP y los niveles de ARN de SOD1. Se observó la expresión de GFP ampliamente en células neuronales y astrocíticas en toda la materia gris y blanca de la médula espinal lumbar, el área más cercana al sitio de inyección (Figs. 7b-e). La inmunotransferencia de extractos de la médula espinal lumbar reveló una reducción del 87 % en los niveles de proteína SOD1 de mono (Figs. 7f, g). A continuación, se utilizó la microdissección con captura láser para aislar el ARN total de las neuronas motoras, así como de la glía en el neurópilo cercano. El análisis mediante RT-PCR cuantitativa utilizando cebadores específicos para SOD1 de mono (y normalizados con respecto a la actina) confirmó una atenuación del 95 ± 3 % en el grupo de neuronas motoras y una atenuación del 66 ± 9 % en el grupo del neurópilo en comparación con las muestras de un animal de control (Figura 7h).

A continuación, se examinó el nivel de transducción celular en toda la médula espinal, incluidos los segmentos cervical, torácico y lumbar. Se encontró que GFP se expresaba ampliamente dentro de todos los cortes analizados (Figs. 8a-c). Los recuentos de neuronas motoras revelaron un gradiente de caudal a rostral en la transducción celular, mostrando la región cervical más del 50 % de las neuronas motoras GFP/Chat⁺, aumentando al 65 % en la región torácica y alcanzando un notable 80 % en la región lumbar (Fig. 8d). Para determinar el nivel general de atenuación de SOD1 logrado con este patrón de transducción, se realizó la qRT-PCR para la SOD1 en cortes enteros homogeneizados de segmentos de médula cervical, torácica y lumbar. Los resultados confirmaron una gran reducción de SOD1 en los tres niveles de la médula espinal, que variaba de una disminución del 60 % en el segmento cervical, una disminución del 70 % en la región torácica y una disminución del 88 % en la región lumbar (Fig. 8e), de acuerdo con la proporción de células transducidas en cada región.

Análisis

Los ejemplos anteriores muestran que la administración intravenosa de AAV9-ARNhc-SOD1 es segura y bien tolerada en ratones de tipo natural, con la ausencia de reacción adversa después de la evaluación a largo plazo. Este enfoque ha logrado una de las prolongaciones más largas en la supervivencia jamás informada en el modelo de ELA en ratones con SOD1^{G93A} de progresión rápida (aumento de la supervivencia en un 39 % cuando el tratamiento se inicia al nacer). Y lo que es aún más alentador, se observa una progresión de la enfermedad notablemente más lenta incluso cuando se aplica el tratamiento con AAV9 para reducir la síntesis de SOD1 mutada tras iniciarse la enfermedad en ratones con SOD1^{G37R}, ampliándose así significativamente la supervivencia. Por tanto, el paradigma de suministro vascular en ratones representa una prueba de concepto de que la atenuación de SOD1 mutada tras iniciarse la enfermedad puede ser beneficiosa en modelos de ELA de progresión rápida y más lenta en puntos pertinentes clínicamente de la enfermedad. En conjunto, estos datos muestran que el direccionamiento y la inhibición potentes de los niveles de SOD1 mediante el suministro de ARNhc mediado por AAV9 son eficaces para ralentizar la progresión de la enfermedad en modelos de ratón con ELA, incluso cuando el tratamiento se inicia tras iniciarse la enfermedad.

Múltiples estudios recientes han presentado la hipótesis de que la SOD1 de tipo natural puede contribuir al (a los)

mecanismo(s) patógeno(s) que subyace(n) a la ELA esporádica a través del plegamiento incorrecto a través de una vía similar a la generada por la SOD1 mutada^{14, 30-32}. Incluido en esta cantidad de pruebas está la demostración de los presentes inventores de que los astrocitos producidos por pacientes con ELA esporádica son tóxicos para las neuronas motoras cocultivadas y que la toxicidad se alivia mediante la reducción mediada por ARNip en SOD1 de tipo natural³⁰.

Estas pruebas crean la posibilidad de que una proporción de pacientes con ELA esporádica también pueda beneficiarse de la metodología de reducción de SOD1 mediada por AAV9 demostrada en el presente documento, que es eficaz para retrasar la progresión de la enfermedad en ratones que desarrollan la enfermedad mortal similar a la ELA por la expresión de mutaciones causantes de ELA en SOD1.

Por último, para el traslado de una inhibición mediada por AAV9 de la síntesis de SOD1 al entorno humano, se ha determinado que la infusión directamente en el LCR a nivel lumbar en un primate no humano produce una reducción sustancial de SOD1 al dirigirse tanto a las neuronas motoras como a las células no neuronales. Este resultado brinda un gran apoyo para extender estos esfuerzos a un ser humano adulto mediante la inyección directa en el LCR, como se ha propuesto anteriormente^{33,34}, para 1) limitar el coste de la producción vírica, 2) reducir la posibilidad de que la inhibición crónica de SOD1 en la periferia pueda tener consecuencias perjudiciales y 3) reducir la exposición vírica al sistema inmunitario periférico³³. Estos datos indican claramente que AAV9-ARNhc-SOD1 es un tratamiento para la ELA.

Técnicas/métodos utilizados en los Ejemplos 1-7

Perfusión y procesamiento de tejidos. Los ratones de control y con SOD1^{G93A} tratados fueron sacrificados a los 21 días tras la inyección o al final de la misma para el análisis inmunohistoquímico. Los animales fueron anestesiados con cóctel de xilaceno/ketamina, perfundido por vía transcardíaca solución salina al 0,9 %, seguida de paraformaldehído al 4 %. Se extrajeron las médulas espinales, se cortaron en bloques de tejido de 5-6 mm de longitud y luego se cortaron en cortes transversales de 40 µm de espesor en un vibratomo (Leica, Bannockburn, Illinois). Se mantuvieron los cortes en serie en una placa de 96 pocillos que contenía paraformaldehído al 4 % y se almacenaron a 4 °C. Los ratones con *loxSOD1*^{G37R} en fase terminal fueron anestesiados con isoflurano y perfundidos con paraformaldehído al 4 %. Se diseccionaron segmentos de la médula espinal, incluidos los segmentos cervical, torácico y lumbar. Después de la crioprotección con sacarosa al 20 %/paraformaldehído al 4 % durante la noche, se congelaron las médulas espinales en isopentano a -65 °C, y se recogieron cortes coronales de 30 µm en serie en flotación libre utilizando un micrótopo deslizante.

Para los estudios de seguridad, Los ratones tratados en P1, P21 y los de tipo natural de control fueron sacrificados a los 180 días de vida. Los animales se anestesiaron con un cóctel de xilaceno/ketamina y se perfundieron con solución salina al 0,9 %. Se extrajeron diferentes tejidos y se almacenaron en formalina tamponada al 10 %. Estos tejidos fueron procesados posteriormente, bloqueados y montados para tinción con hematoxilina y eosina por el Núcleo de Morfología del Hospital Infantil Nacional de EE. UU.

Los macacos cangrejeros a los que se inyectó el virus se sacrificaron 2 semanas después de la inyección. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico a una dosis de 80-100 mg/kg por vía intravenosa y perfundidos con solución salina. La disección del cerebro y la médula espinal se realizó de inmediato y los tejidos se procesaron para el aislamiento del ácido nucleico (congelación rápida) o se fijaron posteriormente en paraformaldehído al 4 % y, posteriormente, se crioprotegieron con sacarosa al 30 % y se congelaron en isopentano a -65 °C. Se recogieron cortes coronales de 12 µm de la médula lumbar utilizando un criostato para la inmunotinción de flotación libre.

Inmunohistoquímica. Las médulas espinales de los ratones se tiñeron como cortes flotantes. Los tejidos se lavaron tres veces durante 10 minutos cada vez en TBS, luego se bloquearon en una solución que contenía suero de burro al 10 %, Triton X-100 al 1 % y penicilina/estreptomina al 1 % durante dos horas a temperatura ambiente. Todos los anticuerpos se diluyeron con la solución de bloqueo. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anti-GFP de conejo (1:400, Invitrogen, Carlsbad, CA), anti-SOD1 de conejo (1:200, Cell signaling, Danvers, MA), anti-ChAT de cabra (1:50 Millipore, Billerica, MA), anti-GFAP de ratón (1:200, Millipore, Billerica, MA), anti-GFAP de pollo (1:400, Abcam, Cambridge, MA) y anti-Iba1 de conejo (1:400, Wako, Richmond VA). Los tejidos se incubaron en anticuerpo primario a 4 °C durante 48-72 horas y luego se lavaron tres veces con TBS. Después del lavado, los tejidos se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en los anticuerpos secundarios apropiados conjugados con FITC, Cy3 o Cy5 (1:200 Jackson Immunoresearch, Westgrove, Pensilvania y DAPI (1:1000, Invitrogen, Carlsbad, CA). A continuación, los tejidos se lavaron tres veces con TBS, se montaron en portaobjetos y luego se cubrieron con PVA-DABCO. Todas las imágenes fueron capturadas en un microscopio confocal de barrido láser Zeiss.

Para la tinción con DAB, se lavaron tres veces cortes de médula espinal de mono en TBS, se bloquearon durante 2 h a temperatura ambiente en suero de burro al 10 % y Triton X-100 al 1 %. A continuación, se incubaron los cortes durante la noche a 4 °C con anticuerpo primario anti-GFP de conejo (1:1000 Invitrogen, Carlsbad, CA) diluido en tampón de bloqueo. Al día siguiente, los tejidos se lavaron con TBS 3 veces, se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (1:200 Jackson Immunoresearch, Westgrove, PA) en tampón de bloqueo durante 30 min a TA, se lavaron 3 veces en TBS y se incubaron durante 30 min a TA con ABC (Vector, Burlingame, CA). A continuación, las cortes se lavaron 3 veces en TBS y se incubaron durante 2 min con solución DAB a temperatura ambiente y se lavaron con agua destilada. Después se montaron en portaobjetos y se cubrieron con cubreobjetos en medio de

montaje. Todas las imágenes fueron capturadas con el Axioscopio Zeiss.

Cuantificación de neuronas motoras y astrocitos. Para la cuantificación de las NM, se marcaron cortes en serie de médula espinal lumbar de 40 µm de espesor, cada uno separado por 480 µm, como se describe para la expresión de GFP y ChAT. Los cortes teñidos se montaron en serie en portaobjetos de rostral a caudal, y, a continuación, se cubrieron. Las cortes se evaluaron mediante microscopía confocal (Zeiss) con un objetivo de 40 aumentos y filtros FITC y Cy3 simultáneos. Se realizó el recuento del número total de células que expresaban ChAT encontradas en los cuernos ventrales con soma definido mediante un examen cuidadoso a través de toda la extensión z de la sección. Las células marcadas con GFP se cuantificaron de la misma manera, mientras se verificó la ubicación junto con ChAT. Para la cuantificación de los astrocitos, como con las NM, las cortes en serie se tiñeron para determinar la GFP, GFAP y después se montaron. Mediante microscopía confocal con un objetivo de 63 aumentos y filtros FITC y Cy5 simultáneos, se seleccionaron campos aleatorios en los cuernos ventrales de los cortes de la médula espinal lumbar de animales inyectados en la vena de la cola. Los números totales de células con expresión de GFP y GFAP se contaron a partir de un mínimo de al menos 24 campos por animal mientras se enfocaba a través de toda la extensión z de la sección. Se examinaron cortes de la médula espinal de 3 animales por grupo para la cuantificación de las NM y los astrocitos.

Análisis de inmunotransferencia. Se extrajeron las médulas espinales de ratones con SOD1^{G93A} inyectados en P1 y P21, y de control 21 días después de la inyección y de monos tratados y de monos de control 2 semanas después de la inyección de AAV9-ARNhc-SOD1. Las médulas espinales se homogeneizaron y los lisados proteicos se prepararon utilizando T-Per (Pierce) con un cóctel de inhibidores de proteasa. Las muestras se resolvieron en SDS-PAGE de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-SOD1 de conejo (1:750, Cell signaling, Danvers, MA), anti-SOD1 de ratón (1:750, Millipore, Billerica, MA), anti-SOD1 de conejo (1:1000, Abcam, Cambridge, MA), anti-actina de conejo (1:1000, Abcam, Cambridge, MA) y anti-GAPDH de ratón (1:1000, Millipore, Billerica, MA). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-HRP de conejo (1:10000-1:50000) y anti-HRP de ratón (1:10000). El análisis densitométrico se realizó utilizando el *software* Image J.

Microdissección por captura láser. Se recogieron cortes congelados de médula espinal lumbar de 12 µm en portaobjetos de membrana PEN (Zeiss, Munich, Alemania) y se tiñeron con violeta de cresilo al 1 % (Sigma, St. Louis, MO) en metanol. Los cortes se secaron al aire y se almacenaron a -80 °C. Después de descongelar, se extrajeron las neuronas motoras en los 30 minutos posteriores a la tinción usando el microdisector de captura láser PALM Robo3 Zeiss) con las siguientes configuraciones: Energía de corte: 48, Energía LPC: 20, Foco de corte: 80/81, Enfoque de LPC: 1, Velocidad de posición: 100, Velocidad de corte: 50. Se recogieron aproximadamente 500 NM por animal. Las células no neuronales del asta ventral se recogieron de los mismos cortes después de extraer las neuronas motoras.

qRT-PCR. Se aisló el ARN de las células capturadas con láser o de cortes enteros de médula espinal de los segmentos cervical, torácico y lumbar con el kit RNeasy Micro (Ambion, Grand Island, NY) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, el ARN se transcribió inversamente en ADNc mediante el Kit de primera hebra RT² HT (SABiosciences, Valencia, CA). Se utilizaron 12,5 ng de ARN en cada reacción de Q-PCR utilizando SyBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA) para establecer la cantidad relativa de transcripción endógena de SOD1 de mono en los animales que habían recibido AAV9-ARNhc-SOD1 en comparación con los animales que solo habían recibido AAV9-GFP. Cada muestra se analizó por triplicado y la concentración relativa se calculó usando los valores de ddCt normalizados con respecto a la transcripción de actina endógena.

Análisis de conducta y supervivencia. Los ratones con SOD1^{G93A} tratados y de control fueron sometidos a un seguimiento de los cambios en la masa corporal dos veces por semana. Los ratones con *loxSOD1*^{G37R} fueron pesados semanalmente. La coordinación motora se registró utilizando un cilindro giratorio (Columbus Instruments, Columbus, OH). Cada sesión semanal consistió en tres ensayos en el cilindro giratorio en aceleración comenzando a 5 rpm/min. Se registró el tiempo que cada ratón permaneció en la barra. Tanto los ratones con SOD1^{G93A} como con *loxSOD1*^{G37R} fueron sometidos a una evaluación semanal de la fuerza de agarre de las extremidades posteriores mediante un medidor de fuerza de agarre (Columbus Instruments, Columbus, OH). Cada sesión semanal consistió en 3 (ratones con SOD1^{G93A}) o 5 (ratones con *loxSOD1*^{G37R}) pruebas por animal. El análisis de supervivencia se realizó mediante el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. La fase terminal se definió como un punto de muerte artificial cuando los animales ya no podían "enderezarse" en los 30 segundos posteriores a su colocación boca arriba. El inicio y la progresión de la enfermedad se determinaron a partir del análisis retrospectivo de los datos. El inicio de la enfermedad se define como la edad en la que el animal alcanza su peso máximo. La duración de la enfermedad se define como el período de tiempo entre el inicio de la enfermedad y la fase terminal. La duración de la primera fase de la enfermedad es el período entre el peso máximo y la pérdida del 10 % del peso corporal, mientras que la duración de la segunda fase de la enfermedad se define como el período entre la pérdida del 10 % del peso corporal hasta la fase terminal de la enfermedad. Debido a la vida más corta de los animales con SOD1^{G93A}, no se evaluó la distinción entre la progresión en la primera y en la segunda fase.

Para el análisis de toxicidad después de la inyección en P1 o P21, los ratones TN de control y tratados se sometieron a análisis de conducta a partir de -30 días de vida y se controlaron hasta los 6 meses. La masa corporal se registró semanalmente, mientras que el rendimiento en la prueba del cilindro giratorio y la fuerza de agarre de las extremidades traseras se registraron quincenalmente.

Estudios de hematología y suero. Se extrajeron muestras de sangre en tubos microtainer (BD) con EDTA (K2) de ratones TN tratados y de control a los 150 días de vida mediante punción de la vena mandibular. Se extrajo sangre de los mismos animales a los 180 días de vida y se recogió la sangre en tubos microtainer con separador de suero. La sangre se dejó coagular durante una hora y luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos. La fase superior transparente (suero) se recogió y se congeló a -80 °C. Los análisis hematológicos y séricos fueron realizados por Ani Lytics Inc, Gaithersburg, MD.

Análisis estadístico. Todas las pruebas estadísticas se realizaron mediante el paquete de *software* GraphPad Prism (San Diego, CA). Los análisis de supervivencia de Kaplan Meier se analizaron mediante la prueba del orden logarítmico. Las comparaciones de la mediana de la duración de la enfermedad y los tiempos de supervivencia se analizaron mediante la prueba del orden con signo de Wilcoxon.

Ejemplo 8

Desarrollo de una construcción clínica de ARNhc dirigido a SOD1

El vector AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 descrito en el Ejemplo 2 transporta ARNhc contra la secuencia de SOD1 humana bajo el promotor de H1 (Figura 9a). El mismo vector también contiene un casete de expresión de GFP que expresa GFP bajo un promotor de CBA. Los otros elementos reguladores presentes en este casete incluyen el potenciador de CMV, Intrón SV40 y secuencia del terminador PolyA de bGH. En el presente documento, se muestra que la administración de AAV9 que codifica ARNhc dirigido a SOD1 produce una regulación a la baja de SOD1 eficaz junto con una expresión potente de GFP tanto *in vitro* como *in vivo*. No se observaron alteraciones significativas después de la evaluación a largo plazo de ratones de tipo natural a los que se administró el AAV9 que codifica ARNhc dirigido a SOD1. Estos resultados sugirieron que no hay efectos colaterales evidentes debido a la expresión a largo plazo del ARNhc dirigido a SOD1, ni a la sobreexpresión de GFP. Aunque no se encontró toxicidad de GFP en los ratones del presente estudio, varios informes han demostrado la reacción adversa de la sobreexpresión de GFP *in vitro* e *in vivo*. Por lo tanto, para eliminar por completo la posibilidad de toxicidad de GFP, se modificó la construcción de ARNhc dirigido a SOD1 del Ejemplo 2 reemplazando el casete de expresión de GFP por una secuencia de relleno no codificante mientras se mantenía el tamaño de la construcción de ADN total flanqueada por las ITR (Figura 9b). Esto es importante ya que la distancia entre las dos secuencias ITR afecta en gran medida a la capacidad de empaquetamiento de la construcción flanqueada en cápsides de AAV9 [321-324].

Hasta la fecha, ninguna de las secuencias de relleno aprobadas por la FDA se puede obtener fácilmente. Hay, sin embargo, varias estructuras principales plasmídicas que están aprobadas por la FDA para la administración humana. Se recogieron pequeños fragmentos de ADN de estos plásmidos que no corresponden a ninguna secuencia esencial de ADN necesaria para la selección y replicación del plásmido o los elementos de las unidades de transcripción. Las estructuras principales plasmídicas se enumeran en la Tabla 1. Los elementos de ADN de diferentes plásmidos se organizaron en tándem para generar una secuencia de relleno de 1607 pb completa (SEQ ID NO: 22). Por último, se sintetizó una construcción de ADN que contiene el casete de expresión de ARNhc dirigido a SOD1, seguida de la secuencia de relleno a partir de Genscript.

Tabla 1

Estructura principal plasmídica	Afección	Intervención	Fase	Identificador de ClinicalTrials.gov
pVax1	Cáncer de pulmón no microcítico en la primera fase	ADN recombinante-pVAX/L523S	1	NCT00062907
pCDNA3	Hepatitis B crónica	Vacuna de ADN pCMVS2.S	1,2	NCT00536627
pUCMV3	Cáncer epitelial de ovario en fase III Tumor de células germinativas de ovario en fase III Cáncer epitelial de ovario en fase IV Tumor de células germinativas de ovario en fase IV	Vacuna de ADN de plásmido multiepitopo pUMVC3-hiGFBP-2	1	NCT01322802

(continuación)

Estructura principal plasmídica	Afección	Intervención	Fase	Identificador de ClinicalTrials.gov
pBK-CMV	Cáncer de próstata Cáncer de vejiga Cáncer de pulmón no microcítico Cáncer de esófago Sarcoma	Vacuna contra el cáncer de ADN plásmido NY-ESO-1	1	NCT00199849
pGA2	Infecciones por VIH	Vacuna de ADN de plásmido pGA2/JS2	1	NCT00043511

La construcción clínica de ARNhc dirigido a SOD1 tiene ARNhc contra SOD1 humana bajo el promotor de H1, seguido de la secuencia de relleno no codificante. Esta construcción está diseñada de manera que se pueden agregar múltiples casetes de expresión de ARNhc al vector final mediante la eliminación simultánea de la secuencia de relleno. Se agregaron sitios de endonucleasas de restricción a la secuencia de relleno para que se pudiera eliminar una parte del relleno al agregarse otro casete de expresión de ARNhc (Figura 10). Esta eliminación y adición simultáneas de secuencias de ADN ayudaría a mantener el tamaño óptimo de la construcción completa entre las ITR (~2,0 kb) para lograr un empaquetamiento eficaz.

La construcción clínica de ARNhc dirigido a SOD1 de Genscript se clonó en el vector lanzadera pJet1.2 a través de EcoRV. Este clon original se seleccionó mediante diferentes endonucleasas de restricción diseñadas dentro de la construcción para confirmar el clon correcto. La digestión doble con Kpn1/Sph1 de pJet de ARNhc dirigido a SOD1 confirmó la presencia de la construcción completa (2023 pb), mientras que la digestión con XbaI confirmó la presencia del casete de expresión de ARNhc dirigido a SOD1 (414 pb) y el elemento de relleno, junto con la estructura principal de pJet (~3000 pb). La digestión doble con EcoRV/Pme1 también reveló la presencia del elemento de relleno.

Ejemplo 9

La construcción clínica de ARNhc dirigido a SOD1 reduce de manera eficaz los niveles de proteína SOD1 humana *in vitro*

Para determinar la eficacia de la construcción de ARNhc dirigido a SOD1 sintetizada *de novo* para regular a la baja los niveles de SOD1, se transfectaron células HEK293 con el plásmido pJet de ARNhc dirigido a SOD1 mediante el método de fosfato de calcio. Se utilizó el plásmido AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 como control positivo. El análisis de inmunofluorescencia de las células HEK293, 72 h después de la transfección, reveló la falta de fluorescencia de GFP natural de las células transfectadas con pJet de ARNhc dirigido a SOD1 en comparación con las células transfectadas con AAV9 que codifica ARNhc dirigido a SOD1. El análisis de inmunotransferencia de los lisados celulares de estas células reforzó la confirmación del reemplazo satisfactorio de GFP del plásmido pJet de ARNhc dirigido a SOD1. Es importante destacar que pJet de ARNhc dirigido a SOD1 dio como resultado una regulación a la baja eficaz de los niveles de proteína SOD1 (> 50 %), similar al plásmido AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1. Véase la Figura 11.

Ejemplo 10

Generación de la construcción clínica de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1

La construcción clínica de ARNhc dirigido a SOD1 se clonó adicionalmente en un vector AAV.CB.MCS mediante los sitios Kpn1/Sph1 para generar plásmido clínico de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 (Figura 12). AAV.CB.MCS se generó a partir del plásmido AAV.CB.GFP obtenido de Merion Scientific reemplazando la GFP por un sitio de clonación múltiple (MCS, *Multiple Cloning Site*). La clonación de la construcción clínica de ARNhc dirigido a SOD1 en los sitios Kpn1/Sph1 la ubica entre las dos ITR de AAV2, lo que facilita el empaquetamiento de la construcción en las cápsides víricas de AAV9. Véase la Figura 12.

El plásmido clínico de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 se examinó con endonucleasas de restricción para confirmar la presencia del casete de expresión de ARNhc dirigido a SOD1 (digestión de XbaI), secuencia de relleno (digestión doble de EcoRV/PmeI) y también secuencias ITR intactas (digestión de SmaI).

Ejemplo 11

La construcción clínica de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 reduce de manera eficaz los niveles de proteína SOD1 humana *in vitro*

El plásmido clínico de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 se transfectó en células HEK293 para determinar su eficiencia de atenuación. Al igual que el plásmido pJet de ARNhc dirigido a SOD1, las células transfectadas con la construcción clínica de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 carecían de cualquier expresión de GFP como fue evidente por la inmunofluorescencia (Figura 13a-f) y el ensayo de inmunotransferencia (Figura 13g). Más importante aún, la construcción clínica de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 redujo eficazmente los niveles de proteína SOD1 humana en las células HEK293 en más del 50 % (Figura 13g,h). En conjunto, estos resultados confirmaron la generación satisfactoria del vector clínico de AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1 con casete de expresión de ARNhc dirigido a SOD1 funcional y la eliminación completa del casete de expresión del transgén.

Referencias bibliográficas

1. Da Cruz, S. y Cleveland, D. W. "Understanding the role of TDP-43 and FUS/TLS in ALS and beyond". *Curr Opin Neurobiol* 21, 904-919 (2011).
2. Rosen, D. R. *et al.* "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis". *Nature* 362, 59-62 (1993).
3. Ilieva, H., Polymenidou, M. y Cleveland, D. W. "Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond". *The Journal of cell biology* 187, 761-772 (2009).
4. Chattopadhyay, M. y Valentine, J. S. "Aggregation of copper-zinc superoxide dismutase in familial and sporadic ALS". *Antioxidants & redox signaling* 11, 1603-1614 (2009).
5. Prudencio, M., Hart, P. J., Borchelt, D. R. y Andersen, P. M. "Variation in aggregation propensities among ALS-associated variants of SOD1: correlation to human disease". *Human molecular genetics* 18, 3217-3226 (2009).
6. Boillee, S. *et al.* "Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia". *Science* 312, 1389-1392 (2006).
7. Kang, S. H. *et al.* "Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis". *Nature neuroscience* 16, 571-579 (2013).
8. Yamanaka, K. *et al.* "Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis". *Nature neuroscience* 11, 251-253 (2008).
9. Di Giorgio, F. P., Boulting, G. L., Bobrowicz, S. y Eggan, K. C. "Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation". *Cell Stem Cell* 3, 637-648 (2008).
10. Di Giorgio, F. P., Carrasco, M. A., Siao, M. C., Maniatis, T. y Eggan, K. "Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model". *Nature neuroscience* 10, 608-614 (2007).
11. Marchetto, M. C. *et al.* "Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells". *Cell Stem Cell* 3, 649-657 (2008).
12. Haidet-Phillips, A. M. *et al.* "Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons". *Nat Biotechnol* 29, 824-828 (2011).
13. Bosco, D. A. *et al.* "Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS". *Nature neuroscience* 13, 1396-1403 (2010).
14. Pokrishevsky, E. *et al.* "Aberrant localization of FUS and TDP43 is associated with misfolding of SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis". *PLoS one* 7, e35050 (2012).
15. Forsberg, K. *et al.* "Novel antibodies reveal inclusions containing non-native SOD1 in sporadic ALS patients". *PLoS One* 5, e11552 (2010).
16. Aggarwal, S. y Cudkowicz, M. "ALS drug development: reflections from the past and a way forward". *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 5, 516-527 (2008).
17. Gurney, M. E. *et al.* "Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis". *Ann Neurol* 39, 147-157 (1996).
18. Foust, K. D. *et al.* "Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes". *Nature biotechnology* 27, 59-65 (2009).

19. Duque, S. *et al.* "Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons". *Mol Ther* 17, 1187-1196 (2009).

20. Zhong, Z. *et al.* "ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration". *Nature neuroscience* 11, 420-422 (2008).

21. Miller, R. G., Mitchell, J. D. y Moore, D. H. "Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND)". *Cochrane Database Syst Rev* 3, CD001447 (2012).

22. Smith, R. A. *et al.* "Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease". *The Journal of clinical investigation* 116, 2290-2296 (2006).

23. Raoul, C. *et al.* "Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS". *Nat Med* 11, 423-428 (2005).

24. Ralph, G. S. *et al.* "Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model". *Nat Med* 11, 429-433 (2005).

25. Miller, T. M. *et al.* "Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis". *Annals of neurology* 57, 773-776 (2005).

26. Miller, T. M. *et al.* "An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study". *Lancet neurology* 12, 435-442 (2013).

27. Towne, C., Raoul, C., Schneider, B. L. y Aebischer, P. "Systemic AAV6 delivery mediating RNA interference against SOD1: neuromuscular transduction does not alter disease progression in fALS mice". *Mol Ther* 16, 1018-1025 (2008).

28. Towne, C., Setola, V., Schneider, B. L. y Aebischer, P. "Neuroprotection by gene therapy targeting mutant SOD1 in individual pools of motor neurons does not translate into therapeutic benefit in fALS mice". *Mol Ther* 19, 274-283 (2011).

29. Mandel, R. J., Lowenstein, P. R. y Byrne, B. J. "AAV6-mediated gene silencing fALS short". *Mol Ther* 19, 231-233 (2011).

30. Synofzik, M. *et al.* "Mutant superoxide dismutase-1 indistinguishable from wild-type causes ALS". *Human molecular genetics* 21, 3568-3574 (2012).

31. Guareschi, S. *et al.* "An over-oxidized form of superoxide dismutase found in sporadic amyotrophic lateral sclerosis with bulbar onset shares a toxic mechanism with mutant SOD1". *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 109, 5074-5079 (2012).

32. Haidet-Phillips, A. M. *et al.* "Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons". *Nat Biotechnol* 29, 824-828 (2011).

33. Bevan, A. K. *et al.* "Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders". *Mol Ther* 19, 1971-1980 (2011).

34. Gray, S. J. *et al.* "Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and nonhuman primates". *Mol Ther* 19, 1058-1069 (2011).

35. Lioy, D. T. *et al.* "A role for glia in the progression of Rett's syndrome". *Nature* 475, 497-500 (2011).

36. Miranda, C. J. *et al.* "Aging brain microenvironment decreases hippocampal neurogenesis through Wnt-mediated survivin signaling". *Aging Cell* 11, 542-552 (2012).

37. Yamanaka, K. *et al.* "Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice". *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 105, 7594-7599 (2008).

REIVINDICACIONES

1. Un dependoparvovirus recombinante que comprende el ADN que codifica el ARNhc dirigido a la superóxido dismutasa 1 (SOD1) que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4, una secuencia horquillada y una secuencia complementaria a SEQ ID NO: 4, en donde el genoma del virus carece de un gen rep y carece de un gen cap.
2. El dependoparvovirus recombinante de la reivindicación 1, que comprende además un promotor unido operativamente al ADN que codifica el ARNhc dirigido a la superóxido dismutasa 1 (SOD1).
3. El dependoparvovirus recombinante de la reivindicación 2, en donde el promotor es un promotor de H1.
4. El dependoparvovirus recombinante de la reivindicación 3, en donde el promotor de H1 comprende los nucleótidos 966 a 1064 de SEQ ID NO: 20.
5. El dependoparvovirus recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además una secuencia de relleno.
6. El dependoparvovirus recombinante de la reivindicación 5, en donde la secuencia de relleno comprende la SEQ ID NO: 22.
7. El dependoparvovirus recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el genoma del virus es un genoma autocomplementario.
8. El dependoparvovirus recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende una cápside derivada de AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-rh74.
9. El dependoparvovirus recombinante de la reivindicación 8, en donde la cápside es una cápside de AAV9.
10. Una composición que comprende el dependoparvovirus recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. La composición de la reivindicación 10, para usar junto con un agente de contraste.
12. La composición de la reivindicación 11, en donde el agente de contraste es iobitridol, iohexol, iomeprol, iopamidol, iopentol, iopromida, ioversol o ioxilano.
13. Un dependoparvovirus recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12 para usar en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
14. El dependoparvovirus recombinante o la composición para el uso de la reivindicación 13, en donde la ELA es familiar.
15. El dependoparvovirus recombinante o la composición para el uso de la reivindicación 14, en donde la ELA está provocada por una o más mutaciones en la superóxido dismutasa 1 (SOD1).
16. El dependoparvovirus recombinante o la composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde el dependoparvovirus recombinante o la composición es para la administración sistémica.
17. El dependoparvovirus recombinante o la composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde el dependoparvovirus recombinante o la composición es para la administración intratecal.
18. El dependoparvovirus recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para usar en terapia.

Figura 1

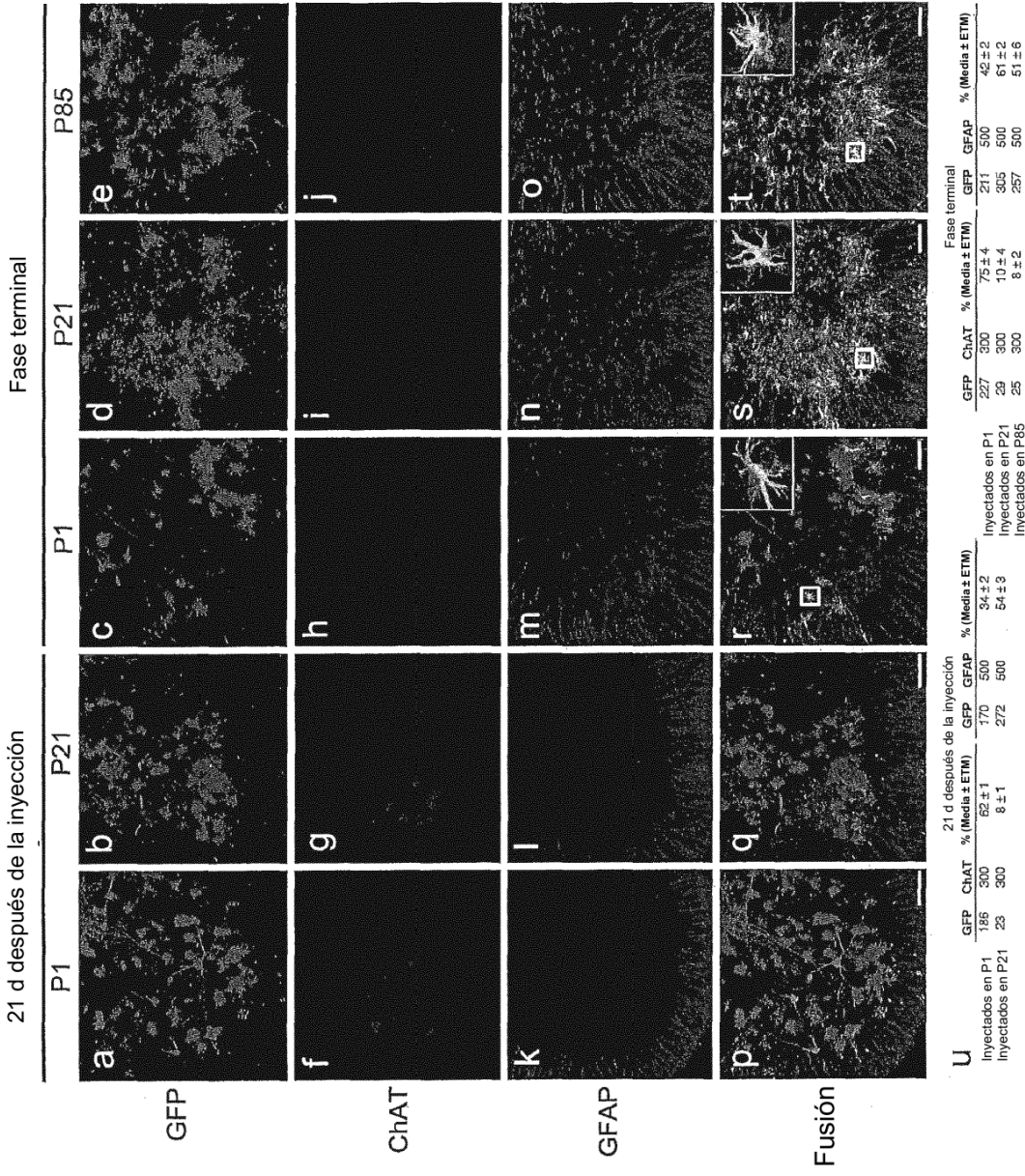


Figura 2

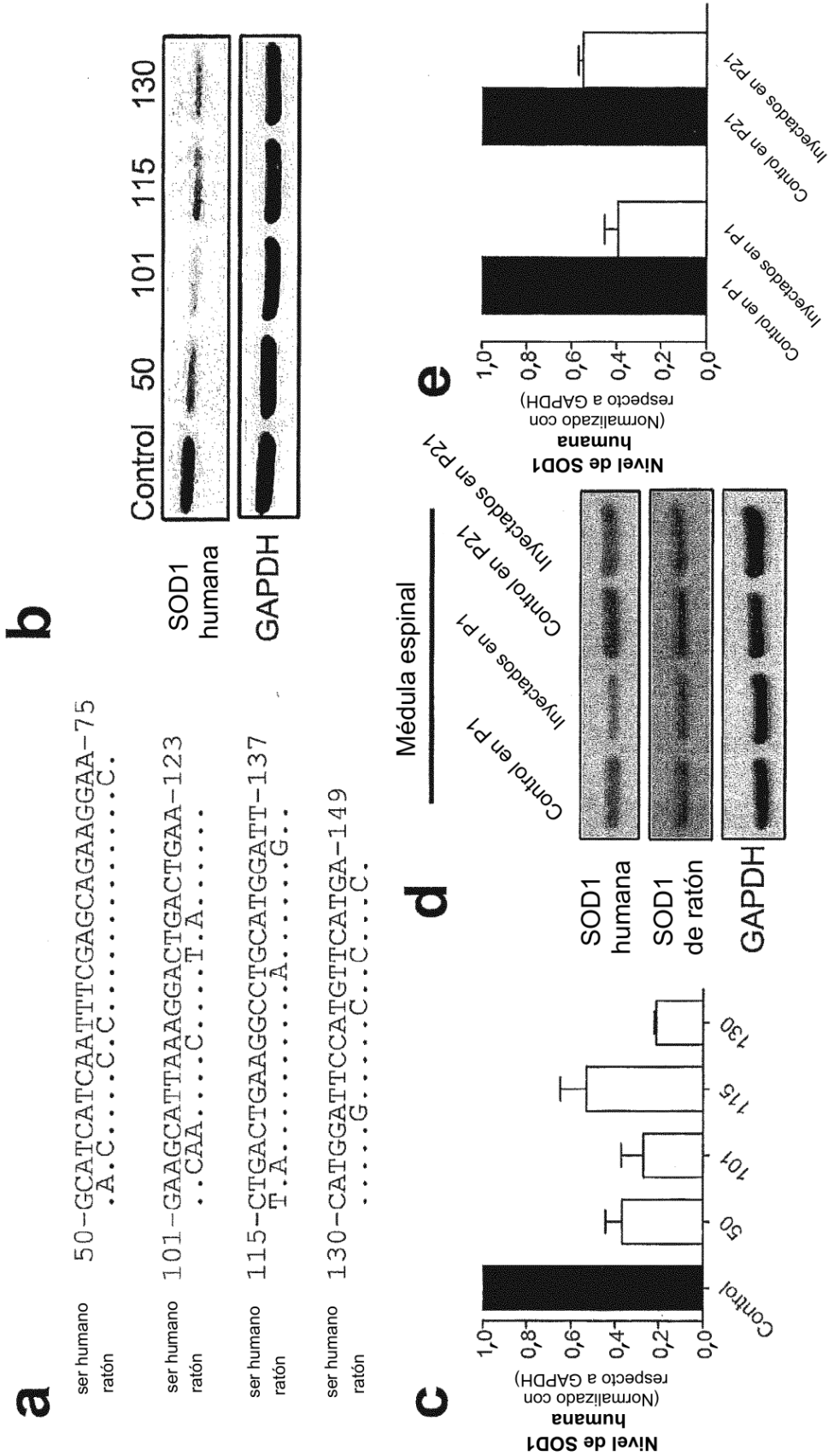


Figura 3

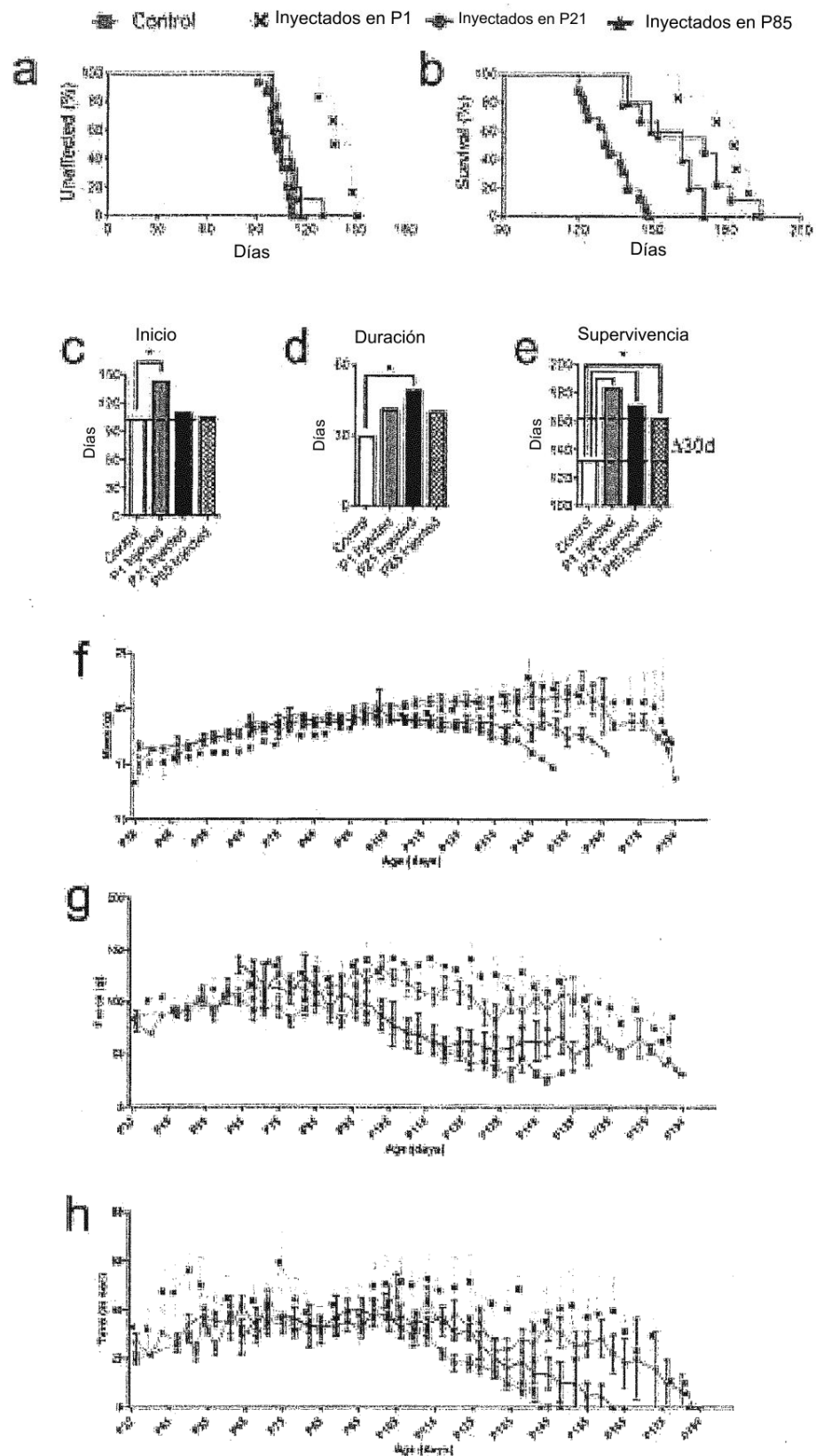


Figura 4

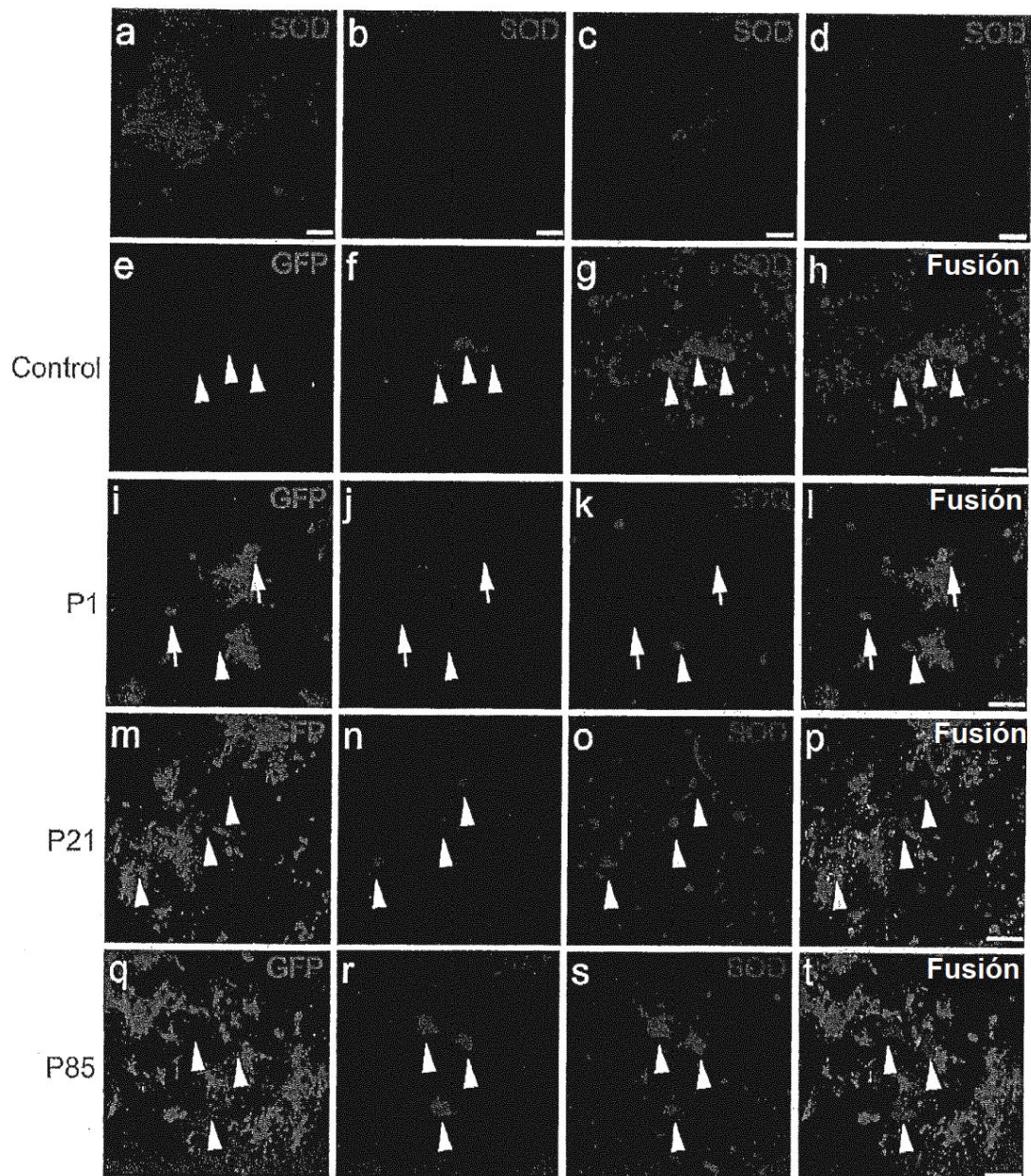


Figura 5

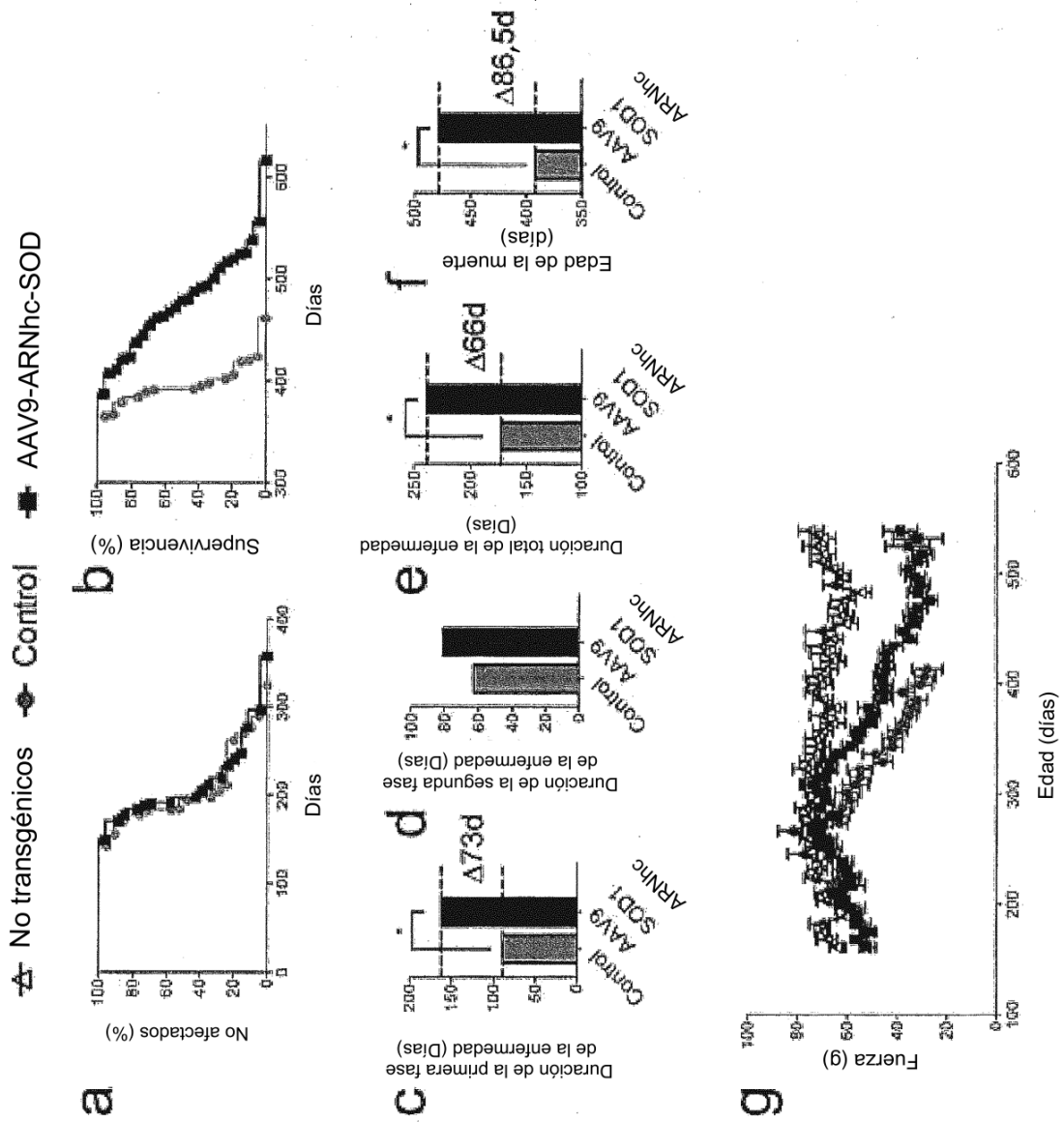


Figura 6

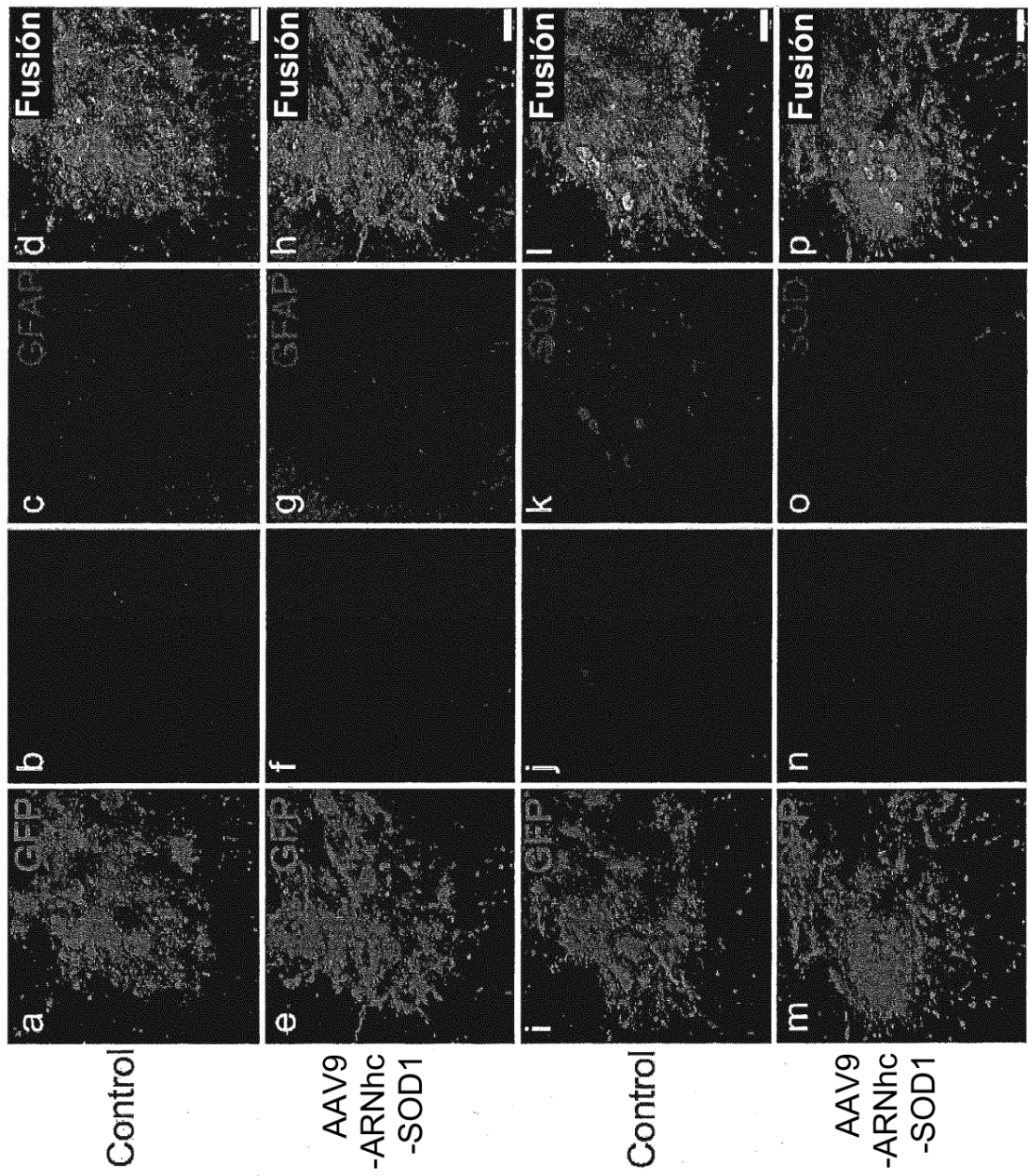


Figura 7

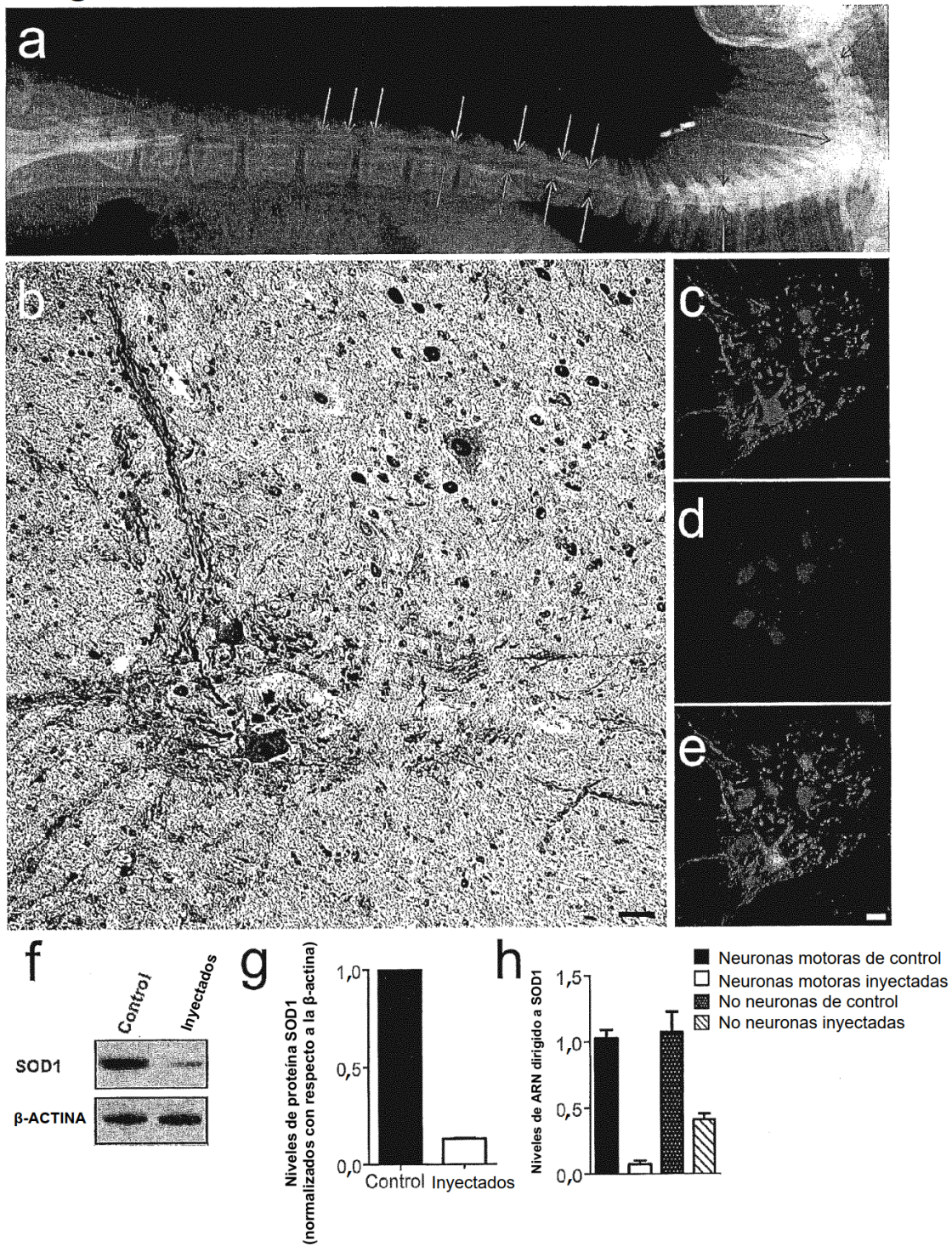


Figura 8

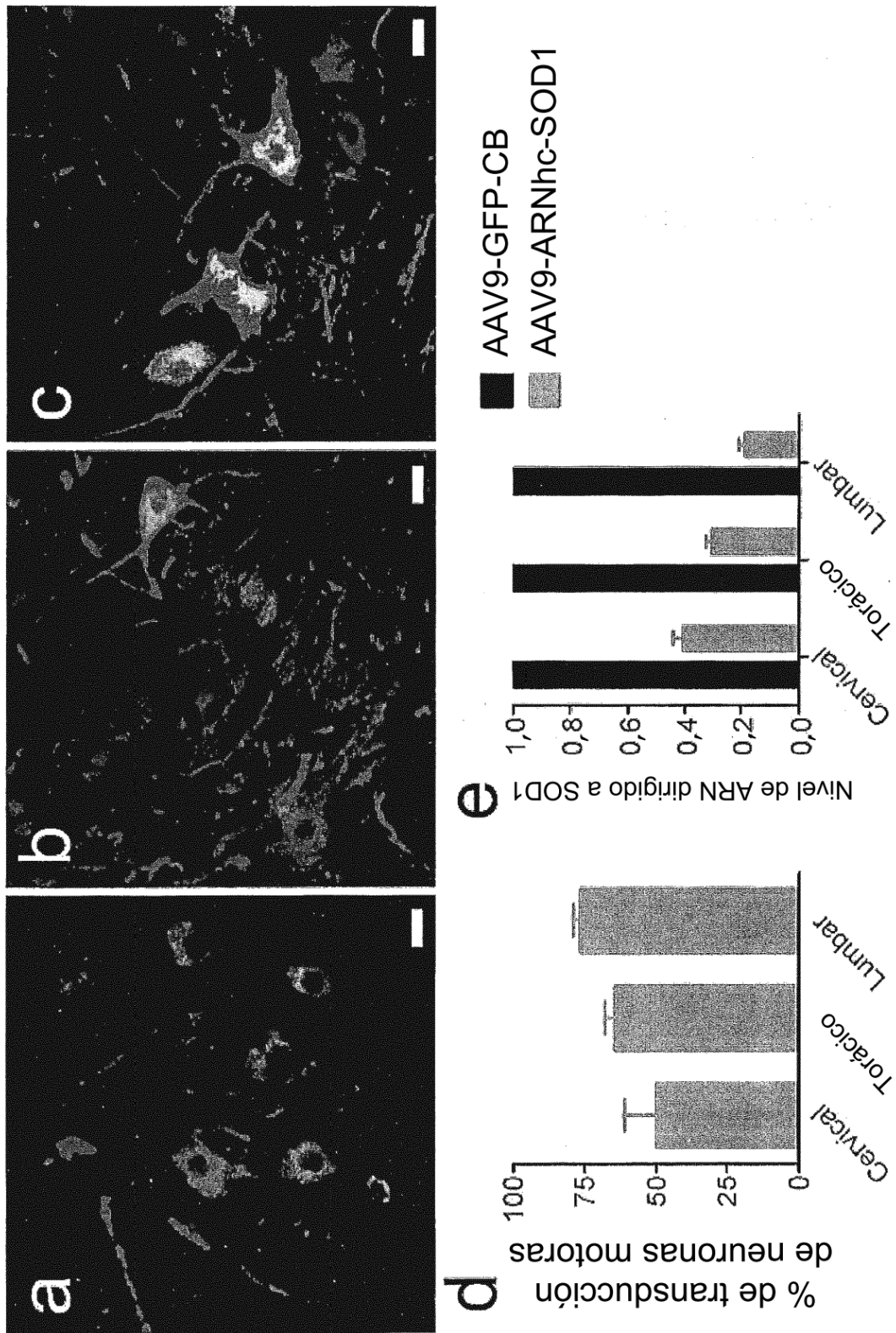
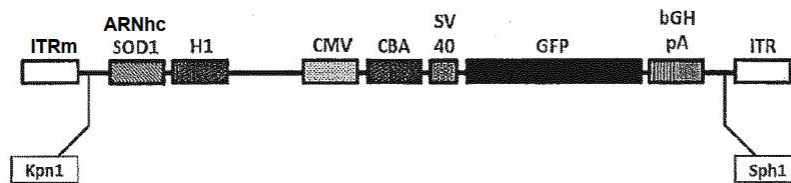


Figura 9

a AAV que codifica ARNhc dirigido a SOD1



b Construcción clínica de ARNhc dirigido a SOD1

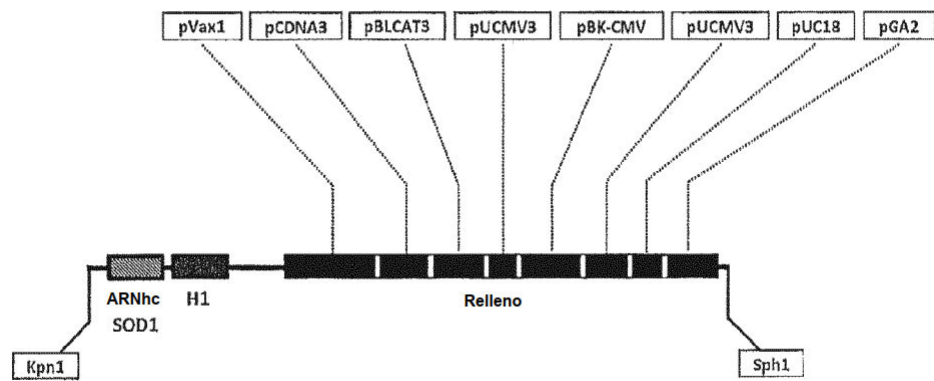


Figura 10

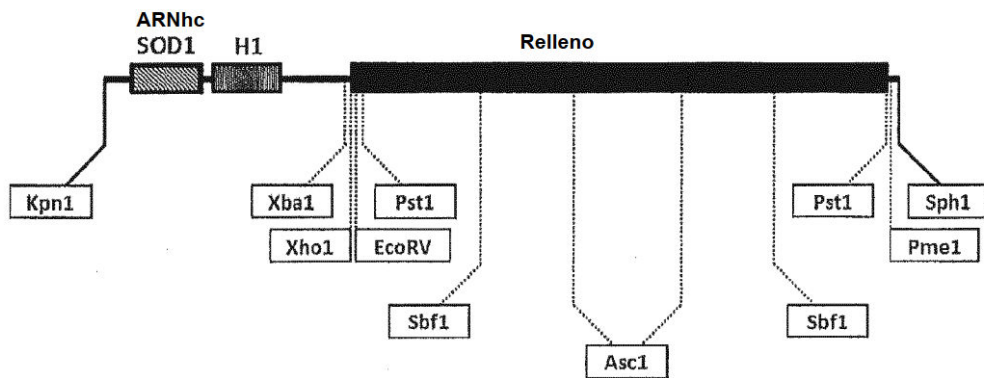


Figura 11

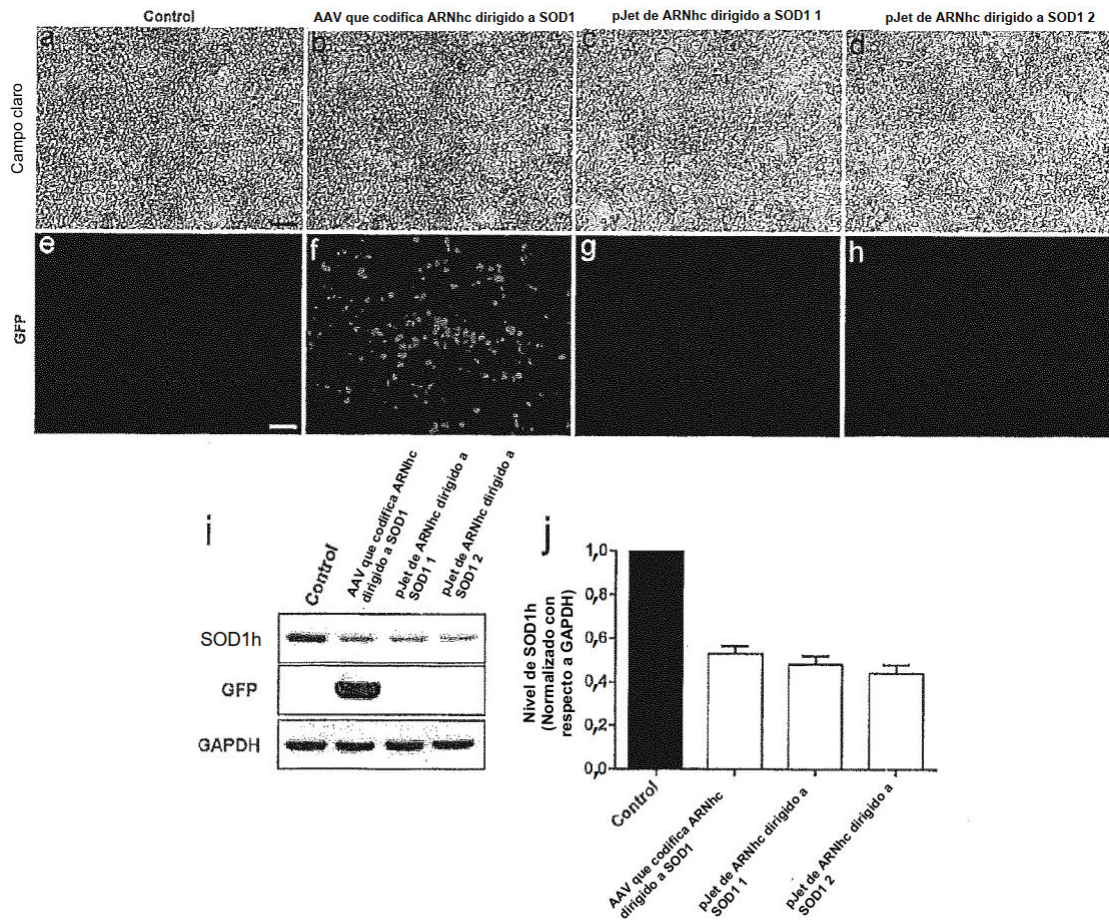


Figura 12

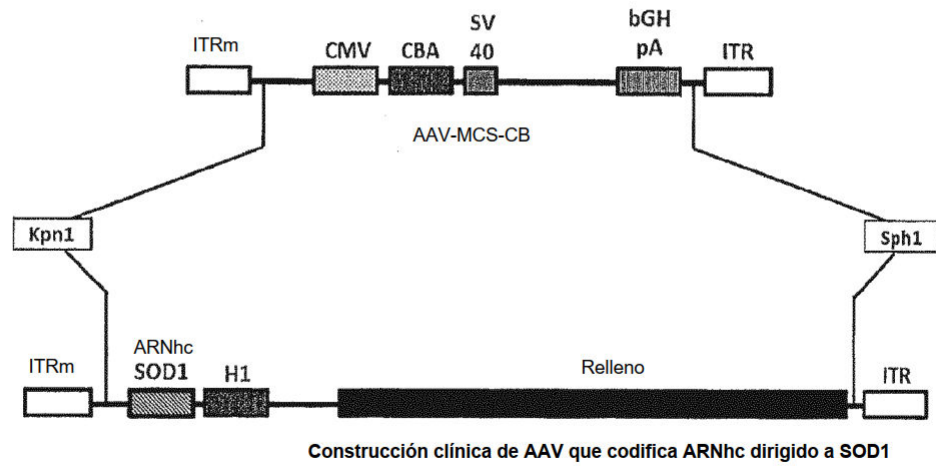


Figura 13

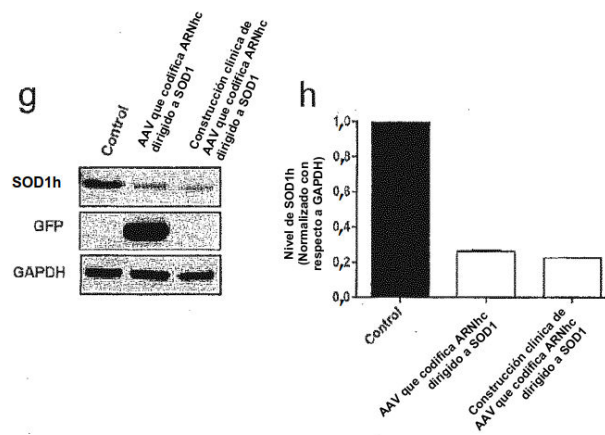
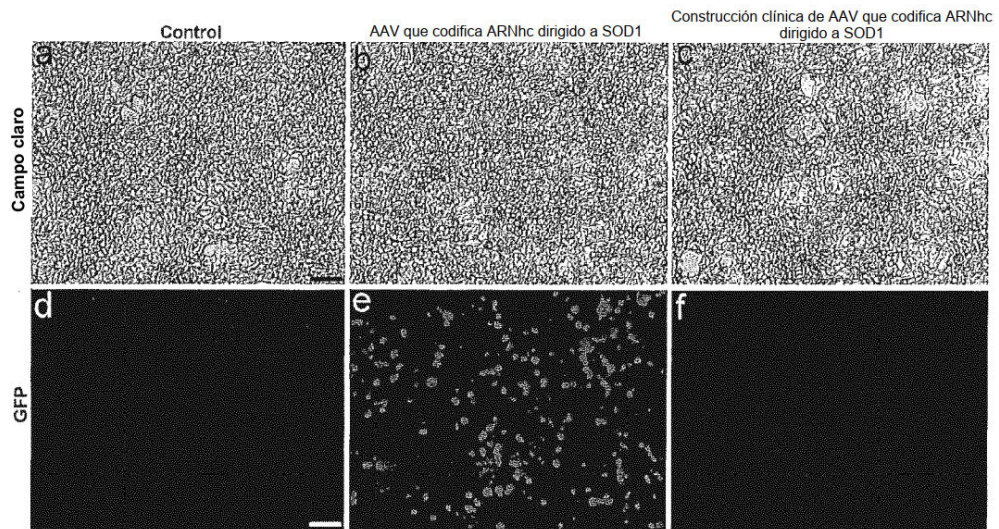


Figura complementaria 1

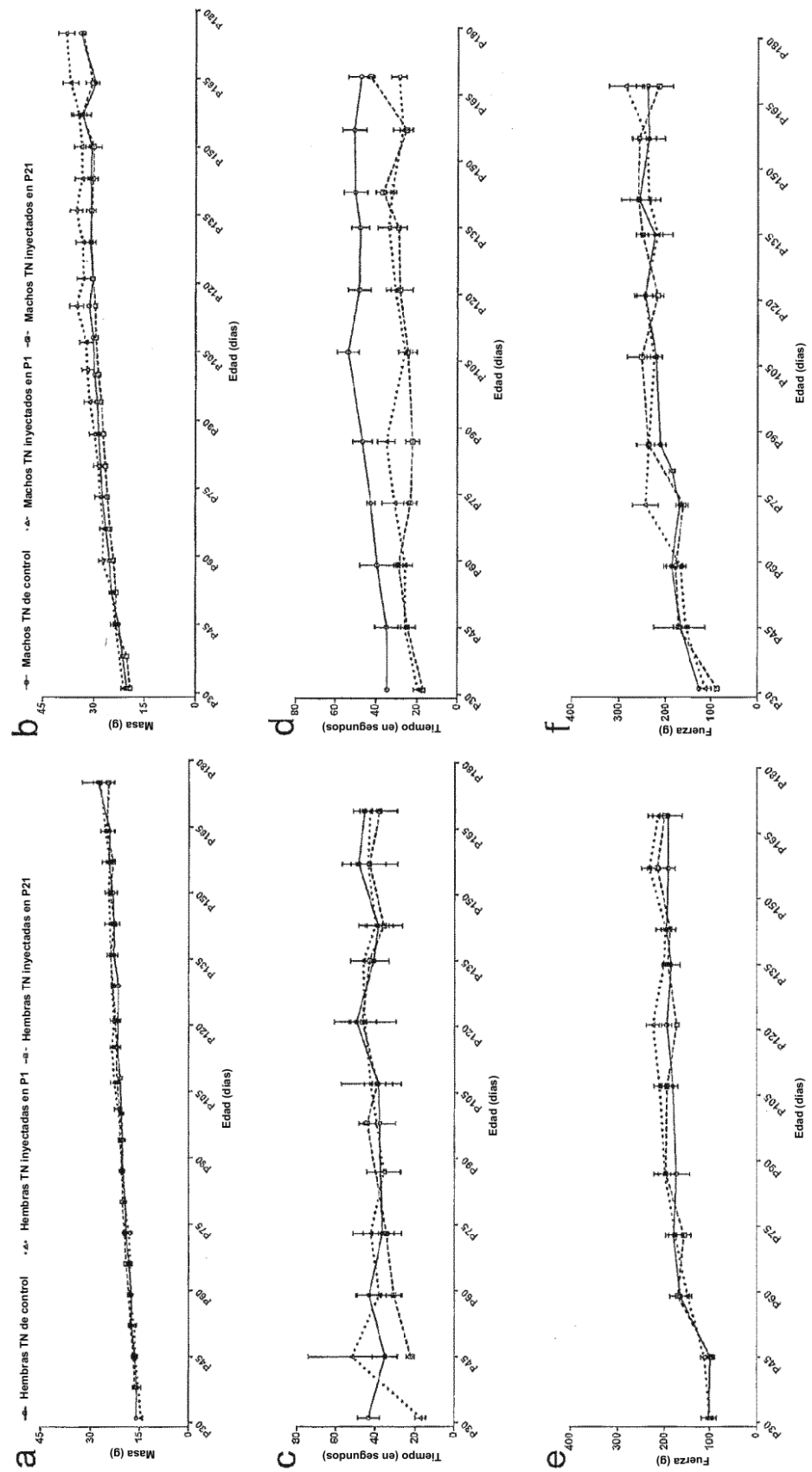


Figura complementaria 2

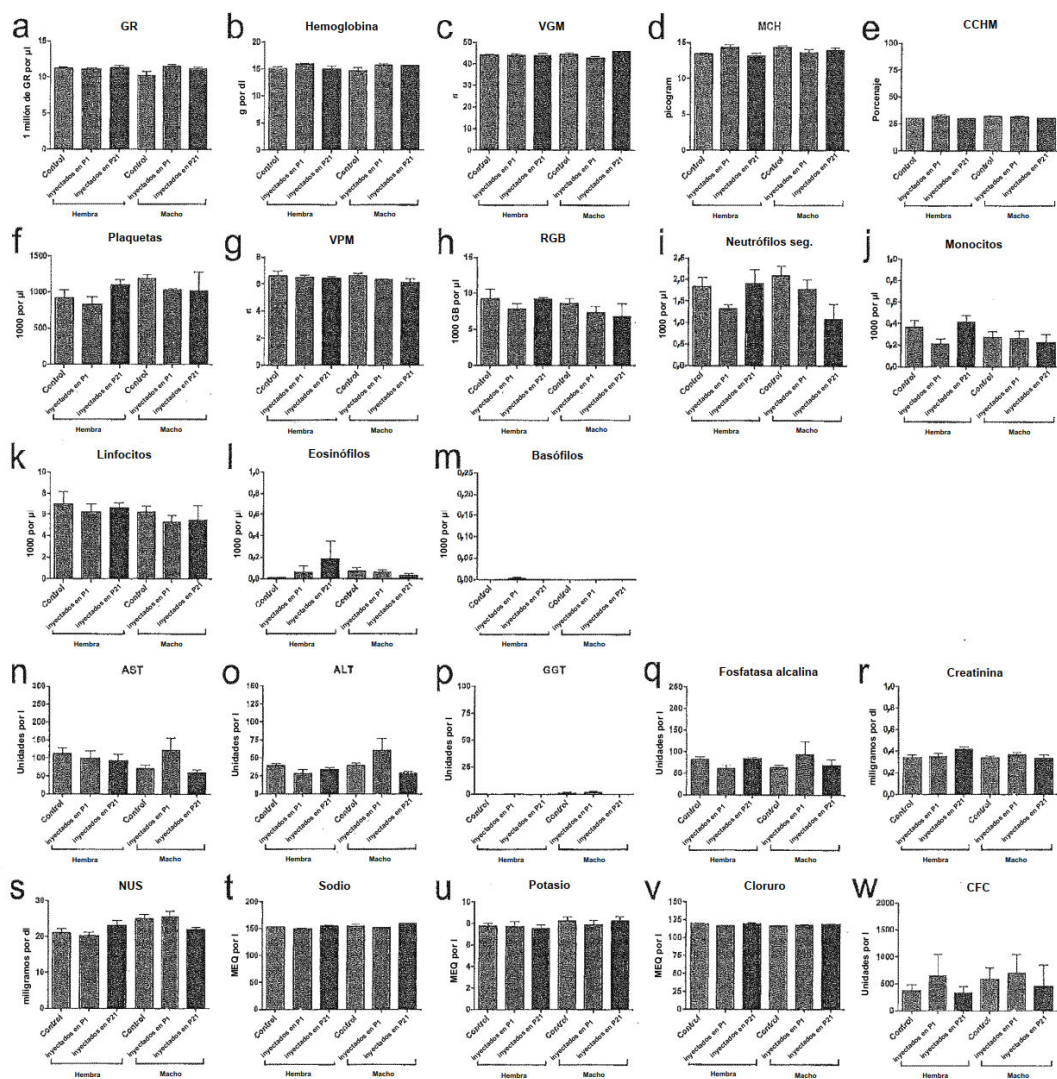


Figura complementaria 3

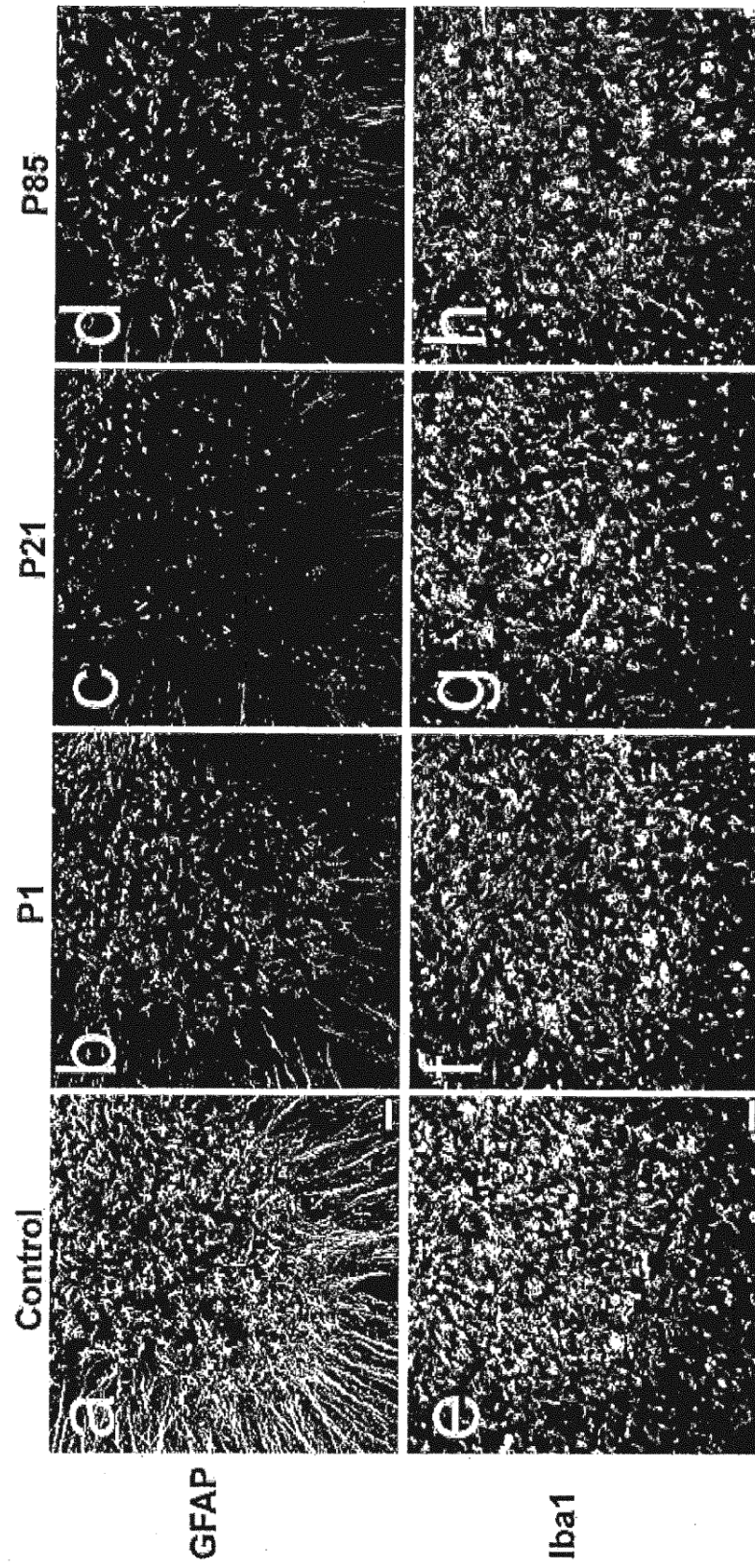


Figura complementaria 4

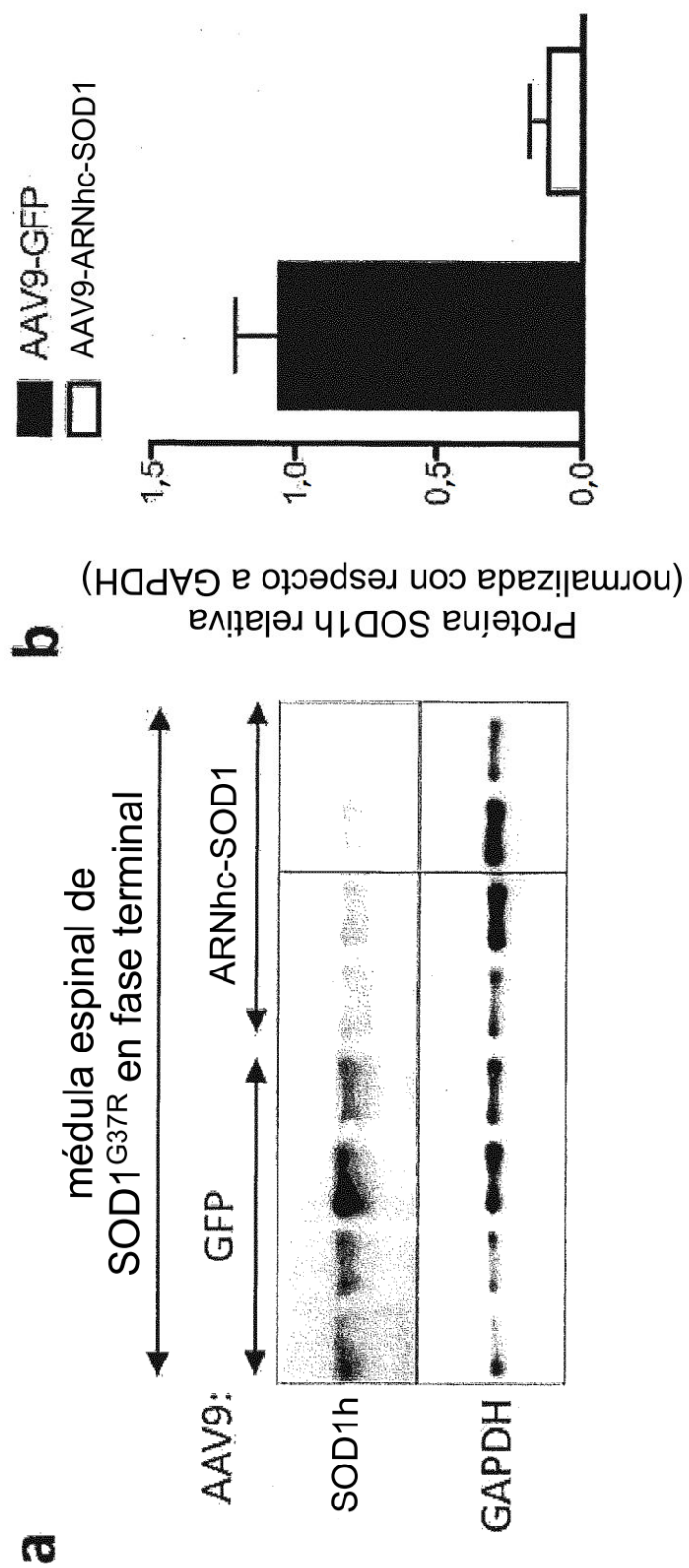


Figura complementaria 5

