

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 437**

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

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2014 PCT/US2014/052753**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15031392**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2014 E 14761771 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3039146**

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:
17.12.2020

73 Titular/es:

**THE 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

ES 2 799 437 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 del Estado

Esta invención se realizó con la subvención del Estado según los documentos del U.S. National Institutes of Health R21-NS067238, NS027036, ROI NS064492 y RC2 NS69476-01. El Estado tiene ciertos derechos en esta invención.

10 Material remitido por vía electrónica

Junto con el presente documento se remite una lista de secuencias de nucleótidos/aminoácidos, y se identifica como sigue: 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 basados en ARN para inhibir la expresión del gen de la dismutasa de superóxido 1 (SOD-1). Los virus adenoasociados recombinantes de la invención suministran ADN que codifican ARN que inactivan la expresión de la SOD-1. Los métodos tienen aplicación en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

20

Antecedentes

25

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa de inicio en adultos, con una progresión rápida y mortal, caracterizada por la degeneración selectiva de las motoneuronas tanto superiores como inferiores. Caracterizada por primera vez por Charcot en 1869, la ELA es responsable de una de cada 2.000 muertes, afectando a casi 5 de cada 100.000 individuos. La ELA aparece cuando degeneran las células nerviosas específicas del cerebro y de la médula espinal que controlan el movimiento voluntario. Entre dos y cinco años después de su inicio clínico, la pérdida de estas motoneuronas da lugar a una atrofia progresiva de los músculos esqueléticos, lo que da como resultado una pérdida de la función muscular que conduce a parálisis, deficiencias en el habla y la muerte debida a una insuficiencia respiratoria.

30

35

La mayoría de los casos de ELA no tienen una relación genética evidente, y se denominan esporádicos, pero en el 10 % de los casos, la enfermedad es familiar con una herencia dominante. El veinte por ciento de los casos familiares están causados por mutaciones en la enzima dismutasa de superóxido 1 (SOD1), con más de 140 mutaciones distintas identificadas hasta la fecha^{1,2}. Muchos esfuerzos para identificar cómo las mutaciones alteran la función de la SOD1 han producido una visión consensuada de que los mutantes de la SOD1 adquieren una o más toxicidades, cuya naturaleza sigue siendo aún controvertida³, pero existen evidencias contundentes de que una proporción de la SOD1 mutante está mal plegada, y posteriormente se agrega^{4,5}. Los agregados de la SOD1 son, de hecho, uno de los rasgos histológicos característicos de los casos de ELA relacionados con la SOD1⁴.

40

45

En los últimos 20 años se han generado múltiples modelos de animales que expresan formas mutantes de la SOD1 humana. Estos modelos recapitulan los rasgos característicos de la ELA, desarrollando una degeneración del axón motor dependiente de la edad y una desnervación muscular concomitante, inflamación glial y la posterior pérdida de la motoneurona. Los experimentos de escisión génica selectiva han determinado que la expresión de la SOD1 mutante en las propias motoneuronas contribuye al inicio de la enfermedad y a la progresión temprana de la enfermedad⁶, al igual que la síntesis mutante en células NG2⁷ que son precursoras de los oligodendrocitos. Sin embargo, la expresión de la proteína SOD1 mutante en la microglía y los astrocitos dirige significativamente una rápida progresión de la enfermedad^{6,8}, hallazgos que han dado lugar a la conclusión de que la fisiopatología de la ELA no es autónoma celular³.

50

55

Además, se ha averiguado que los astrocitos son tóxicos para las motoneuronas en múltiples modelos *in vitro* donde las formas mutantes de la SOD1 humana estaban sobreexpresadas⁹⁻¹¹. Un estudio reciente extrajo astrocitos de médulas espinales cadavéricas de pacientes de ELA con o sin mutaciones de la SOD1. En todos los casos, los astrocitos de pacientes con ELA esporádica eran tan tóxicos para las motoneuronas como los astrocitos portadores de mutaciones genéticas en la SOD1¹². Incluso más sorprendentemente, la reducción de la SOD1 en los astrocitos extraídos de pacientes con ELA tanto esporádica como familiar disminuyó la toxicidad debida al astrocito que es selectiva para las motoneuronas, pero no para las gabérgicas. Este notable hallazgo, junto con informes de hallazgos de inclusiones de SOD1 mal plegada en las médulas espinales de pacientes con ELA familiar, así como en algunos con ELA esporádica^{13,14,15}, ha proporcionado pruebas contundentes del papel patógeno de la SOD1 natural en la ELA esporádica.

60

65

A pesar de las percepciones que han proporcionado los modelos de animal que expresa la SOD1 mutante para comprender los mecanismos implicados en la degeneración de la motoneurona, se ha cuestionado su utilidad para el desarrollo de enfoques terapéuticos¹⁶, ya que ningún fármaco con un beneficio de supervivencia notificado en ratones mutantes para la SOD1^{G93A} ha sido eficaz en ensayos clínicos con pacientes con ELA esporádica. En todos los casos

excepto uno, se ha notificado que los fármacos llevados a ensayos con seres humanos solo prolongan la supervivencia del ratón mutante para la SOD1 cuando se aplican antes de los síntomas, e incluso entonces proporcionan un beneficio de supervivencia únicamente retrasando el inicio de la enfermedad, sin ningún beneficio de ralentización de la progresión de la enfermedad. La única excepción a esto fue el riluzol, al igual que la situación con seres humanos, prolongó modestamente la supervivencia de los ratones mutantes para la SOD1^{G93A} y lo hizo ralentizando la progresión de la enfermedad¹⁷. Reconociendo que el éxito en el ensayo con seres humanos requerirá la ralentización de la progresión de la enfermedad, los ratones mutantes para la SOD1 han predicho perfectamente el éxito del riluzol y el fracaso de eficacia de cualquier otro fármaco probado en el ensayo con seres humanos. Lo que ha faltado son terapias adicionales que afecten a la progresión de la enfermedad en estos ratones.

Por lo tanto, el riluzol es el único fármaco aprobado actualmente por la FDA como terapia para la ELA, proporcionando un modesto beneficio de supervivencia²¹. Para el 20 % de los casos familiares causados por una mutación en la SOD1, los intentos de mejorar una terapia reduciendo en la síntesis de la SOD1 han sido el foco de múltiples enfoques de desarrollo terapéutico. Se ensayaron oligonucleótidos antisentido y ARN interferente suministrado mediante virus (ARNi) en modelos de rata²³⁻²⁵ y de ratón²² que desarrollan una parálisis mortal por la sobreexpresión la SOD1^{G93A} humana. Los oligonucleótidos antisentido infundidos al inicio de la enfermedad produjeron una reducción en la SOD1 y una modesta ralentización de la progresión de la enfermedad²². Se ha ensayado clínicamente la infusión directa en el LCR de oligonucleótidos antisentido²⁶, produciendo unos resultados esperanzadores en términos de tolerabilidad y seguridad, pero sin ninguna reducción significativa en los niveles de la SOD1 a las bajas dosis utilizadas. En cada uno de los estudios víricos previos²³⁻²⁵, se ha conseguido la inactivación de la SOD1 antes del inicio de la enfermedad mediante una inyección directa en el sistema nervioso o aprovechando el transporte retrógrado axonal cuando se ha inyectado intramuscularmente un virus^{23,24}. Estos estudios dieron lugar a diversos grados de éxito, prolongando la supervivencia o mejorando el comportamiento motor, dependiendo del momento del tratamiento, así como del nivel de inactivación de la SOD1 conseguido en la médula espinal. Aunque estos estudios proporcionaron una importante prueba de viabilidad, los enfoques estaban lejos de ser fácilmente traducidos a estrategias clínicas. De hecho, ha habido controvertidos informes alrededor de estos estudios iniciales de supresión mediada por virus de la SOD1^{23,24,27-29}.

Se han usado vectores de virus adenoasociados (AAV) 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 Gen Ther* (2008)].

El AAV es un parvovirus de replicación deficiente, cuyo genoma de ADN monocatenario tiene aproximadamente 4,7 kb de longitud, incluyendo 145 repeticiones terminales invertidas (ITR) de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos del genoma del AAV del 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 que actúan en cis dirigiendo la replicación del ADN vírico (rep), la encapsidación/empaquetamiento y la integración en el cromosoma de la célula hospedadora, están contenidas en las ITR. Tres promotores del AAV (denominados p5, p19 y p40 por sus ubicaciones relativas en el mapa) dirigen la expresión de los dos marcos abiertos de lectura internos del AAV que codifican los genes *rep* y *cap*. Los dos promotores rep (p5 y p19), acoplados con el corte y empalme diferencial del único intrón del AAV (en los nucleótidos 2107 y 2227), dan como resultado la producción de cuatro proteínas rep (rep 78, rep 68, rep 52 y rep 40) del gen *rep*. Las proteínas Rep poseen múltiples propiedades enzimáticas que son finalmente responsables de la replicación del genoma vírico. El gen *cap* es expresado a partir del promotor p40 y codifica las tres proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3. Un corte y empalme alternativo y unos sitios de inicio de la traducción no consenso son responsables de la producción de las tres proteínas relacionadas de la cápside. Un único sitio de poliadenilación consenso está ubicado en la posición del mapa 95 del genoma del AAV. El ciclo de vida y la genética del AAV se revisan en Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158: 97-129 (1992).

El AAV posee unas características únicas que lo hacen atractivo como vector para suministrar ADN foráneo a células, por ejemplo, en terapia génica. La infección por AAV de células en cultivo no es citopática, y la infección natural de seres humanos y de otros animales es silente y asintomática. Además, el AAV infecta muchas células de mamífero, permitiendo la posibilidad de dirigirse a muchos tejidos diferentes *in vivo*. Además, el AAV transduce lentamente células en división y en reposo, y puede persistir esencialmente durante la vida de esas células en forma de un episoma nuclear transcripcionalmente activo (elemento extracromosómico). El genoma provírico del AAV es infeccioso en forma de ADN clonado en plásmidos, lo que hace posible la construcción de genomas recombinantes. Asimismo, debido a las señales que dirigen la replicación del AAV, la encapsidación y la integración del genoma están contenidas en las ITR del genoma del AAV, algunas o todas las aproximadamente 4,3 kb internas del genoma (que codifican las proteínas de replicación y estructurales de la cápside, rep-cap) pueden ser sustituidas por ADN foráneo tal como un casete génico que contiene un promotor, un ADN de interés y una señal de poliadenilación. Las proteínas rep y cap pueden ser proporcionadas *in trans*. Otra característica significativa del AAV es que es un virus extremadamente estable y robusto. Soporta con facilidad las condiciones usadas para la inactivación de adenovirus (de 56° a 65 °C durante varias horas), haciendo menos crítica la preservación en frío del AAV. El AAV puede incluso ser liofilizado. Finalmente, las células infectadas por AAV no son resistentes a una sobreinfección.

Existen múltiples serotipos de AAV, y ofrecen un tropismo tisular diverso. Algunos 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 de AAV8 han hecho posible la transducción, mediante estos serotipos, de músculo esquelético y cardíaco después de unas simples inyecciones sistémicas intravenosas o intraperitoneales. 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 celulares dentro del sistema nervioso central ha implicado una inyección quirúrgica intraparenquimatosa. Véase, Kaplitt et al., *supra*; Marks et al., *supra*, y Worgall et al., *supra*. Con respecto al uso de AAV para dirigirse a tipos celulares dentro del sistema nervioso central, véase la Publicación Internacional nº WO 2010/ 071832. Las Publicaciones Internacionales nº WO 2009/043936 y WO 2009/013290 declaran que se refieren a la administración de genes al sistema nervioso central. La Publicación Internacional nº WO 2011/133890 declara que se refiere a virus adenoasociados 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, GB, vol. 2, 1 de enero de 2003 (2003-01-01), páginas 209-217 identificaron la secuencia de un ARNip y un ARNhc que puede regular por disminución selectivamente la expresión de la SOD1 mutante, pero no de la natural.

Permanece por tanto una 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 virus recombinante adenoasociado que comprende el ADN que codifica el ARNhc de la dismutasa de superóxido 1 (SOD1) CATGGATTCCATGTTTCATGA (SEQ ID NO: 4), en donde el genoma del virus recombinante adenoasociado carece de los genes *rep* y *cap*.

En un aspecto adicional de la presente invención también se proporciona el virus recombinante adenoasociado de la presente invención para su uso en terapia.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona el virus recombinante adenoasociado 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 virus recombinante adenoasociado de la presente invención

La presente invención proporciona productos y su uso en métodos útiles para reducir los niveles de la proteína mutante SOD1 en sujetos en necesidad de los mismos. La invención proporciona la administración mediada por AAV de ARN que incluyen, pero no se limitan a, ARN horquillados cortos, para reducir la síntesis de mutantes de la SOD1 humana que causan la ELA en sujetos en necesidad de los mismos. Algunos AAV recombinantes (rAAV) contemplados por la invención incluyen, pero no se limitan a, rAAV9, rAAV2 y rAAVrh74. Las vías de administración contempladas por la invención incluyen, pero no se limitan a, una administración sistémica y una administración intratecal. El uso de los productos de la invención está indicado, por ejemplo, en el tratamiento de la ELA.

En un aspecto, la invención proporciona genomas de rAAV que comprenden una o más ITR del AAV que flanquean un polinucleótido que codifica uno o más ARN (que incluyen, pero no se limitan a, ARN horquillados pequeños, ARN antisentido y/o microARN) que se dirigen a polinucleótidos de SOD1 mutantes. Los ejemplos describen el uso de ejemplos de rAAV que codifican ARN horquillados pequeños (ARNhp). En los genomas de los rAAV, el polinucleótido que codifica el ARNhc está unido operativamente al ADN de control de la transcripción, específicamente al ADN promotor que es funcional en las células objetivo. Los proveedores comerciales tales como Ambion Inc. (Austin, TX), Dharmacon Inc. (Lafayette, CO), InvivoGen (San Diego, CA) y Molecular Research Laboratories, LLC (Herndon, VA) generan moléculas inhibitoras personalizadas de ARN. Además, hay disponibles comercialmente kits para producir moléculas personalizadas de ARNip, tales como el SILENCER™ siRNA Construction Kit (Ambion Inc., Austin, TX) o el psiRNA System (InvivoGen, San Diego, CA). En la realización de la presente invención, el genoma del rAAV comprende un ADN que codifica un ARNhc de la SOD1 según se establece a continuación en SEQ ID NO: 4. La presente solicitud también divulga el genoma de un rAAV que comprende un ADN que codifica un ARNhc de la SOD1 según se establece a continuación en el resto de las secuencias:

GCATCATCAATTTTCGAGCAGAAGGAA (SEQ ID NO: 1),
 GAAGCATTAAGGACTGACTGAA (SEQ ID NO: 2),
 CTGACTGAAGGCCTGCATGGATT (SEQ ID NO: 3),
 CATGGATTCCATGTTTCATGA (SEQ ID NO: 4) ("ARNhc 130" o "ARNhc de la SOD1" en el presente documento),
 GCATGGATTCCATGTTTCATGA (SEQ ID NO: 5),
 GGTCTGGCCTATAAAGTAGTC (SEQ ID NO: 6),
 GGGCATCATCAATTTTCGAGCA (SEQ ID NO: 7),
 GCATCATCAATTTTCGAGCAGA (SEQ ID NO: 8),
 GCCTGCATGGATTCCATGTTC (SEQ ID NO: 9),
 GGAGGTCTGGCCTATAAAGTA (SEQ ID NO: 10),
 GATTCCATGTTTCATGAGTTTG (SEQ ID NO: 11),
 GGAGATAATACAGCAGGCTGT (SEQ ID NO: 12),

GCTTTAAAGTACCTGTAGTGA (SEQ ID NO: 13),
 GCATTAAGGACTGACTGAAG (SEQ ID NO: 14),
 TCATCAATTTGAGCAGAA (SEQ ID NO: 15),
 TCGAGCAGAAGGAAAGTAA (SEQ ID NO: 16),
 5 GCCTGCATGGATTCCATGT (SEQ ID NO: 17),
 TCACTCTCAGGAGACCATT (SEQ ID NO: 18) o
 GCTTTAAAGTACCTGTAGT (SEQ ID NO: 19).

10 Los genomas de rAAV de la invención carecen de ADN de rep y cap del AAV. El ADN de AAV en los genomas de rAAV (por ejemplo, las ITR) puede ser de cualquier serotipo de AAV a partir del cual pueda derivar un virus recombinante, incluyendo, pero no se limitan a, los 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 del AAV-1 se proporciona en el nº de registro de Genbank NC_002077; el genoma completo del AAV-2 se proporciona en el nº de registro de Genbank NC_001401 y en Srivastava et al., J. Virol., 45: 555-564 (1983); el genoma completo del AAV-3 nº de registro de Genbank NC_1829; el genoma completo del AAV-4 se proporciona en el nº de registro de Genbank NC_001829; el genoma del AAV-5 se proporciona en el nº de registro de Genbank AF085716; el genoma completo del AAV-6 se proporciona en el nº de registro de Genbank NC_001862; al menos porciones de los genomas de AAV-7 y AAV-8 se proporcionan en los nº de registro de GenBank AX753246 y AX753249, respectivamente; el genoma del AAV-9 se proporciona en Gao et al, J. Virol, 78: 6381-6388 (2004); el genoma del AAV-10 se proporciona en Mol. Ther., 13 (1): 67-76 (2006); y el genoma del AAV-11 se proporciona en Virology, 330 (2): 375-383 (2004). El genoma del AAVrh74 se proporciona en la Publicación Internacional nº WO 2013/078316.

25 En otro aspecto, la invención proporciona plásmidos de ADN que comprenden los genomas del rAAV de la invención. Los plásmidos de ADN se transfieren a células susceptibles de infección con un virus colaborador de AAV (por ejemplo, adenovirus, adenovirus delecionado en E1 o herpesvirus) para el ensamblaje del genoma del rAAV en partículas víricas infecciosas. Las técnicas para producir partículas de rAAV, en las que se va a empaquetar el genoma de un AAV, los genes *rep* y *cap*, y las funciones de virus colaborador que se proporcionan a una célula son habituales en la técnica. La producción de rAAV requiere que los siguientes componentes están presentes en una única célula (denominada en el presente documento célula de empaquetamiento): el genoma de un rAAV, los genes *rep* y *cap* del AAV separados de (es decir, fuera de) el genoma del rAAV, y funciones de virus colaborador. Los genes *rep* y *cap* del AAV pueden ser de cualquier serotipo de AAV del cual pueda derivar un virus recombinante, y pueden ser de un serotipo de AAV diferente al de las ITR del genoma del rAAV, incluyendo, pero no se limitan a, los 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 seudotipado se divulga, por ejemplo, en el documento WO 01/83692, que se incorpora como referencia en su totalidad en el presente documento. En diversas realizaciones, las proteínas de la cápside del AAV pueden ser modificadas para mejorar el suministro del vector recombinante. Las modificaciones de las proteínas de la cápside son generalmente conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos US 20050053922 y US 20090202490.

40 Un método para generar una célula de empaquetamiento es crear una línea celular que exprese de forma estable todos los componentes necesarios para la producción de partículas del AAV. Por ejemplo, un plásmido (o múltiples plásmidos) que comprenden el genoma de un rAAV que carece de los genes *rep* y *cap* del AAV, los genes *rep* y *cap* del AAV separados del genoma del rAAV, y un marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia a la neomicina, están integrados en el genoma de una célula. Los genomas del AAV se han introducido en plásmidos bacterianos mediante procedimientos tales como la adición de una cola de GC (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. S6. EE.UU., 79: 2077-2081), addition of synthetic linkers containing restriction endonuclease cleavage sites (Laughlin et al., 1983, Gene, 23: 65-73) o mediante la unión directa de extremos romos (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259: 4661-4666). Después, la línea celular de empaquetamiento es infectada con un virus colaborador tal como un adenovirus. Las ventajas de este método es que las células son seleccionables y son adecuadas para la producción a gran escala del rAAV. Otros ejemplos de métodos adecuados emplean adenovirus o baculovirus en lugar de plásmidos para introducir los genomas del rAAV y/o los genes *rep* y *cap* en las células de empaquetamiento.

55 Los principios generales de la producción de rAAV se revisan, por ejemplo, en Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; y Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial, and Immunol., 158: 97-129). Se describen diversos enfoques 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); la Patente de Estados Unidos nº 5.173.414; el documento WO 95/13365 y la correspondiente Patente de Estados Unidos nº 5.658.776; el documento WO 95/13392; el documento WO 96/17947; el documento PCT/US98/18600; el documento WO 97/09441 (PCT/US96/14423); el documento WO 97/08298 (PCT/US96/13872); el documento WO 97/21825 (PCT/US96/20777); el documento WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); el documento WO 99/11764; Perrin et al. (1995) Vaccine 13: 1244-1250; Paul et al. (1993) Human Gen Therapy 4: 609-615; Clark et al. (1996) Gen Therapy 3: 1124-1132; la Patente de Estados Unidos nº 5.786.211; la Patente de Estados Unidos nº 5.871.982; y la Patente de Estados Unidos nº 6.258.595. Se contemplan específicamente rAAV monocatenarios.

65 La divulgación proporciona por lo tanto células de empaquetamiento que producen rAAV infecciosos. En una

realización, las células de empaquetamiento pueden ser células cancerosas transformadas de forma estable, tales como células HeLa, células 293 y células PerC.6 (una línea celular 293 análoga). En otra realización, las células de empaquetamiento son células que no son células cancerosas transformadas, tales como células 293 de bajo pase (células de riñón fetal humano transformadas con EI 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 rhesus).

En otro aspecto más, la invención proporciona rAAV (es decir, partículas infecciosas encapsidadas de rAAV) que comprenden el genoma de un rAAV de la invención. En algunas realizaciones, el genoma del 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* y *cap* del AAV entre las ITR de los genomas. Algunas realizaciones incluyen, pero no se limitan a, el ejemplo de rAAV que incluye un genoma que codifica el ARNhc de la SOD1 denominado "AAV-SOD1-ARNhc". A continuación se establece una secuencia que incluye el genoma del AAV-SOD1-ARNhc en forma de una secuencia invertida de un plásmido usado en producción.

CARACTERÍSTICAS Ubicación/Modificadores

```

misc_feature 662..767
    /gene="ITR mutada"
    /SECDrawAs="Región"
    /SECStyleId=1
CDS complement(901..965)
    /gene="ARNhc de la SOD"
    /SECDrawAs=" Gen"
    /SECStyleId=1
misc_feature complement(966.. 1064)
    /gene="H1"
    /SECDrawAs="Región"
    /SECStyleId=1
misc_feature 1224..1503
    /gene="potenciador del CMV"
    /SECDrawAs="Región"
    /SECStyleId=1
misc_feature 1510..1779
    /gene="promotor de la actina B"
    /product="Pollo"
    /SECDrawAs="Región"
    /SECStyleId=1
misc_feature 1845..1875
    /gene=" SV40_late_19s_int"
    /SECDrawAs="Región"
    /SECStyleId=1
misc_feature 1845..1941
    /gene=" modSV40 late 16s int"
    /SECDrawAs="Región"
    /SECStyleId=1
CDS 2015..2734
    /gene="GFP"
    /SECDrawAs=" Gen"
    /SECStyleId=1
misc_feature 2783..2929
    /gene="BGHpA"
    /SECDrawAs="Región"
    /SECStyleId=1
misc_feature 3009..3149
    /gene="ITR"
    /SECDrawAs="Región"
    /SECStyleId=1
misc_feature 3983..4843
    /gene="amp r"
    /SECDrawAs="Región"
    /SECStyleId=1
misc_feature 4997..5618
    /gene="pBR322 ori"
    /SECDrawAs="Región"
    /SECStyleId=1

```

(SEQ ID NO: 20)

ES 2 799 437 T3

1 gcccaatacg caaacgcgct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctgattct
 61 aacgaggaaa gcacgttata cgtgctcgtc aaagcaacca tagtacgcgc cctgtagcgg
 121 cgcattaagc gcggcggttg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc
 181 cctagegccc gctcctttcg ctttcttccc ttccctttctc gccacgttcg cgggctttcc
 241 ccgtcaagct ctaaactcggg ggctcccttt aggggttccga tttagtgctt tacggcacct
 301 cgaccccaaa aaacttgatt aggggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac
 361 ggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac
 421 tggacaaca ctcaacccta tctcgggtcta ttcttttgat ttataagggga ttttgccgat
 481 ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa
 541 aatattaacg cttacaattt aaatatattgc ttataacaatc ttctgtttt tggggctttt
 601 ctgattatca accgggggtac atatgattga catgctagt ttacgattac cgttcatcgc
 661 cctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgctc gggcgacctt
 721 tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgcgc gcgcagagag ggcaggaat tcacgcgtgg
 781 atctgaattc aattcacgcg tggtaacctac actttatgct tccggctcgt atgttggtg
 841 gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc
 901 tttccaaaaa agcatggatt ccatgttcat gatctcttga atcatgaaca tggaatccat
 961 ggatccgagt ggtctcatac agaacttata agattcccaa atccaaagac atttcacggt
 1021 tatggtgatt tcccagaaca catagcgcaca tgcaaatatg aattcactgg ccgtcgtttt
 1081 acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgccttg cagcacatcc
 1141 ccctttcgcg agctggcgta atagcgaaga ggcccgacc gatcgcctt cccaacagtt
 1201 gcgcagcctg tggtagctct ggtcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga
 1261 ccgccaacg acccccgcgc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca
 1321 atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccacttgcca
 1381 gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtac ccccctattg acgtcaatga cggtaaagtg
 1441 cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttatgggact ttctacttg gcagtacatc
 1501 tactcgaggc cacgttctgc ttcactctcc ccactctccc cccctcccca cccccaattt
 1561 tgtatttatt tattttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggggggc
 1621 gcgcgccagg cggggcgggg cggggcgagg ggcggggcgg ggcgaggcgg agaggtgagg
 1681 cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttcttt tatggcgagg cggcggcggc
 1741 ggcggcccta taaaaagcga agcgcgcggc gggcgggagc gggatcagcc accgcggtgg
 1801 cggcctagag tcgacgagga actgaaaaac cagaaagtta actggttaagt ttagtctttt
 1861 tgtcttttat ttcaggtccc ggatccggtg gtggtgcaaa tcaaagaact gtcctcagt
 1921 ggatggtgcc tttacttcta ggctgtacg gaagtgttac ttctgctcta aaagctgcgg
 1981 aattgtaccc gcggccgac caccggtcgc caccatggtg agcaagggcg aggagctggt
 2041 caccggggtg gtgccatcc tggtcgagct ggcgaggcgc gtaaacggcc acaagttcag
 2101 cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga agttcatctg
 2161 caccaccggc aagctgcccg tgccctggcc caccctcgtg accaccctga cctacggcgt
 2221 gcagtgttc agccgtacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgcat
 2281 gcccgaaggc tacgtccagg agcgcacat cttcttcaag gacgacggca actacaagac
 2341 ccgcgccgag gtgaagtctg agggcgacac cctggtgaac cgcacgcgag tgaagggcat
 2401 cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acaacagcca

ES 2 799 437 T3

```

2461 caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aagggtgaact tcaagatccg
2521 ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga acacccccat
2581 cggcgacggc cccgtgctgc tgcccgacaa ccactacctg agcaccacagt ccgcccctgag
2641 caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagttcgtga ccgcccggcg
2701 gatcactctc ggcattggaag agctgtacaa gtaaagcggc catcaagctt atcgataaccg
2761 tcgactagag ctcgctgata agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt
2821 tgcccctccc ccgtgccttc cttgaccctg gaagggtgcca ctcccactgt cctttcctaa
2881 taaaatgagg aaattgcata gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg
2941 gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggagaga
3001 tcgatctgag gaaccctag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcy ctcgctcgct
3061 cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt
3121 gacgagcga gcgcgcagag agggagtggc ccccccccc ccccccccg cgtattctctt
3181 gtttgctcca gactctcagg caatgacctg atagcctttg tagagacctc tcaaaaatag
3241 ctaccctctc cggcatgaat ttatcagcta gaacggttga atatcatatt gatggtgatt
3301 tgactgtctc cggcctttct caccgctttg aatctttacc tacacattac tcaggcattg
3361 catttaaaat atatgagggg tctaaaaaatt tttatccttg cgttgaaata aaggcttctc
3421 ccgcaaaagt attacagggg cataatgttt ttggtacaac cgatttagct ttatgctctg
3481 aggtcttatt gcttaatttt gctaattctt tgccttgcc gtatgattta ttggtgttg
3541 gaatcgcctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcatatg
3601 gtgcaactct agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc gacaccggc
3661 aacaccgct gacgcgcct gacgggctt tctgctccc gcatccgctt acagacaagc
3721 tgtgaccgct tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc
3781 gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttataggtt aatgtcatga taataatggt
3841 ttcttagacg tcagggtggc cttttcgggg aatgtgccc ggaaccctta tttgtttatt
3901 tttctaaata cattcaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aatgcttca
3961 ataataatga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt
4021 ttttgccgca ttttgccctc ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga
4081 tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa
4141 gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct
4201 gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat
4261 acactattct cagaatgact tggttgagta ctaccagtc acagaaaagc atcttacgga
4321 tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata aactgcccgc
4381 caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcaacaatc
4441 gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccatacaaa
4501 cgacgagcgt gacaccaga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac
4561 tggcgaacta ctactctag ctcccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa
4621 agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc
4681 tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaaagc
4741 ctcccgatc gtagtattct acacgacggg gagttaggca actatggatg aacgaaatag
4801 acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttta
4861 ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa
4921 gatccttttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc
4981 gtcagacccc gtagaaaaga tcaaggatc ttcttgagat cttttttttc tgccgctaag
5041 ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga
5101 gctaccaact cttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt
5161 ccttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgctacata
5221 cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac
5281 cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg
5341 ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg
5401 tgagctatga gaaagcgcga cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag
5461 cggcaggggt ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg cctggtatct
5521 ttatagtct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc
5581 agggggcgag agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttcctt ttttgcctt
5641 ttgctgacct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggtaaccg
5701 tattaccgcc tttgagttag ctgataaccg tcgcccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga
5761 gtcagtgagc gaggaagcgg aagagc

```

Los nucleótidos 901-965 del ARNhc de la SOD comprenden la totalidad de la secuencia en horquilla que incluye los brazos sentido y antisentido, la horquilla y la secuencia de terminación. La secuencia con una orientación directa (con las secuencias objetivo contra la SOD1 subrayadas) es:

5 ' ATTCATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTT
 GGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTCGGATCCATGGATTCCATGTTCA
 TGATTCAAGAGATCATGAACATGGAATCCATGCTTTTTTGGAAA 3 ' (SEQ ID NO:21)

5 El rAAV de la invención puede ser purificado mediante métodos convencionales de la técnica, tales como una cromatografía en columna o gradientes en cloruro de cesio. Los métodos para purificar los vectores de rAAV del virus colaborador son conocidos en la técnica, e incluyen los métodos divulgados en, por ejemplo, Clark et al, Hum. Gen Ther., 10 (6): 1031-1039 (1999); Schenpp y Clark, Methods Mol. Med., 69: 427-443 (2002); la Patente de los Estados Unidos n.º 6.566.118 y el documento WO 98/09657.

10 En otro aspecto, la invención contempla composiciones que comprenden el rAAV de la presente invención. Las composiciones de la invención comprenden el rAAV en un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones también pueden comprender otros ingredientes tales como diluyentes y adyuvantes. Los portadores, diluyentes y adyuvantes aceptables no son tóxicos para los receptores y son preferentemente inertes a las dosis y en las concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato u otros ácidos orgánicos; antioxidantes
 15 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 sales, tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como Tween, pluronics o polietilenglicol (PEG).
 20

Los títulos del rAAV que se va a administrar en los usos de la invención variarán dependiendo, por ejemplo, del rAAV en particular, del modo de administración, del objetivo del tratamiento, del individuo y del (los) tipo(s) celular(es) al (los) que se dirige, y pueden ser determinados mediante los métodos convencionales de la técnica. Los títulos del rAAV pueden variar desde 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} , aproximadamente 1×10^{13} hasta aproximadamente 1×10^{14} o más partículas resistentes a la DNasa (DRP) por ml. Las dosis también pueden ser expresadas en unidades de genoma vírico (vg). Las dosis también pueden variar según la cronología de la administración a un ser humano. Estas dosis del rAAV pueden variar desde 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 del rAAV pueden variar desde 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.
 35
 40

45 En otro aspecto, la invención contempla composiciones que comprenden el rAAV de la presente invención. Las composiciones de la invención comprenden el rAAV en un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones también pueden comprender otros ingredientes tales como diluyentes y adyuvantes. Los portadores, diluyentes y adyuvantes aceptables no son tóxicos para los receptores y son preferentemente inertes a las dosis y en 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 sales, tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como Tween, pluronics o polietilenglicol (PEG).
 50
 55

En otro aspecto más, la invención proporciona usos del rAAV de la invención en métodos de transducción de una célula objetivo con un rAAV de la invención, *in vivo* o *in vitro*. Los métodos *in vivo* comprenden la etapa de administrar una dosis eficaz o múltiples dosis eficaces, de una composición que comprende un rAAV de la invención a un sujeto, un sujeto (incluyendo un ser humano), en necesidad del mismo. 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 algunas realizaciones de la invención, una dosis eficaz es una dosis que alivia (elimina o reduce) al menos un síntoma asociado con el trastorno/estado patológico que se va a
 60

tratar, que ralentiza o previene la progresión hacia un trastorno/estado patológico, que ralentiza o previene la progresión de un trastorno/estado patológico, que disminuye la magnitud de la enfermedad, que da como resultado una remisión (parcial o total) de la enfermedad, y/o que prolonga la supervivencia. Un ejemplo de una enfermedad contemplada para su tratamiento con los métodos de la invención es la ELA. Un "tratamiento" según la invención, por lo tanto, alivia (elimina o reduce) al menos un síntoma asociado con el trastorno/estado patológico que se va a tratar (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 ralentiza o previene la progresión hacia (el inicio/desarrollo) de un trastorno/estado patológico, que ralentiza o previene la progresión de un trastorno/estado patológico, que disminuye la magnitud de la enfermedad, que da como resultado una remisión (parcial o total) de la enfermedad, y/o que prolonga la supervivencia. En algunas realizaciones, la supervivencia se prolonga 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.

Las terapias de combinación también están contempladas por la invención. Según se usa en el presente documento, la combinación incluye tanto tratamientos simultáneos como tratamientos secuenciales. Se contemplan específicamente combinaciones de usos de la invención con tratamientos médicos convencionales (por ejemplo, riluzol), ya que son combinaciones con terapias novedosas.

La administración de una dosis eficaz de las composiciones puede ser mediante las vías convencionales de la técnica que incluyen, pero no se limitan a, sistémica intramuscular, 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 del AAV del rAAV (en particular, las ITR del AAV y la proteína de la cápside) de la invención pueden ser elegidos y/o ajustados por los expertos en la técnica teniendo en cuenta la infección y/o el estado patológico que se va a tratar, y la(s) célula(s)/tejido(s) objetivo que va(n) a expresar los ARNhc de la 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 intracerebroventricular. En algunas realizaciones, la vía de administración es la cisterna cerebelobulbar posterior. En algunas realizaciones, la vía de administración es mediante una punción lumbar.

La transducción de las células con el rAAV de la invención da como resultado la expresión sostenida de los ARNhc de la SOD1. En otro aspecto, la presente invención proporciona, por lo tanto, métodos para administrar/suministrar a un sujeto el rAAV que expresa el ARNhc de la SOD1, preferentemente un ser humano. El término "transducción" se usa para hacer referencia a la administración/suministro de los ARNhc de la SOD1 a una célula receptora tanto *in vivo* como *in vitro*, a través de un rAAV de replicación deficiente de la invención, dando como resultado la expresión de un ARNhc de la SOD1 por parte de la célula receptora.

Por lo tanto, la invención proporciona el uso del rAAV de la presente invención en métodos de administración de una dosis eficaz (o dosis administradas esencialmente simultáneamente, o dosis administradas a intervalos) del rAAV que codifica los ARNhc de la SOD1 en un sujeto en necesidad del mismo

En un aspecto, la invención proporciona el uso del rAAV de la presente invención en métodos para suministrar un polinucleótido que codifica un ARNhc de la invención a través de la BHC, que comprende la administración por vía sistémica a un sujeto de un rAAV con un genoma que incluye el polinucleótido. En algunas realizaciones, el genoma del rAAV es un genoma autocomplementario. En otras realizaciones, el genoma del 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, los métodos suministran por vía sistémica polinucleótidos a través de la BHC al sistema nervioso central y/o periférico. Por consiguiente, se proporciona un método para suministrar un polinucleótido al sistema nervioso central que comprende la administración a un sujeto por vía sistémica de un rAAV con un genoma autocomplementario que incluye el genoma. En algunas realizaciones, el polinucleótido se suministra en el cerebro. En algunas realizaciones, el polinucleótido se suministra en la médula espinal. También se proporciona un método para suministrar un polinucleótido al sistema nervioso periférico que comprende la administración a un sujeto por vía sistémica de un rAAV con un genoma autocomplementario que incluye el polinucleótido se proporciona. En algunas realizaciones, el polinucleótido se suministra en una motoneurona inferior. En algunas realizaciones, el genoma del rAAV es un genoma autocomplementario. En otras realizaciones, el genoma del 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 otro aspecto, la invención proporciona el uso del rAAV de la presente invención en métodos para suministrar un polinucleótido al sistema nervioso central de un sujeto en necesidad del mismo que comprende el suministro intratecal de un rAAV con un genoma que incluye el polinucleótido. En algunas realizaciones, el genoma del rAAV es un genoma autocomplementario. En otras realizaciones, el genoma del 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 suministra al sujeto un agente de contraste no iónico de osmolaridad baja, por ejemplo, iobitridol, iohexol, iomeprol, iopamidol, iopentol, iopromida, ioversol o ioxilano.

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

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Patrón de transducción del AAV9 y persistencia en ratones SOD1^{G93A}. Los ratones SOD1^{G93A} recibieron una inyección intravenosa de AAV9-CB-GFP el P1, el P21 y se sacrificaron 21 días después de la inyección ($n = 3$ por punto temporal). En las médulas espinales se analiza la expresión de la GFP, de la ChAT (marcador de motoneurona) y de la GFAP (marcador de astrocito). La inyección en la vena temporal de AAV9-CB-GFP el P1 dio como resultado una transducción eficiente de las motoneuronas y la glía en ratones SOD1^{G93A} (a, f, k, p). La inyección en la vena de la cola el P21 (b, g, l, q) se dirigió predominantemente a los astrocitos, con unas pocas motoneuronas positivas para la GFP. Para analizar la persistencia de las células transducidas, se inyectó por vía intravenosa AAV9-CB-GFP el P1 y el P21 en animales SOD1^{G93A} que fueron sacrificados en la fase final (~P130). El análisis por inmunofluorescencia del asta anterior lumbar (c, d, h, i, m, n, r, s) demostró que se mantenía la expresión de la GFP en los astrocitos a lo largo del curso de la enfermedad. Para determinar si la inflamación y el daño mediados por la SOD1 afectarían a la transducción del AAV9, los ratones SOD1^{G93A} recibieron una inyección intravenosa el P85 y se recolectaron sus médulas espinales en la fase final. No se observó ninguna diferencia en el patrón de transducción de los ratones SOD1^{G93A} tratados el P21 o el P85. Los recuadros de (r-t) muestran la colocalización entre la señal de la GFP y la de la GFAP. (u) Cuantificación de células transducidas en médulas espinales con ELA (para cada grupo, se analizaron los tejidos de 3 animales). Las columnas de la GFP y de la ChAT muestran las cifras de células contadas. Barras = 100 μ m. AAV, virus adenoasociado; P1, día posnatal 1; P21, día posnatal 21; P85, día posnatal 85; GFP, proteína fluorescente verde; ChAT, acetiltransferasa de colina; GFAP, proteína ácida fibrilar glial.

Figura 2. Las construcciones de ARNhc muestran una eficaz reducción de la proteína SOD1 humana *in vitro* e *in vivo*. (a) Alineaciones de la secuencia entre la SOD1 humana y la de ratón para las regiones a las que se dirigen las 4 diferentes construcciones de ARNhc analizadas. (b) Las secuencias de ARNhc se clonaron en una construcción de expresión H1 y se transfectaron temporalmente en células 293. Los lisados se recolectaron 72 horas después de la transfección y se analizaron mediante una inmunoelectrotransferencia. (c) La cuantificación de la supresión *in vitro* de la SOD1 humana de tres transfecciones temporales individuales mostró una reducción del > 50 % en la SOD1. (d) El ARNhc 130 se empaquetó en el AAV9 y se inyectó en los ratones SOD1^{G93A} bien el P1 o el P21. Se recolectaron las médulas espinales ($n = 3$ por punto temporal) tres semanas después de la inyección y se analizaron mediante una inmunoelectrotransferencia para evaluar los niveles de la proteína SOD1 humana. (e) Cuantificación de la supresión *in vivo* de la SOD1 humana en la médula espinal de ratones con ELA. Las médulas espinales que recibieron inyección el P1 y el P21 mostraron unas reducciones del 60 % y del 45 % en la proteína SOD1 mutante, respectivamente. hSOD1, dismutasa de superóxido 1 humana; mSOD1, dismutasa de superóxido 1 de ratón; GAPDH, deshidrogenasa de gliceraldehído 3 fosfato.

Figura 3. El suministro intravenoso de AAV9-SOD1-ARNhc mejora la supervivencia y el comportamiento motor en ratones SOD1^{G93A}. Los ratones SOD1^{G93A} recibieron una única inyección intravenosa de AAV9-SOD1-ARNhc el P1 ($n = 6$, verde), el P21 ($n = 9$, rojo) o el P85 ($n = 5$, azul). Los ratones tratados se monitorizaron hasta la fase final y se compararon con los ratones de control SOD1^{G93A} que no recibieron inyección ($n = 15$, gris). (a, c) La inyección de AAV9-SOD1-ARNhc en ratones P1 SOD1^{G93A} retrasó significativamente el inicio mediano de la enfermedad 39,5 días en comparación con los animales de control (que no recibieron inyección, 103d; P1, 142,5d; $p < 0,05$). La inyección el P21 (rojo) o el P85 (azul) en animales con ELA no tuvo ningún efecto sobre el inicio de la enfermedad (P21, 110d; P85, 105d). Sin embargo, el AAV9-SOD1-ARNhc administrado el P1, el P21 o el P85 prolongó en todos significativamente la supervivencia mediana (b, e) (no recibieron inyección, 132d; P1, 183,5d; P21, 171d; P85, 162d; todas las comparaciones con el control $p < 0,001$). El grupo P21 tuvo una significativa extensión en la duración mediana de la enfermedad (d) que indicaba una ralentización de la enfermedad (no recibieron inyección, 29,5d; P1, 41d; P21, 49d; P85, 40d; prueba de Wilcoxon para datos emparejados $p = 0,06$, 0,01 y 0,12, respectivamente). (f-h) Los animales tratados el P1 y el P21 mantenían su peso, tenían una mejor fuerza de agarre de las extremidades posteriores y comportamiento en el cilindro giratorio cuando se comparaban con los controles emparejados por edades, lo que indica que los animales tratados conservaban el tono muscular y la función motora durante su supervivencia prolongada. Las líneas entre las barras de (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-SOD1-ARNhc reduce la proteína mutante en las médulas espinales de ratones SOD1^{G93A}. (a-d) Se capturaron imágenes de secciones de la médula espinal lumbar de ratones que no recibieron inyección (a), que recibieron inyección el P1 (b), que recibieron inyección el P21 (c) y que recibieron inyección el P85 (d) con unos ajustes idénticos del microscopio para mostrar cualitativamente los niveles de la SOD1 en la fase final. Los niveles de la SOD1 tienen una correlación inversa con la supervivencia. (e-t) El marcaje conjunto de la GFP, la ChAT y la SOD1 muestra que las motoneuronas transducidas con el AAV9 tienen una expresión reducida de la SOD1 (flechas), mientras que las células que carecían de la GFP mantenían unos

elevados niveles de la proteína mutante (puntas de flecha). Según se describe en la Figura 1u, se observó una mayor transducción de la MN y la correspondiente reducción en la SOD1 en los ratones que recibieron inyección el P1 (i-l) en comparación con los ratones que recibieron inyección el P21 (m-p) y el P85 (q-t). Barra = 100 μ m. P1, día posnatal 1; P21, día posnatal 21; P85, día posnatal 85; SOD1, dismutasa de superóxido 1; GFP, proteína fluorescente verde; ChAT, acetiltransferasa de colina.

Figura 5. El AAV9-SOD1-ARNhc mejora la supervivencia y el comportamiento motor en los ratones SOD1^{G37R} tratados después del inicio de la enfermedad. (a) No había ninguna diferencia en el inicio o mediano de la enfermedad entre los ratones tratados con AAV9-SOD1-ARNhc y los de control. (promedio de edad en el tratamiento = 215d frente al inicio mediano de 194d para los de control y de 197d para los tratados; prueba del orden logarítmico $p = 0,46$). (b,f) La supervivencia mediana de los ratones SOD1^{G37R} tratados con AAV9-SOD1-ARNhc ($n = 25$) estaba significativamente prolongada con respecto a los ratones de control ($n = 21$). (control, $n = 21$, 392d; ARNhc de la SOD1, $n = 25$, 478,5d; prueba del orden logarítmico $p < 0,0001$) (c-e) La fase temprana de la enfermedad estaba significativamente ralentizada en 73 días en los ratones tratados en comparación con los ratones de control (control, 89d; ARNhc de la SOD1, 162d; $p < 0,0001$ prueba de Wilcoxon para datos emparejados), mientras que la fase tardía de la enfermedad mostró una ralentización no significativa (control, 63d; ARNhc de la SOD1, 81d; $p = 0,14$ prueba de Wilcoxon para datos emparejados). En conjunto, esto sumaba un aumento de 66 días en la duración mediana de la enfermedad (control, 173d; ARNhc de la SOD1, 239d; $p < 0,0001$ prueba de Wilcoxon para datos emparejados). (g) Apareció una tendencia a una fuerza de agarre de las extremidades posteriores mejorada en los ratones tratados con AAV9-SOD1-ARNhc en comparación con los ratones de control.

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

Figura 7. La infusión intratecal de AAV9-SOD1-ARNhc en primates no humanos da lugar a una reducción eficaz en los niveles de la SOD1. (a) Un mielograma poco después de la infusión intratecal de AAV9-SOD1-ARNhc mezclado con contraste muestra un suministro apropiado en el espacio subaracnoideo de un macaco cangrejero. Las flechas muestran la difusión del agente de contraste a lo largo de la totalidad de la médula espinal. (b) Se recogieron secciones de la médula espinal lumbar de monos tratados ($n = 3$) dos semanas después de la inyección y se tiñeron para la GFP usando una tinción DAB. Las secciones tienen una expresión generalizada de la GFP por toda la sustancia gris y blanca. (c-e) Los análisis de inmunofluorescencia de las secciones medulares espinales lumbares mostraron una robusta expresión de la GFP (c) en las células positivas para la ChAT (d), lo que indica una transducción a la motoneurona (e, fusión), (f) Los análisis de inmunoelectrotransferencia de las médulas espinales lumbares mostraron una significativa reducción en los niveles de la SOD1 en los animales que recibieron una inyección de AAV9-SOD1-ARNhc en comparación con los controles. (g) La cuantificación *in vivo* de la inactivación de la SOD1 en homogeneizado de médula espinal lumbar de mono ($n = 3$) mostró una reducción del 87 % en los animales que recibieron el AAV9-SOD1-ARNhc en comparación con los controles que no recibieron inyección. (h) Se usó una microdissección de captura con láser para recolectar motoneuronas o neuropilos circundantes de secciones lumbares de monos que recibieron la inyección y de control. Se analizaron los niveles de SOD1 en las células recolectadas mediante una qRT-PCR. Las motoneuronas recolectadas de los animales AAV9-SOD1-ARNhc ($n = 3$) tenían una reducción del 95 ± 3 % en el ARN de la SOD1. Las no neuronas tenían una reducción del 66 ± 9 % en el ARN de la SOD1 en los animales tratados con el AAV9-SOD1-ARNhc. Barras de escala: b = 100 μ m; e = 50 μ m. SOD1: dismutasa de superóxido 1.

Figura 8. La infusión intratecal lumbar de AAV9-SOD1-ARNhc dio lugar a una eficaz transducción de las motoneuronas y de las células no neuronales en la médula cervical, torácica y lumbar, dando lugar a una reducción en la SOD1. (a-c) Análisis de inmunofluorescencia de los tres segmentos de la médula espinal; cervical (a), torácico (b) y lumbar (c), mostraron una robusta expresión de la GFP (verde) en las células positivas para Chat (rojo), indicando la transducción de la motoneurona. (d) Los recuentos celulares de GFP+/Chat+ muestran un gradiente de caudal a rostral para la transducción de la motoneurona que varía desde un 85 % de células transducidas en la región lumbar, hasta más del 50 % en la región cervical. (e) Los niveles de ARNm de la SOD1 en homogeneizados de secciones cervicales, torácicas y lumbares de la médula espinal analizados mediante una qRT-PCR muestran una reducción significativa en el transcrito de la SOD1, coherentemente con la transducción de la motoneurona. Los niveles de la SOD1 se normalizaron a la actina β , y se compararon los animales que recibieron una inyección de AAV9-SOD1-ARNhc con un control que recibió una inyección de AAV9-CB-GFP. Barras de escala: (a-c) = 50 μ m; Barras de error: (d-e) = DE.

Figura 9. Diseño de una construcción clínica de ARNhc de la SOD1. (a) La construcción original de ARNhc de la SOD1 del AAV contiene la secuencia del ARNhc contra la SOD1 humana bajo el promotor H1, seguida por el casete de expresión para la GFP que incluye el potenciador del CMV, el promotor de la CBA, el intrón del SV40 modificado y la secuencia del transgen de la GFP seguida por un terminador de PoliA de la bGH. El casete de

expresión del ARNhc de la SOD1 y el casete de expresión de la GFP están flanqueados por las ITR del AAV2 lo que asegura el empaquetamiento de la secuencia flanqueada completa en la cápside del AAV9. (b) En la construcción clínica del ARNhc de la SOD1, el casete de expresión de la GFP está sustituido por un elemento de relleno que contiene secuencias no codificantes en tándem de vacunas de ADN aprobadas por la FDA. ITR: repeticiones terminales invertidas; ARNhc, ARN horquillado pequeño; SOD1, dismutasa de superóxido 1; CMV, potenciador de citomegalovirus; CBA, promotor de la actina β de pollo; GFP, proteína fluorescente verde; pA de la bGH, terminador de poli A de la hormona de crecimiento bovina.

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

Figura 11. La transfección *in vitro* de la construcción clínica del ARNhc de la SOD1 reduce eficazmente la proteína SOD1 humana en células HEK293. Los campos microscópicos representativos muestran imágenes de campo claro de células HEK 293 de control no transfectadas (a), transfectadas con el ARNhc de la SOD1 del AAV (b) y transfectadas con el vector lanzadera pJet del ARNhc de la SOD1 (c, d), 72 h después de la transfección. Las correspondientes imágenes de fluorescencia revelan la ausencia de fluorescencia de la GFP de las células HEK 293 transfectadas con el pJet del ARNhc de la SOD1 (g, h) en comparación con las células transfectadas con el ARNhc de la SOD1 del AAV (f). (i) El análisis de inmunoelectrotransferencia de los lisados celulares confirma la eficiente inactivación de la proteína SOD1 humana en células transfectadas con el pJet del ARNhc de la SOD1 en comparación con las células de control no transfectadas. El análisis de inmunotransferencia también confirma la eliminación del transgen de la GFP de la construcción del pJet del ARNhc de la SOD1. (j) Cuantificación de la regulación por disminución *in vitro* de la SOD1 por el pJet del ARNhc de la SOD1. El pJet del ARNhc de la SOD1 reduce los niveles de la proteína SOD1 humana en prácticamente el 50 % en las células HEK 293 en comparación con el control. Esta reducción es similar a la conseguida con la construcción del ARNhc de la SOD1 del AAV.

Figura 12. Esquema de la estrategia de clonación del vector clínico del ARNhc de la SOD1 del AAV. La construcción clínica de ARNhc de la SOD1 se clonó en el vector AAV CB MCS usando los sitios Kpn1/SPH1. El doble digerido Kpn1/SPH1 del plásmido AAV CB MCS da como resultado la liberación del casete de expresión del transgen completo a partir de este vector, que está adicionalmente sustituido con la construcción clínica del ARNhc de la SOD1 portadora del casete de expresión del ARNhc de la SOD1 y de la secuencia de relleno.

Figura 13. El ARNhc de la SOD1 del AAV clínico reduce eficazmente los niveles de la SOD1 humana *in vitro*. Se transfectaron células HEK293 con el plásmido clínico de ARNhc de la SOD1 del AAV mediante el método del fosfato de calcio. Los campos microscópicos representativos muestran imágenes de campo claro de controles no transfectados (a), de células transfectadas con el ARNhc de la SOD1 del AAV y con el ARNhc de la SOD1 del AAV clínico, respectivamente, 72 h después de la transfección (a-c). La eliminación con éxito de la GFP del ARNhc de la SOD1 del AAV clínico se confirmó por la ausencia de expresión de la GFP en células transfectadas con el ARNhc de la SOD1 del AAV clínico (f, g). (g) Los análisis de inmunoelectrotransferencia de los lisados celulares, recolectados 72 h después de la transfección, confirmaron la eficaz regulación por disminución de la SOD1 en células transfectadas con el ARNhc de la SOD1 del AAV clínico en comparación con el control. El ARNhc de la SOD1 del AAV se usó como control positivo. (h) Cuantificación de la inactivación *in vitro* de la SOD1 mediante el ARNhc de la SOD1 del AAV clínico.

Figura S1. La administración del AAV9-ARNhc-SOD1 es bien tolerada en ratones naturales. Los animales naturales hembras y machos recibieron una inyección de AAV9-SOD1-ARNhc el P1 o el P21 y se monitorizaron hasta los 6 meses de edad. (a, b) Los ratones tratados, tanto machos como hembras, mostraron un aumento estable en la masa corporal en comparación con los animales de control. (c,d) El comportamiento de rotación y la fuerza de agarre de la extremidad posterior (e, f) no se vieron afectados por el tratamiento el P1 o el P21 en ambos grupos en comparación con los respectivos controles. n = 5 por grupo. WT, natural; P1, día posnatal 1; P21, día posnatal 21.

Figura S2. Hematología y bioquímica sérica de los animales naturales tratados con el AAV9-SOD1-ARNhc. (a-m) Se recogió sangre de animales tratados el P1 (verde) o el P21 (rojo) y naturales de control (gris) a los 150 días de edad para los animales de control. 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 edad no mostraron diferencias significativas en el perfil bioquímico del suero. Media \pm EEM. n = 5 por grupo. P1, día posnatal 1; P21, día posnatal 21.

Figura S3. El tratamiento con AAV9-SOD1-ARNhc en ratones con la SOD 1^{G93A} reduce la astrogliosis. Se recogieron secciones en la fase final de los animales de control y de los tratados con AAV9-SOD1-ARNhc y se tiñeron para GFAP, un marcador de activación de astrocitos. Los ratones que recibieron la inyección el P1 (b) y el P85 (d) mostraron unos niveles reducidos de astrogliosis en comparación con los ratones de control (a), mientras que los ratones que recibieron la inyección el P21(c) mostraron la reducción máxima. Esto era coherente con el porcentaje de transducción de los astrocitos conseguido 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-SOD1-ARNhc reduce eficazmente los niveles de la proteína SOD1 mutante en las médulas espinales de los ratones SOD1^{G37R}. (a) Después del inicio de la enfermedad, se inyectó AAV9-CB-GFP o AAV9-SOD1-ARNhc en ratones SOD1^{G37R}, y las médulas espinales se recogieron en la fase final y se analizaron mediante una inmunoelectrotransferencia para evaluar los niveles de la proteína SOD1 humana. (b) La cuantificación de a) muestra la supresión de la SOD1 humana en las médulas espinales de los ratones SOD1^{G37R} (n=4 por grupo). hSOD1, dismutasa de superóxido 1 humana; GAPDH, deshidrogenasa de gliceraldehído 3 fosfato.

Figura S5. El ARNhc 130 reduce eficazmente los niveles de la SOD1 de mono *in vitro*. (a) Alineación de la secuencia de la región a la que se dirige el ARNhc 130 de la SOD1 y un único emparejamiento incorrecto en la secuencia de mono. La secuencia de mono se corresponde con la secuencia de la SOD1 del macaco de la India (NM 001032804.1), del macaco cangrejero (secuenciada internamente) y del cercopiteco verde. (b) El casete de expresión del 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 una qRT PCR para la SOD1. El ARNhc 130 redujo los niveles de transcrito de la SOD1 en un 75 % en células Cos-7.

Ejemplos

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos. Aunque la presente invención se ha descrito en términos de diversas realizaciones y ejemplos, se entenderá que para los expertos en la materia serán evidentes variaciones y mejoras. Por lo tanto, en la invención únicamente se debe dejar constancia de dichas limitaciones, como aparecen en las reivindicaciones.

Ejemplo 1

Patrón de transducción del AAV9 y persistencia en ratones SOD1^{G93A}

En primer lugar, evaluamos la eficacia de la transcripción del AAV9 en el modelo de ratón de SOD1^{G93A} que desarrolla una enfermedad parálitica mortal. Se obtuvieron ratones con muchas copias de la SOD1^{G93A} en Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) y se criaron en el Kaspar lab. Los animales se genotiparon antes del tratamiento para obtener ratones que expresan la SOD1^{G93A} y sus hermanos naturales. En los experimentos de la SOD1^{G93A} únicamente se incluyeron ratones hembra. Los animales recibieron una inyección intravenosa el día 1 o el día 21 posnatal (denominados respectivamente P1 y P21) con el AAV9 autocomplementario que expresa la GFP del potenciador del CMV/promotor de la actina beta (CB) (AAV9-CB-GFP) (n = 3 por grupo). Tres semanas después de la inyección, los animales fueron sacrificados y se analizó la expresión de la GFP en las médulas espinales (Figs. 1a-u).

Todos los procedimientos con animales descritos en el presente documento se realizaron según las directrices de los NIH y fueron aprobados por el Research Institute at Nationwide Children's Hospital (Columbus, OH), la Universidad de California (San Diego, CA) o los Mannheimer Foundation (Homestead, FL) Institutional Animal Care and Use Committees.

La eficacia de la transcripción era alta en los astrocitos con la SOD1^{G93A}, con la GFP expresada en un 34 ± 2 % y en un 54 ± 3 %, respectivamente, de los astrocitos de la sustancia gris de la médula espinal que recibió una inyección el P1 y el P21 (definida por la inmunoreactividad para la GFAP). Esta eficacia era similar a nuestro informe previo del 64 ± 1 % en animales naturales que recibieron inyección el P21¹⁸. Las motoneuronas eran un tipo celular destacado transducido a todos los niveles de las médulas espinales de los animales que recibieron inyección de SOD1^{G93A} el P1 (62 ± 1 %), en comparación con el significativamente menor direccionamiento a las motoneuronas en los animales que recibieron inyección el P21 (8 ± 1 %).

Aunque previamente hemos notificado que los astrocitos transducidos en las médulas espinales naturales persisten con una acumulación continua de la GFP durante al menos 7 semanas después de la inyección¹⁸, no se analizó la longevidad de los astrocitos SOD1 mutantes (ni su síntesis continua de los genes codificados por el episoma AAV9) durante la enfermedad activa de tipo ELA. Por lo tanto, los ratones SOD1^{G93A} recibieron inyecciones de AAV9-CB-GFP el P1 y el P21 y continuaron hasta la fase final (~P130, n=3 por grupo) (Figs. 1c, d, h, i, m, n, r, s). El análisis de inmunofluorescencia de las médulas espinales SOD1^{G93A} en la fase final de los animales que recibieron inyección el P1 y el P21 mostraron un número comparable de astrocitos que expresan la GFP a los que se encontraron 21 días después de la inyección del AAV9 (P1: 42 ± 2 %, P21: 61 ± 2 %). Estos datos son coherentes con la supervivencia de los astrocitos transducidos para la duración de la enfermedad (~110 días después de la inyección el P21) en ratones SOD1^{G93A} y que se mantiene la expresión del gen codificado por el AAV9.

Además, reconociendo que el daño mediado por la SOD1 mutante, incluyendo la activación astrocítica y microglial y cambios tempranos en la barrera hematoencefálica, se desarrolla durante la enfermedad en los ratones en los ratones mutantes para la SOD1²⁰, analizamos si este daño afectaba a la transducción del AAV9. Los ratones SOD1^{G93A} recibieron una inyección de AAV9-CB-GFP el P85 y fueron sacrificados en la fase final (n = 3) (Figs. 1e, j, o, t). El análisis de las médulas espinales reveló que el patrón de transducción observado en los animales P85 era similar al

de los animales tratados el P21, con los astrocitos como el tipo celular predominante transducido a todos los niveles ($51 \pm 6\%$ de células GFP+/GFAP+ en la sustancia gris lumbar).

Ejemplo 2

5 Desarrollo de una secuencia de ARNhc específica para la SOD1 humana

Para dirigirse específicamente al ARNm de la SOD1 humana, se generaron cuatro construcciones de ARNhc que se dirigen a la SOD1 humana y se obtuvieron con la herramienta de diseño de Life Technologies. Las construcciones que tenían un mínimo de cuatro emparejamientos incorrectos de bases en comparación con la secuencia de ARNm de ratón (Fig. 2a). Los números de bases de las secuencias humanas mostradas se corresponden con el número de registro CCDS33536.1 de la base de datos del NCBI CCDS. Estas construcciones se clonaron en pSilencer 3.1 (Genscript) bajo el promotor H1 humano y se analizaron *in vitro*. El ARNhc 130 junto con el promotor H1 se clonó adicionalmente en un vector de AAV junto con una GFP indicadora bajo el promotor de la actina beta de pollo para identificar las células transducidas. Las células 293 humanas se transfectaron con cada casete. Las células HEK-293 se mantuvieron en medio IMDM que contenía FBS al 10 %, L-glutamina al 1 % y penicilina/estreptomocina al 1 %. Tras alcanzar una confluencia del ~60 %, las células se transfectaron con pSilencer 3.1, que contenía los ARNhc que se iban analizar. Los lisados de proteína se prepararon 72 horas después de la transfección, y los niveles de SOD1 se analizaron mediante una inmunoelectrotransferencia. Las cuatro secuencias redujeron los niveles de la proteína SOD1 en > 50 % (Figs. 2b, c).

El ARNhc130 fue seleccionado para experimentos adicionales porque producía la inactivación más coherente en los tres experimentos individuales de transfección. Se clonó en un vector de AAV9 autocomplementario que también contenía un gen de la GFP cuya expresión identificaría las células transducidas (denominado AAV9-SOD1-ARNhc). El AAV9-SOD1-ARNhc autocomplementario se produjo mediante procedimientos de transfección temporal usando un vector bicatenario de CB-GFP basado en AAV2-ITR, con un plásmido que codifica la secuencia Rep2Cap9 como se ha descrito previamente, junto con un plásmido colaborador adenovírico pHelper (Stratagene, Santa Clara, CA) en células 293¹⁸.

Para confirmar que el ARNhc podría suprimir la acumulación de la SOD1 humana, los ratones SOD1^{G93A} (n = 3) recibieron una inyección intravenosa de AAV9-SOD1-ARNhc bien el P1 o el P21. Para las inyecciones de ratones se utilizaron crías SOD1^{G93A} los días posnatales 1-2. Se inyectó un volumen total de 50 μ l que contiene 5×10^{11} partículas víricas resistentes a la DNasa de AAV9-SOD1-ARNhc (Virapur LLC, San Diego, CA) a través de la vena temporal, como se ha descrito previamente¹⁸. Se verificó una inyección correcta notando la palidez de la vena. Después de la inyección, las crías se devolvieron a su jaula. Los animales fueron sacrificados tres semanas después de la inyección, y las médulas espinales se recogieron y se analizaron mediante inmunotransferencia para ambas proteínas SOD1 humana (mutante) y murina (natural). Las médulas espinales que recibieron inyección el P1 y el P21 mostraron unas reducciones del 60 % y del 45 % en la proteína SOD1 mutante, respectivamente (Figs. 2d,e). Los niveles de la SOD1 murina permanecieron sin cambios en respuesta a la inactivación de la SOD1 humana.

Ejemplo 3

El AAV9-SOD1-ARNhc es seguro y bien tolerado en ratones naturales

Para determinar si sería segura una dosis mayor del AAV9-SOD1-ARNhc, ratones normales de ambos sexos recibieron una inyección intravenosa el P1 o el P21 (P1 = 5 machos, 5 hembras a 5×10^{11} vg; P21 = 5 machos, 5 hembras a 2×10^{12} genomas del vector (vg)) y después se monitorizaron hasta los 6 meses de edad. Los ratones que recibieron la inyección tanto el P1 como el P21 mostraron un aumento constante en la masa corporal similar a los ratones sin tratar (Figura S1). En los análisis de comportamiento semanales no se observaron diferencias significativas entre los grupos que recibieron inyecciones y los de control en las habilidades motoras (medidas mediante el cilindro giratorio), así como en la fuerza de agarre de la extremidad posterior. A los 150 y 180 días de edad, se recogieron muestras de sangre. Los hologramas completos y diferenciales de ambos grupos tratados y sin tratar mostraron unos parámetros similares de la bioquímica de la sangre (Figura S2). Las muestras séricas de ambos grupos no mostraron diferencias significativas en los niveles de fosfatasa alcalina, creatinina, nitrógeno ureico en sangre, potasio, sodio y cloruro. Finalmente, todos los animales fueron sacrificados a la edad de 180 días. Los análisis histopatológicos de un histopatólogo desconocedor del grupo de tratamiento no revelaron alteraciones significativas en los animales tratados con AAV9-SOD1-ARNhc en comparación con los controles que no recibieron inyección (datos no mostrados). Concluimos que tanto la administración del AAV9 como la expresión sostenida del ARNhc eran aparentemente seguras y bien toleradas.

Ejemplo 4

Prolongación a la supervivencia de ratones SOD1^{G93A} por una reducción mediada por el AAV9 en la SOD1 mutante incluso cuando se ha iniciado la enfermedad intermedia

Para analizar la eficacia a en la reducción de la SOD1 mediada por el AAV9, tratamos cohortes de ratones

SOD1^{G93A} con una única inyección intravenosa de AAV9-SOD1-ARNhc antes (P1, 5×10^{11} vg, $n = 6$ y P21, 2×10^{12} vg, $n = 9$) o después (P85, 3×10^{12} vg, $n = 5$) del inicio, reconociendo que muchos astrocitos, pero pocas motoneuronas, serían transducidos en los dos últimos puntos temporales. Para las inyecciones en la arena de la cola de los adultos, los animales se colocaron en un corsé que posicionaba la cola del ratón en un canal iluminado caliente. La cola se limpió con algodón con alcohol, y después se le inyectó por vía intravenosa el AAV9-SOD1-ARNhc.

El inicio de la enfermedad (medido por la pérdida de peso debida a la atrofia muscular inducida por la deservación) se retrasó significativamente en una mediana de 39,5 días (Fig. 3a, c; no recibieron inyección, 103d; P1, 142,5d; $p < 0,05$, prueba de Wilcoxon para datos emparejados) en la cohorte que recibió inyección el P1, pero no estaba afectada por ninguna de las últimas inyecciones (P21, 110d; P85, 105d). Los animales tratados el P1 y el P21 mantenían su peso, tenían un mejor comportamiento en el cilindro giratorio y fuerza de agarre de la extremidad posterior cuando se comparaban con los controles emparejados por edades, lo que indica que los animales tratados mantenían el tono muscular y la función motora durante su supervivencia prolongada (Figs. 3f-h). La supervivencia era prolongada significativamente por la inyección de AAV9 en las tres edades, produciendo unos tiempos de supervivencia 30-51,5 días más allá de los ratones SOD1^{G93A} que no recibieron inyección (no recibieron inyección, 132d; P1, 183,5d; P21, 171d; P85, 162d; 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 entre el inicio y la fase final reveló que el grupo de tratamiento P21 tenía una duración significativamente aumentada, indicativa de la ralentización de la progresión de la enfermedad, en comparación con los controles que no recibieron inyección (no recibieron inyección, 29,5d; P21, 49d; prueba de Wilcoxon para datos emparejados $p = 0,01$), con una tendencia a la ralentización de la progresión en los animales que recibieron inyección en las otras dos edades (P1, 41d; P85, 40d; $p = 0,06$ y 0,12, respectivamente) (Fig. 3d). El menor porcentaje de direccionamiento a células no neuronales el P1 con respecto a las direccionadas el P21 (Figura 1u) sugiere que debe direccionarse un número mínimo de células no neuronales para ralentizar la progresión de la enfermedad en el modelo progresivo rápido de SOD1^{G93A} (Fig. 1u).

Ejemplo 5

Reducción de la SOD1 mutante en células infectadas por el AAV9 en ratones SOD1^{G93A} tratados

Se usó una inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo que reconoce la SOD1 humana, pero no la de ratón, para determinar los niveles de SOD1 mutante acumulada en las médulas espinales de la fase final de los ratones tratados y de control. Los niveles de la SOD1 humana en las secciones de médula espinal de la fase final se correlacionan inversamente con el aumento en la supervivencia (Figs. 4a-d). En la fase final, P1 (Fig. 4b), P21 (Fig. 4c) y P85 (Fig. 4d) los animales que recibieron inyecciones de AAV9-SOD1-ARNhc tenían unos niveles menores de la SOD1 mutante cuando se comparaban con los animales SOD1^{G93A} que no recibieron inyección (Fig. 4a). La expresión de la SOD1 en las motoneuronas transducidas (identificadas por las células que expresan la GFP y la ChAT) estaba reducida en comparación con las neuronas circundantes que no habían sido transducidas para expresar la GFP vírica codificada (Figs. 4h, l, p, t; flechas con respecto a puntas de flecha). Además, las imágenes de inmunofluorescencia de las médulas espinales de la fase final revelaron una correspondiente reducción en la astrogliosis, pero ninguna diferencia en la microgliosis en los animales tratados con el AAV9-SOD1-ARNhc con respecto a los controles (Figura S3).

Ejemplo 6

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

Para determinar si la reducción en la SOD1 mutante mediada por el AAV9 ralentizaría la progresión de la enfermedad, una cohorte de ratones SOD1^{G37R} 6 recibió inyecciones intravenosas de AAV9-SOD1-ARNhc después del inicio de la enfermedad (edad promedio en el tratamiento = 215d con respecto al inicio mediano de 197d en los animales tratados; prueba del orden logarítmico $p = 0,46$; Fig. 5a). Los ratones con ELA *loxSOD1*^{G37R}, portadores de un transgen humano mutante SOD1^{G37R} flanqueado por sitios lox p bajo su promotor endógeno, se mantuvieron como se ha descrito previamente³⁷. Como controles se usaron una combinación de hermanos AAV9-CB-GFP ($n = 9$) y que no recibieron inyección ($n = 12$).

El análisis *a posteriori* no mostró diferencias entre los animales GFP y los que no recibieron inyección, por lo tanto, los grupos que se recopilaron como "control" en la Fig. 5. El peso corporal y la fuerza de agarre de la extremidad posterior de los animales se evaluaron semanalmente y se monitorizaron hasta la fase final. El tratamiento con el AAV9-SOD1-ARNhc después del inicio de la enfermedad prolongó significativamente la supervivencia mediana en 86,5 días con respecto a los animales de control (control, $n = 21$, 392d; ARNhc de la SOD1, $n = 25$, 478,5d; prueba del orden logarítmico $p < 0,0001$). La duración de la enfermedad temprana, definida por el tiempo entre el pico de peso y una pérdida de peso del 10 %, disminuyó significativamente (control, 89d; ratones tratados con el ARNhc de la SOD1, 162 días; prueba de Wilcoxon para datos emparejados $p < 0,01$; Fig. 5c). También se observó una continua tendencia hacia la ralentización de la enfermedad tardía (10 % de pérdida de peso hasta la fase final) (control, 63d; ratones tratados con el ARNhc de la SOD1, 81d; prueba de Wilcoxon para datos emparejados $p = 0,1389$; Fig. 5d). La duración global de la enfermedad después de la terapia con el AAV9-SOD1-ARNhc se elevó hasta 239d después del inicio de la enfermedad con respecto a 173d en los ratones de control (prueba de Wilcoxon para datos emparejados $p < 0,0001$; Fig. 5e). De forma coherente con la progresión ralentizada, la terapia con AAV9 mantenía la fuerza de agarre con

respecto a los animales de control mutantes para la SOD1 (Fig. 5g). La extensión de 86,5 días en la supervivencia sobrepasó la extensión de 62 días observada en los estudios transgénicos que usaban la expresión de Cre específica del astrocito para inactivar el transgen⁸ mutante SOD1^{G37R}, reflejando presumiblemente la eficaz transducción del AAV9 de los astrocitos después del suministro periférico y la posible transducción de otros tipos celulares (especialmente la microglía⁶), cuya síntesis de la SOD1 mutante acelera la progresión de la enfermedad.

El análisis histológico de los animales SOD1^{G37R} tratados de fase final reveló unos niveles similares de transducción celular intraespinal en los animales tratados con AAV9-SOD1-ARNhc o con AAV9-GFP (Figura 6). La expresión de la GFP se observó predominantemente en las motoneuronas y los astrocitos de ambos grupos, y la expresión de la SOD1 disminuyó de una forma detectable únicamente en los animales que recibieron el AAV9-SOD1-ARNhc (Figs. 6k, o). La inmunotransferencia de extractos de médula espinal completa de los ratones SOD1^{G37R} de fase final reveló una reducción del 80 % en los niveles de la proteína hSOD1 en los animales tratados con el AAV9-SOD1-ARNhc en comparación con los controles (Figura S4).

Ejemplo 7

Supresión mediada por el AAV9 de la SOD1 en primates no humanos

Para analizar si los niveles de la SOD1 podrían ser eficazmente reducidos usando el AAV9 en la médula espinal de un primate no humano, se inyectó el AAV9 por vía intratecal a través de una punción lumbar. Se eligió este método con respecto al suministro sistémico para disminuir la cantidad de virus necesaria y para minimizar cualquier efecto por la reducción de la SOD1 en tejidos periféricos. Para este estudio se usaron macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) de un año de edad con un peso corporal promedio de 2 kg en la Mannheimer Foundation. La monitorización regular de la salud general y el peso corporal se realizó antes y después de las inyecciones para evaluar el bienestar de los animales.

La secuenciación del ADNc copiado del ARNm aislado a partir del cercopiteco verde (células COS) y del macaco cangrejero verificó que el 130 ARNhc tenía un único emparejamiento incorrecto de base con cualquiera de las secuencias (Figura S5). El casete de expresión del 130 ARNhc se insertó en un vector lentivírico que después se usó para transducir las células COS. Las células Cos-7 se mantuvieron en DMEM con un 10 % de FBS y un 1 % de penicilina/estreptomina. Las células se infectaron con un vector lentivírico que expresa el ARNhc 130 de la SOD1 bajo el promotor H1 y RFP bajo el promotor CMV. Se extrajo el ARN de células infectadas y no infectadas 72 horas después de la infección usando un RNAeasy Kit (Qiagen). El ADNc se preparó usando un kit de síntesis de primera hebra RT² (SABiosciences). Los niveles de transcrito de la SOD1 se analizaron mediante una qRT-PCR, lo que reveló que el ARNm de la SOD1 se redujo en un ~75 % en las células transducidas con el 130 ARNhc en comparación con las células de control con una transducción simulada (Figura S5).

Se infundió el virus AAV9-SOD1-ARNhc (1×10^{13} vg/kg) junto con un 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-CB-GFP (1×10^{13} vg/kg) (Fig. 7a). Cada inyección intratecal se realizó mediante una punción lumbar en el espacio subaracnoideo del saco tecal lumbar. El AAV9 se resuspendió en omnipaque (iohexol), un compuesto yodado usado habitualmente en el ámbito clínico. El iohexol se usa para validar la canulación con éxito del espacio subaracnoideo, y se administró a una dosis de 100 mg/kg. El sujeto se colocó en decúbito lateral y se identificó el sitio de inyección en la línea media posterior a nivel de ~L4/5 (por debajo del cono de la médula espinal). En condiciones estériles se insertó una aguja espinal con estilete, y la canulación subaracnoidea se confirmó por el flujo del LCR transparente desde la aguja. Con objeto de reducir la presión en el espacio subaracnoideo, se drenaron 0,8 ml de LCR, seguido inmediatamente por la inyección de una mezcla que contiene 0,7 ml de iohexol (formulación de 300 mg/ml) mezclado con 2,1 ml de virus (2,8 ml en total).

No se identificaron efectos secundarios por los tratamientos. Dos semanas después de la inyección, las médulas espinales se recolectaron para el análisis de la expresión de la GFP y los niveles de ARN de la SOD1. La expresión de la GFP se observó ampliamente en las células neuronales y astrocíticas por toda la sustancia gris y blanca de la médula espinal lumbar, el área más próxima al lugar de la inyección (Figs. 7b-e). La inmunotransferencia de extractos de la médula espinal lumbar reveló una reducción del 87 % en los niveles de la proteína SOD1 de mono (Figs. 7f, g). Después se usó una microdissección de captura con láser para aislar el ARN total de las motoneuronas así como de la glía en los neuropilos circundantes. El análisis mediante una RT-PCR cuantitativa usando cebadores específicos para la SOD1 de mono (y normalizada a la actina) confirmaron una inactivación del 95 ± 3 % en el grupo de motoneuronas y una inactivación del 66 ± 9 % en el grupo de neuropilos cuando se comparaban con las muestras de un animal de control (Fig 7h).

A continuación, analizamos el nivel de transducción celular en toda la médula espinal, incluyendo segmentos cervicales, torácicos y lumbares. Se averiguó que la GFP era ampliamente expresada en todas las secciones analizadas (Figs. 8a-c). Los recuentos de motoneuronas revelaron un gradiente de caudal a rostral en la transducción celular, mostrando la región cervical más de un 50 % de motoneuronas GFP/Chat+, aumentando hasta un 65 % en la región torácica y alcanzando un notable 80 % en la región lumbar (Fig 8d). Con objeto de determinar el nivel global de inactivación de la SOD1 conseguido con este patrón de transducción, se realizó una qRT-PCR para la SOD1 en

homogeneizados de secciones completas de segmentos medulares cervicales, torácicos y lumbares. Los resultados confirmaron una robusta reducción de la SOD1 en los tres niveles de la médula espinal, que variaban desde 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), coherentes con la proporción de células transducidas en cada región.

5 Debate

Los ejemplos anteriores muestran que la administración intravenosa de AAV9-SOD1-ARNhc es segura y bien tolerada en ratones naturales, con ausencia de efectos adversos después de una valoración a largo plazo. Esta estrategia ha conseguido una de las prolongaciones más largas en la supervivencia jamás notificada para el modelo de ratón SOD1^{G93A} de progresión rápida de ELA (aumentando la supervivencia en un 39 % cuando el tratamiento se inicia al nacer). Incluso más esperanzador, se observa una progresión de la enfermedad notablemente ralentizada incluso cuando la terapia con el AAV9 para reducir la síntesis de la SOD1 mutante se aplica después del inicio de la enfermedad en ratones SOD1^{G37R}, prolongando por tanto significativamente la supervivencia. Por lo tanto, el paradigma de suministro vascular en ratones representa una validación de que la inactivación de la SOD1 mutante después del inicio de la enfermedad puede ser beneficiosa en ambos modelos de progresión rápida y más lenta de ELA en puntos clínicamente relevantes de la enfermedad. En conjunto, estos datos muestran que el robusto direccionamiento y supresión de los niveles de la SOD1 a través del suministro de ARNhc mediado por el AAV9 es eficaz en la ralentización de la progresión de la enfermedad en modelos de ratón de ELA, críticamente incluso cuando el tratamiento comienza después del inicio.

Múltiples estudios recientes han adelantado la hipótesis de que la SOD1 natural puede contribuir a través de un mal plegamiento al (los) mecanismo(s) patógeno(s) que subyace(n) en la ELA esporádica a través de una ruta similar a la desencadenada por la SOD1¹⁴³⁰⁻³² mutante. En este conjunto de datos se incluyen nuestra propia demostración de que los astrocitos producidos a partir de pacientes con ELA esporádica son tóxicos para las cocultivadas motoneuronas, y que la toxicidad es aliviada por la reducción mediada por un ARNip en la SOD1³⁰ natural. Estos datos crean la posibilidad de que una proporción de pacientes con ELA esporádica también podría beneficiarse de una estrategia de reducción en la SOD1 mediada por el AAV9 que hemos demostrado que es eficaz para ralentizar la progresión de la enfermedad en ratones que desarrollan una enfermedad mortal de tipo ELA al expresar las mutaciones en la SOD1 que causan la ELA.

Finalmente, para la traducción de una supresión mediada por el AAV9 de la síntesis de la SOD1 al entorno humano, hemos determinado que la infusión directa en el LCR a nivel lumbar en un primate no humano produce una reducción sustancial de la SOD1 mediante un direccionamiento tanto a motoneuronas como a células no neuronales. Este resultado proporciona un fuerte respaldo para ampliar estos esfuerzos a un adulto humano mediante la inyección directa en el LCR, como se ha propuesto previamente^{33,34}, de forma que 1) se limite el coste de la producción vírica, 2) se reduzca la posibilidad de que la supresión crónica de la SOD1 en la periferia pueda tener consecuencias perjudiciales, y 3) se reduzca la exposición vírica al sistema inmunitario periférico³³. Estos datos señalan fuertemente al AAV9-SOD1-ARNhc como un tratamiento para la ELA.

40 Técnicas/métodos usados en los ejemplos 1-7

Perfusión y procesamiento de tejidos. Los ratones SOD1^{G93A} de control y tratados se sacrificaron bien 21 días después de la inyección o bien en la fase final, para un análisis inmunohistoquímico. Los animales se anestesiaron con un cóctel de xilacina/ketamina, se perfundieron transcardiacamente con solución salina al 0,9 %, seguido de paraformaldehído al 4 %. Se recogieron las médulas espinales, se cortaron en bloques de tejido de 5-6 mm de longitud, y después se cortaron en secciones transversales de 40 µm de grosor con un vibratomo (Leica, Bannockburn, IL). Las sucesivas secciones se conservaron en una placa de 96 pocillos que contenía paraformaldehído al 4 % y se almacenaron a 4 °C. Los ratones *loxSOD1*^{G37R} en la fase final se anestesiaron usando isoflurano y se perfundieron con paraformaldehído al 4 %. Se diseccionaron segmentos de la médula espinal, incluyendo segmentos cervicales, torácicos y lumbares. Después de una crioprotección con sacarosa al 20 %/paraformaldehído al 4 % hasta el día siguiente, las médulas espinales se congelaron en isopentano a -65 °C, y se recolectaron cortes frontales sucesivos de 30 µm en flotación libre usando un microtomo deslizante.

Para los estudios de seguridad, los ratones P1, P21 tratados y naturales de control se sacrificaron a los 180 días de edad. Los animales se anestesiaron usando un cóctel de xilacina/ketamina y se perfundieron con solución salina al 0,9 %. Se extrajeron los diferentes tejidos y se conservaron en formalina tamponada al 10 %. Estos tejidos se procesaron adicionalmente, se bloquearon y se montaron para una tinción con hematoxilina y eosina por parte del Nationwide Children's Hospital Morphology Core.

Los macacos cangrejeros que recibieron inyección de virus se sacrificaron 2 semanas después de la inyección. Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico a la dosis de 80 - 100 mg/kg por vía intravenosa y fueron perfundidos con solución salina. La disección del cerebro y la médula espinal se realizó inmediatamente, y los tejidos se procesaron adicionalmente para el aislamiento de los ácidos nucleicos (congelación instantánea) o se posfijaron en paraformaldehído al 4 % y posteriormente se crioprotegieron con sacarosa al 30 % y se congelaron en isopentano a -65 °C. Se recolectaron cortes frontales de 12 µm de la médula lumbar usando un criostato para la inmunotinción de

flotación libre.

Immunohistoquímica. Las médulas espinales de los ratones se tiñeron en forma de secciones en flotación. Los tejidos se lavaron tres veces durante 10 minutos cada una con TBS, después se bloquearon con una solución que contiene suero de burro al 10 %, Triton X-100 al 1 % y penicilina/estreptomina al 1 % durante dos horas a la temperatura ambiente. Todos los anticuerpos se diluyeron con la solución de bloqueo. Los anticuerpos primarios usados eran como sigue: 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, después se lavaron tres veces con TBS. Después del lavado, los tejidos se incubaron durante 2 horas a la temperatura ambiente en los apropiados anticuerpos secundarios conjugados con FITC-, Cy3- o Cy5 (1:200 Jackson Immunoresearch, Westgrove, PA) y DAPI (1:1.000, Invitrogen, Carlsbad, CA). Después, los tejidos se lavaron tres veces con TBS, se montaron en portaobjetos y se cubrieron con PVA-DABCO. Todas las imágenes se capturaron con un microscopio confocal de barrido por láser Zeiss.

Para la tinción DAB, las secciones de médula espinal de mono se lavaron tres veces con TBS, se bloquearon durante 2 h a la TA en suero de burro al 10 % y Triton X-100 al 1 %. Después, las secciones se incubaron hasta el día siguiente a 4 °C con anticuerpo primario anti-GFP de conejo (1:1.000 Invitrogen, Carlsbad, CA) diluido en tampón de bloqueo. Al día siguiente, los tejidos se lavaron 3 veces con TBS, se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (1:200 Jackson Immunoresearch, Westgrove, PA) en tampón de bloqueo durante 30 min a la TA, se lavaron 3 veces con TBS y se incubaron durante 30 min a la TA con ABC (Vector, Burlingame, CA). Después, las secciones se lavaron 3 veces con TBS y se incubaron durante 2 min con solución DAB a la TA y se lavaron con agua destilada. Éstas se montaron después en portaobjetos y se cubrieron con cubreobjetos en medio de montaje. Todas las imágenes se capturaron con el Zeiss Axioscope.

Cuantificación de las motoneuronas y los astrocitos. Para la cuantificación de las MN, las secciones sucesivas de médula espinal lumbar de 40 µm de grosor, separadas entre sí 480 µm, se marcaron como se describió para la expresión de la GFP y de la ChAT. Las secciones teñidas se montaron sucesivamente en portaobjetos de rostral a caudal, después se cubrieron. Las secciones se evaluaron usando microscopía confocal (Zeiss) con un objetivo 40x y FITC simultáneo y filtros Cy3. El número total de células positivas para ChAT encontrado en las astas anteriores con un soma definido se contó mediante un análisis cuidadoso a lo largo de la totalidad de la magnitud z de la sección. Las células marcadas con GFP se cuantificaron de la misma forma, comprobando la colocalización con la ChAT. Para la cuantificación de los astrocitos, al igual que de las MN, las secciones sucesivas se tiñeron para la GFP, la GFAP y después se montaron. Usando microscopía confocal con un objetivo 63x y FITC simultáneo y filtros Cy5, se seleccionaron campos aleatorios en las astas anteriores de las secciones de médula espinal lumbar de los animales que recibieron inyecciones en la vena de la cola. Las cifras totales de células positivas para GFP y para GFAP se contaron a partir de un mínimo de al menos 24 campos por animal con un enfoque a lo largo de la totalidad de la magnitud z de la sección. Se analizaron secciones de médula espinal de 3 animales por grupo para la cuantificación de las MN y de los astrocitos.

Análisis de inmunotransferencia. Se recogieron las médulas espinales de ratones que recibieron inyecciones el P1, el P21 y SOD1^{G93A} de control 21 días después de la inyección, y de monos tratados y de control 2 semanas después de la inyección del AAV9-SOD1-ARNhc. Se homogeneizaron las médulas espinales y se prepararon lisados de proteínas usando T-Per (Pierce) con cóctel inhibidor de la proteasa. Las muestras se resolvieron con una SDS-PAGE según las instrucciones del fabricante. Se usaron anticuerpos primarios anti-SOD1 de conejo (1:750, Cell signaling, Danvers, MA) anti-SOD1 de ratón (1:750, Millipore, Billerica, MA), anti-SOD1 de conejo (1:1.000, Abcam, Cambridge, MA), anti-actina de conejo (1:1.000, Abcam, Cambridge, MA) y anti-GAPDH de ratón (1:1.000, Millipore, Billerica, MA). Los anticuerpos secundarios usados eran anti-HRP de conejo (1:10.000-1:50.000) y anti-HRP de ratón (1:10.000). El análisis densitométrico se realizó usando el programa informático Image J.

Microdissección de captura con láser. Se recolectaron secciones congeladas de médula espinal lumbar 12hm en portaobjetos de membrana PEN (Zeiss, Munich, Alemania) y se tiñeron con violeta de cresilo al 1 % (Sigma, St. Louis, MO) en metanol. Las secciones se secaron al aire y se conservaron a -80 °C. Después de la descongelación, las motoneuronas se recolectaron en 30 min desde la tinción usando un microdisector de captura con láser PALM Robo3 Zeiss usando los siguientes ajustes: energía de corte: 48, energía de LPC: 20, foco de corte: 80/81, foco de LPC: 1, velocidad de posición: 100, velocidad de corte: 50. Se recolectaron aproximadamente 500 MN por animal. Las células no neuronales de las astas anteriores se recolectaron desde las mismas secciones después de la recolección de las motoneuronas.

qRT-PCR. Se aisló el ARN de las células capturadas con láser o de las secciones de médula espinal completa a partir de los segmentos cervical, torácico y lumbar, usando el RNeasy Micro Kit (Ambion, Grand Island, NY) según las instrucciones del fabricante. Después, el ARN se retrotranscribió en ADNc usando el RT² HT First Strand Kit (SABiosciences, Valencia, CA). Se usaron 12,5 ng de ARN en cada reacción de Q-PCR usando SyBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA) para establecer la cantidad relativa del transcrito endógeno de la SOD1 de mono en los animales que habían recibido el AAV9-SOD1-ARNhc en comparación con los animales que habían recibido únicamente el AAV9-GFP. Cada muestra se analizó por triplicado y se calculó la concentración relativa usando los

valores de ddCt normalizados al transcrito endógeno de la actina.

Análisis del comportamiento y de la supervivencia. Los cambios en la masa corporal de los ratones SOD1^{G93A} tratados y de control se monitorizaron dos veces por semana. Los ratones *loxSOD1^{G37R}* se pesaron semanalmente. La coordinación motora se registró usando un instrumento de cilindro giratorio (Columbus Instruments, Columbus, OH). Cada sesión semanal consistía en tres pruebas en el cilindro giratorio en aceleración, comenzando a 5 rpm/min. Se registró el tiempo que permanecía cada ratón en el rodillo. Tanto los ratones SOD1^{G93A} como los *loxSOD1^{G37R}* se sometieron a una evaluación semanal de la fuerza de agarre de las extremidades posteriores usando un medidor de la fuerza de agarre (Columbus Instruments, Columbus, OH). Cada sesión semanal consistía en 3 (ratones SOD1^{G93A}) o 5 (ratones *loxSOD1^{G37R}*) análisis por animal. El análisis de supervivencia se realizó usando un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. La fase final se definió como un punto de muerte artificial, cuando los animales ya no podían "darse la vuelta" por sí mismos 30 s después de haber sido colocados 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 a la cual el animal alcanza su peso máximo. La duración de la enfermedad se define como el periodo de tiempo entre el inicio de la enfermedad y la fase final. La duración de la enfermedad temprana es el periodo entre el peso máximo y la pérdida de un 10 % de peso corporal, mientras que la duración de la enfermedad tardía se define como el periodo entre la pérdida de un 10 % de peso corporal hasta la fase final de la enfermedad. Debido a la esperanza de vida más corta de los animales SOD1^{G93A}, no evaluamos la distinción entre la progresión temprana y tardía.

Para los análisis de toxicidad después de la inyección el P1 o el P21, los ratones tratados y los naturales de control se sometieron a un análisis de comportamiento comenzando a los -30 días de edad y monitorizado hasta los 6 meses. La masa corporal se registró semanalmente, mientras que el comportamiento en el cilindro giratorio y la fuerza de agarre de las extremidades posteriores se registraron cada dos semanas.

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

Análisis estadístico. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete informático GraphPad Prism (San Diego, CA). Los análisis de supervivencia de Kaplan Meier se analizaron mediante la prueba del orden logarítmico. Las comparaciones entre las duraciones medianas de la enfermedad y los tiempos de supervivencia se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon para datos emparejados.

Ejemplo 8

Desarrollo de una construcción clínica de ARNhc de la SOD1

El vector del ARNhc de la SOD1 del AAV descrito en el Ejemplo 2 porta el ARNhc contra la secuencia de la SOD1 humana bajo el promotor H1 promotor (Figura 9a). El mismo vector también contiene un casete de expresión de la GFP que expresa la GFP bajo un promotor de la CBA. Los demás elementos reguladores presentes en este casete incluyen el potenciador del CMV, el intrón del SV40 y una secuencia de terminación de PoliA de la bGH. En el presente documento demostramos que la administración del ARNhc de la SOD1 del AAV9 da como resultado una eficaz regulación por disminución de la SOD1, junto con una robusta expresión de la GFP *in vitro* así como en *in vivo*. No se observaron alteraciones significativas después de la evaluación a largo plazo de los ratones naturales que recibieron el AAV9 con el ARNhc de la SOD1. Estos resultados sugirieron que no hay efectos inespecíficos evidentes debido a la expresión a largo plazo del ARNhc de la SOD1, así como de la sobreexpresión de la GFP. Aunque no encontramos toxicidad por la GFP en nuestros ratones, numerosos informes han mostrado los efectos adversos de la sobreexpresión de la GFP *in vitro* e *in vivo*. Por lo tanto, para eliminar completamente la posibilidad de toxicidad por la GFP, la construcción de ARNhc de la SOD1 del Ejemplo 2 se modificó sustituyendo el casete de expresión de la GFP por una secuencia de relleno no codificante manteniendo el tamaño total de la construcción de ADN flanqueada por las ITR (Figura 9b). Esto es importante, ya que la distancia entre las dos secuencias de ITR afecta en gran medida a la capacidad de empaquetamiento de la construcción flanqueada en las cápsidas del AAV9 [321-324].

Hasta ahora, ninguna de las secuencias de relleno aprobadas por la FDA están fácilmente disponibles. Hay, sin embargo, varios esqueletos de plásmido que están aprobados por la FDA para su administración a seres humanos. Se escogieron pequeños fragmentos de ADN de estos plásmidos que no se corresponden con ninguna secuencia de ADN esencial necesaria para la selección y la replicación del plásmido o de los elementos de las unidades de transcripción. Los esqueletos de plásmido se indican en la Tabla 1. Los elementos del ADN de diferentes plásmidos se dispusieron en tándem para generar una secuencia de relleno completa de 1.607 pb (SEQ ID NO: 22). Finalmente, se sintetizó una construcción de ADN que contiene el casete de expresión del ARNhc de la SOD1, seguida por la secuencia de relleno, en Genscript.

Tabla 1

Esqueleto de plásmido	Afección	Tratamiento	Fase	Identificador estatal de ensayos clínicos
pVax1	Cáncer de pulmón no microcítico en fase temprana	DNA-pVAX/1523S recombinante	1	NCT00062907
pCDNA3	Hepatitis B crónica	Vacuna de ADN pCMVS2.S	1,2	NCT00536627
pUCMV3	Cáncer epitelial ovárico en fase III Tumor de células germinales ováricas en fase III Cáncer epitelial ovárico en fase IV Tumor de células germinales ováricas en fase IV	Vacuna de ADN del plásmido multiepitopo pUMVC3-HIGFBP-2	1	NCT01322802
pBK-CMV	Cáncer de próstata Cáncer de vejiga Cáncer de pulmón no microcítico Cáncer de esófago Sarcoma	Vacuna oncológica de ADN del plásmido NY-ESO-1	1	NCT00199849
pGA2	Infecciones por VIH	Vacuna de ADN del plásmido pGA2/JS2	1	NCT00043511

La construcción clínica de ARNhc de la SOD1 tiene ARNhc contra la SOD1 humana bajo el promotor H1 que está seguido por la secuencia de relleno no codificante. Esta construcción está diseñada de tal forma que pueden añadirse múltiples casetes de expresión del ARNhc al vector final mediante la eliminación simultánea de la secuencia de relleno. Se han añadido sitios de endonucleasa de restricción a la secuencia de relleno, de forma que parte del relleno pueda ser eliminado cuando se añada otro casete de expresión de ARNhc (Figura 10). Esta eliminación y adición simultánea de secuencias de ADN ayudaría a mantener el tamaño óptimo de la construcción completa entre las ITR (~2,0 kb) para conseguir un empaquetamiento eficaz.

La construcción clínica de ARNhc de la SOD1 de Genscript se clonó en el vector lanzadera pJet1.2 a través de EcoRV. Este clon parental se cribó usando diversas endonucleasas de restricción diseñadas en la construcción para confirmar el clon correcto. La doble digestión con Kpn1/Sph1 del pJet del ARNhc de la SOD1 confirmó la presencia de la construcción completa (2.023 pb), mientras que la digestión con XbaI confirmó la presencia del casete de expresión de la ARNhc de la SOD1 (414 pb) y del elemento de relleno, junto con el esqueleto del pJet (~3.000 pb). La doble digestión con EcoRV/Pme1 también reveló la presencia del elemento de relleno.

Ejemplo 9

El ARNhc de la SOD1 clínico reduce eficazmente los niveles de la proteína SOD1 humana *in vitro*

Para determinar la eficacia de la construcción del ARNhc de la SOD1 sintetizada *de novo* para regular por disminución los niveles de la SOD1, se transfectaron células HEK 293 con el plásmido pJet del ARNhc de la SOD1 usando el método del fosfato de calcio. El plásmido del ARNhc de la SOD1 del AAV se usó como control positivo. El análisis de inmunofluorescencia de las células HEK 293, 72 h después de la transfección, reveló la ausencia de fluorescencia de la GFP nativa de las células transfectadas con el pJet del ARNhc de la SOD1 en comparación con las células transfectadas con el ARNhc de la SOD1 del AAV9. El análisis de inmunotransferencia de los lisados celulares de estas células confirmaron adicionalmente la sustitución con éxito de la GFP desde el plásmido pJet del ARNhc de la SOD1. De manera importante, el pJet del ARNhc de la SOD1 dio como resultado una eficaz regulación por disminución de los niveles de la proteína SOD1 (> 50 %), similar al plásmido de ARNhc de la SOD1 del AAV. Véase la Figura 11.

Ejemplo 10

Generación del ARNhc de la SOD1 del AAV clínico

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

El plásmido del ARNhc de la SOD1 del AAV clínico se cribó con endonucleasas de restricción para confirmar la presencia del casete de expresión del ARNhc de la SOD1 (digerido de XbaI), la secuencia de relleno (doble digerido

de EcoRV/Pme1) y también las secuencias ITR intactas (digerido de Sma1).

Ejemplo 11

5 El ARNhc de la SOD1 del AAV clínico reduce eficazmente los niveles de la proteína SOD1 humana *in vitro*

El plásmido del ARNhc de la SOD1 del AAV clínico se transfectó en células HEK 293 para determinar su eficacia de inactivación. De forma similar al plásmido pJet del ARNhc de la SOD1, las células transfectadas con el ARNhc de la SOD1 del AAV clínico estaban desprovistas de cualquier expresión de la GFP, como se hizo evidente mediante el ensayo de inmunofluorescencia (Figura 13a-f) y de inmunotransferencia (Figura 13g). Más importante aún, el ARNhc de la SOD1 del AAV clínico redujo eficazmente los niveles de la proteína SOD1 humana en células HEK 293 en más del 50 % (Figura 13g, h). En conjunto, estos resultados confirmaron la generación satisfactoria del vector del ARNhc de la SOD1 del AAV clínico con un casete de expresión funcional del ARNhc de la SOD1 y la completa eliminación del casete de expresión del transgen.

15

Documentos referenciados

1. Da Cruz, S. & 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. & 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. & 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. & 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. & 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. & 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. & 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).
- 5 19. Duque, S. et al. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther* 17, 1187-1196 (2009).
- 10 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. & Moore, D.H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev* 3, CD001447 (2012).
- 15 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).
- 20 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 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).
- 30 27. Towne, C., Raoul, C., Schneider, B.L. & 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).
- 35 28. Towne, C., Setola, V., Schneider, B.L. & 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).
- 40 29. Mandel, R.J., Lowenstein, P.R. & 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).
- 45 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 U S A* 109, 5074-5079 (2012).
- 50 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).
- 55 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).
- 60 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 U S A* 105, 7594-7599 (2008).
- 65

ES 2 799 437 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Nationwide Children's Hospital Ludwig Institute for Cancer Research Kaspar, et al.	
5	<120> PRODUCTOS Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA	
	<130> 28335/47886PCT	
	<150> US 61/870585	
10	<151> 27-08-2013	
	<160> 22	
	<170> PatentIn versión 3.5	
15	<210> 1	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 1	
25	gcatcatcaa ttcgagcag aaggaa	26
	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 2	
35	gaagcattaa aggactgact gaa	23
	<210> 3	
	<211> 23	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
45	<400> 3	
	ctgactgaag gcctgcatgg att	23
	<210> 4	
50	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 4	
	catggattcc atgtcatga	20
60	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Polinucleótido sintético	

	<400> 5 gcatggattc catgttcag a	21
5	<210> 6 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 6 ggtctggcct ataaagtagt c	21
15	<210> 7 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 7 gggcatcatc aatttcgagc a	21
25	<210> 8 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 8 gcatcatcaa ttgcgagcag a	21
40	<210> 9 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
45	<400> 9 gcctgcatgg attccatggt c	21
50	<210> 10 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
55	<400> 10 ggaggtctgg cctataaagt a	21
60	<210> 11 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Polinucleótido sintético	

	<400> 11 gattccatgt tcatgagttt g	21
5	<210> 12 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 12 ggagataata cagcaggctg t	21
15	<210> 13 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Polinucleótido sintético	
25	<400> 13 gctttaaagt acctgtagtg a	21
30	<210> 14 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
35	<400> 14 gcattaaagg actgactgaa g	21
40	<210> 15 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
45	<400> 15 tcatcaattt cgagcagaa	19
50	<210> 16 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Polinucleótido sintético	
55	<400> 16 tcgagcagaa ggaaagtaa	19
60	<210> 17 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Polinucleótido sintético	

ES 2 799 437 T3

	<400> 17 gcctgcatgg attccatgt	19
5	<210> 18 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 18 tcactctcag gagaccatt	19
15	<210> 19 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 19 gctttaaagt acctgtagt	19
25	<210> 20 <211> 5786 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Polinucleótido sintético	
35	<400> 20	

ES 2 799 437 T3

gcccaatacg caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctgattct 60
 aacgaggaaa gcacgttata cgtgctcgtc aaagcaacca tagtacgcgc cctgtagcgg 120
 cgcattaagc gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc 180
 cctagcgcgc gtccttttcg ctttcttccc ttcttttctc gccacgttcg ccggctttcc 240
 ccgtcaagct ctaaatacggg ggctcccttt agggttccga tttagtgtt tacggcacct 300
 cgaccccaaa aaacttgatt agggatgatg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac 360
 ggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac 420
 tggacaaca ctcaacccta tctcggctta ttcttttgat ttataagga ttttgccgat 480
 ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaa ttaacgcga attttaacaa 540
 aatattaacg cttacaattt aaatatttgc ttatacaatc ttctgtttt tggggctttt 600
 ctgattatca accggggtac atatgattga catgctagtt ttacgattac cgttcatcgc 660
 cctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc gggcgacctt 720
 tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgcgc gcgcagagag ggagtggaat tcacgcgtgg 780
 atctgaattc aattcacgcg tggtaacctac actttatgct tccggctcgt atgttgtgtg 840
 gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc 900
 tttccaaaaa agcatggatt ccatgttcat gatctcttga atcatgaaca tggaatccat 960
 ggatccgagt ggtctcatac agaacttata agattcccaa atccaaagac atttcacgtt 1020
 tatggtgatt tcccagaaca catagcgaca tgcaaataatg aattcactgg ccgtcgtttt 1080
 acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgccttg cagcacatcc 1140
 ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc gatcgcctt cccaacagtt 1200
 gcgcagcctg tggtaacctc ggtcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga 1260
 ccgcccacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca 1320
 atagggactt tcattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccaactggca 1380
 gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtac cccctattg acgtcaatga cggtaaatgg 1440
 cccgctggc attatgcca gtacatgacc ttatgggact ttctacttg gcagtacatc 1500
 tactcgaggc cacgttctgc ttcactctcc ccatctccc cccctccca ccccaattt 1560
 tgtatttatt tattttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg gggggggggc 1620
 gcgcgccagg cggggcgggg cggggcgagg ggcggggcgg ggcgaggcgg agaggtgcgg 1680
 cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttccttt tatggcgagg cggcggcggc 1740
 ggcggcccta taaaaagcga agcgcgcggc gggcgggagc gggatcagcc accgcggtgg 1800

ES 2 799 437 T3

cggcctagag tcgacgagga actgaaaaac cagaaagtta actggtaagt ttagtctttt 1860
 tgtcttttat ttcaggtccc ggatccggtg gtggtgcaaa tcaaagaact gtcctcagt 1920
 ggatgttgcc tttacttcta ggctgtacg gaagtgttac ttctgctcta aaagctgagg 1980
 aattgtaccg gcggccgatc caccggtcgc caccatggtg agcaagggcg aggagctggt 2040
 caccggggtg gtgccatcc tggtcgagct ggacggcgac gtaaaccggcc acaagttcag 2100
 cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga agttcatctg 2160
 caccaccggc aagctgcccg tgccctggcc caccctcgtg accaccctga cctaccggcgt 2220
 gcagtgcttc agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgccat 2280
 gcccgaaagg tacgtccagg agcgcaccat cttcttcaag gacgacggca actacaagac 2340
 ccgcccggag gtgaagttcg agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc tgaagggcat 2400
 cgacttcaag gaggaaggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acaacagcca 2460
 caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact tcaagatccg 2520
 ccacaacatc gaggaaggca gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga acacccccat 2580
 cggcgacggc cccgtgctgc tgcccgaaa ccaactacct agcaccctgt ccgccctgag 2640
 caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagttcgtga ccgccgccgg 2700
 gatcactctc ggcatggacg agctgtacaa gtaaagcggc catcaagctt atcgataccg 2760
 tcgactagag ctcgctgatc agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc atctgttggt 2820
 tgcccctccc ccgtgccttc cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa 2880
 taaaatgagg aaattgcatc gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg 2940
 gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggagaga 3000
 tcgatctgag gaaccctag tgatggagtt ggccaactccc tctctgcgcg ctcgctcgct 3060
 cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt 3120
 gagcgagcga gcgcgagag agggagtggc ccccccccc ccccccccg cgattctctt 3180
 gtttgcctca gactctcagg caatgacctg atagcctttg tagagacctc tcaaaaatag 3240
 ctaccctctc cggcatgaat ttatcagcta gaacggttga atatcatatt gatggtgatt 3300
 tgactgtctc cggcctttct caccgtttg aatctttacc tacacattac tcaggcattg 3360
 catttaaaat atatgagggt tctaaaaatt tttatccttg cgttgaaata aaggcttctc 3420
 ccgcaaaagt attacagggt cataatgttt ttggtacaac cgatttagct ttatgctctg 3480
 aggctttatt gcttaatfff gctaattctt tgccttgctt gtatgattta ttggatgttg 3540
 gaatcgctg atgcggtatt ttctccttac gcactctgtgc ggtatttcac accgcatatg 3600
 gtgcaactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc gacaccggcc 3660
 aacaccggct gacgcccctt gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc 3720

ES 2 799 437 T3

tgtgaccgct	tccgggagct	gcatgtgtca	gaggttttca	cogtcatcac	cgaaacgogc	3780
gagacgaaag	ggcctcgtga	tacgcctatt	tttataggtt	aatgtcatga	taataatggt	3840
ttcttagacg	tcaggtggca	cttttcgggg	aaatgtgogc	ggaaccccta	tttgtttatt	3900
tttctaaata	cattcaaata	tgtatccgct	catgagacaa	taaccctgat	aaatgcttca	3960
ataatattga	aaaaggaaga	gtatgagtat	tcaacatttc	cgtgtcgccc	ttattccctt	4020
ttttgcggca	ttttgccttc	ctgtttttgc	tcaccagaaa	acgctggtga	aagtaaaaga	4080
tgctgaagat	cagttgggtg	cacgagtggg	ttacatcgaa	ctggatctca	acagcggtaa	4140
gatccttgag	agttttcgcc	ccgaagaacg	ttttccaatg	atgagcactt	ttaaagttct	4200
gctatgtggc	gcggtattat	cccgtattga	cgccgggcaa	gagcaactcg	gtcgccgcat	4260
acactattct	cagaatgact	tggttgagta	ctcaccagtc	acagaaaagc	atcttacgga	4320
tggcatgaca	gtaagagaat	tatgcagtgc	tgccataacc	atgagtgata	acactgcggc	4380
caacttactt	ctgacaacga	tcggaggacc	gaaggagcta	accgcttttt	tgcaacaacat	4440
gggggatcat	gtaactcgcc	ttgatcgttg	ggaaccggag	ctgaatgaag	ccataccaaa	4500
cgacgagcgt	gacaccacga	tgctgtagc	aatggcaaca	acgttgcgca	aactattaac	4560
tggcgaacta	cttactctag	cttcccggca	acaattaata	gactggatgg	aggcggataa	4620
agttgcagga	ccacttctgc	gctcggccct	tccggctggc	tggtttattg	ctgataaatc	4680
tggagccggt	gagcgtgggt	ctcgcggtat	cattgcagca	ctggggccag	atggtaaacc	4740
ctcccgtatc	gtagttatct	acacgacggg	gagtcaggca	actatggatg	aacgaaatag	4800
acagatcgct	gagataggtg	cctcactgat	taagcattgg	taactgtcag	accaagttta	4860
ctcatatata	ctttagattg	atttaaaact	tcatttttaa	tttaaaggga	tctaggtgaa	4920
gatccttttt	gataatctca	tgacccaaaat	cccttaacgt	gagttttcgt	tccactgagc	4980
gtcagacccc	gtagaaaaga	tcaaaggatc	ttcttgagat	cctttttttc	tgogcgtaat	5040
ctgctgcttg	caaacaaaaa	aaccaccgct	accagcgggtg	gtttgtttgc	cggatcaaga	5100
gctaccaact	ctttttccga	aggtaactgg	cttcagcaga	gcgagatac	caaatactgt	5160
ccttctagtg	tagccgtagt	taggccacca	cttcaagaac	tctgtagcac	cgctacata	5220
cctcgctctg	ctaatacctgt	taccagtggc	tgctgccagt	ggcgataagt	cgtgtcttac	5280
cgggttgac	tcaagacgat	agttaccgga	taaggcgcag	cggtcgggct	gaacgggggg	5340
ttcgtgcaca	cagcccagct	tggagcgaac	gacctacacc	gaactgagat	acctacagcg	5400
tgagctatga	gaaagcgcca	cgcttcccga	agggagaaag	gcgacaggt	atccggtaag	5460
cggcagggtc	ggaacaggag	agcgcacgag	ggagcttcca	gggggaaacg	cctggtatct	5520
ttatagtcct	gtcgggtttc	gccacctctg	acttgagcgt	cgatttttgt	gatgctcgtc	5580

ES 2 799 437 T3

agggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt 5640
 ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg 5700
 tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga 5760
 gtcagtgagc gaggaagcgg aagagc 5786

5 <210> 21
 <211> 164
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 21

aattcatatt tgcattgtcg tatgtgttct gggaaatcac cataaacgtg aaatgtcttt 60
 ggatttggga atcttataag ttctgtatga gaccactcgg atccatggat tccatgttca 120
 tgattcaaga gatcatgaac atggaatcca tgcttttttg gaaa 164

15 <210> 22
 <211> 1607
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polinucleótido sintético
 <400> 22

ES 2 799 437 T3

tctagaggct	cgagaagata	tcaactgcag	cttctactgg	gcggttttat	ggacagcaag	60
cgaaccggaa	ttgccagctg	gggcgccctc	tggttaagggt	gggaagccct	gcaaagtaaa	120
ctggatggct	ttctcgcggc	caaggatctg	atggcgcagg	ggatcaagct	ctgatcaaga	180
gacaggatga	ggatcgtttc	gcgttcttga	ctcttcgcga	tgtacgggcc	agatatacgc	240
gttgacattg	attattgact	agttattaat	agtaatcaat	tacgggggtca	ttagttcata	300
gccccatata	ggagttccgc	ctgcagggac	gtcgcaggat	cgggagatct	cccgatcccc	360
tatctgctcc	ctgcttgtgt	gttggaggtc	gctgagtagt	gcgcgagcaa	aatttaagct	420
acaacaaggc	aaggcttgac	cgacaattgc	atgaagaatc	tgcttaggggt	taggcgtttt	480
gcgctgcttc	gcggcgcgcc	ttttaaggca	gttattgggtg	cccttaaacg	cctgggtgcta	540
cgctgaata	agtgataata	agcggatgaa	tggcagaaat	tcgccggatc	tttgtgaagg	600
aaccttactt	ctgtgggtgtg	acataattgg	acaaaactacc	tacagagatt	taaagctcta	660
atgtaagcag	acagttttat	tgttcatgat	gatataTTTT	tatcttgtgc	aatgtaacat	720
cagagatTTT	gagacacaac	gtggctttcc	ccccccccc	ctagggtggg	cgaagaactc	780
cagcatgaga	tccccgcgct	ggaggatcat	ccagccggcg	tccccgaaaa	cgattccgaa	840
gccccaacctt	tcatagaagg	cggcgggtgga	atcgaaatct	cgtgatggca	ggttgggct	900
cgcttgggtcg	gtcatttcga	accccagagt	cccgtcagg	gcgcgccggg	ggggggggcg	960
ctgaggctctg	cctcgtgaag	aagggtgttc	tgactcatac	caggcctgaa	tcgccccatc	1020
atccagccag	aaagtgaggg	agccacgggt	gatgagagct	ttgtttagg	tggaccagtc	1080
ctgcaggagc	ataaagtgta	aagcctgggg	tgcctaataga	gtgagctaac	tcacattaat	1140
tgcgttgccg	tactgcccg	ctttccagtc	gggaaacctg	tcgtgcccgc	ccagtctagc	1200
tatcgccatg	taagcccact	gcaagctacc	tgctttctct	ttgcgcttgc	gttttccctt	1260
gtccagatag	cccagtagct	gacattcatc	cggggtcagc	accgtttctg	cggactggct	1320
ttctacgtgt	ctggttcgag	gcgggatcag	ccaccgcggt	ggcggcctag	agtcgacgag	1380
gaactgaaaa	accagaaagt	taactggcct	gtacggaagt	gttacttctg	ctctaaaagc	1440
tgcggaattg	taccgcggc	cgatccaccg	gtcgcacca	gcggccatca	agcacgttat	1500
cgataccgtc	gactagagct	cgctgatcag	tgggggggtg	ggtggggcag	gacagcaagg	1560
gggaggattg	ggaagacaat	agcagctgca	gaagtttaaa	cgcatgc		1607

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un virus recombinante adenoasociado que comprende el ADN que codifica el ARNhc de la dismutasa de superóxido 1 (SOD1) CATGGATTCCATGTTTCATGA (SEQ ID NO: 4), en donde el genoma del virus recombinante adenoasociado carece de los genes *rep* y *cap*.
2. Una composición que comprende el virus recombinante adenoasociado de la reivindicación 1.
- 10 3. Un virus recombinante adenoasociado para su uso en terapia, que comprende el ADN que codifica el ARNhc de la SOD1 CATGGATTCCATGTTTCATGA (SEQ ID NO: 4), en donde el genoma del virus recombinante adenoasociado carece de los genes *rep* y *cap*.
- 15 4. Un virus recombinante adenoasociado para el uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), que comprende el ADN que codifica el ARNhc de la SOD1 CATGGATTCCATGTTTCATGA (SEQ ID NO: 4), en donde el genoma del virus recombinante adenoasociado carece de los genes *rep* y *cap*.
5. El virus recombinante adenoasociado para el uso de las reivindicaciones 3 o 4, en donde el virus recombinante adenoasociado es para su administración sistémica.
- 20 6. El virus recombinante adenoasociado para el uso de las reivindicaciones 3 o 4, en donde el virus recombinante adenoasociado es para su administración intratecal.

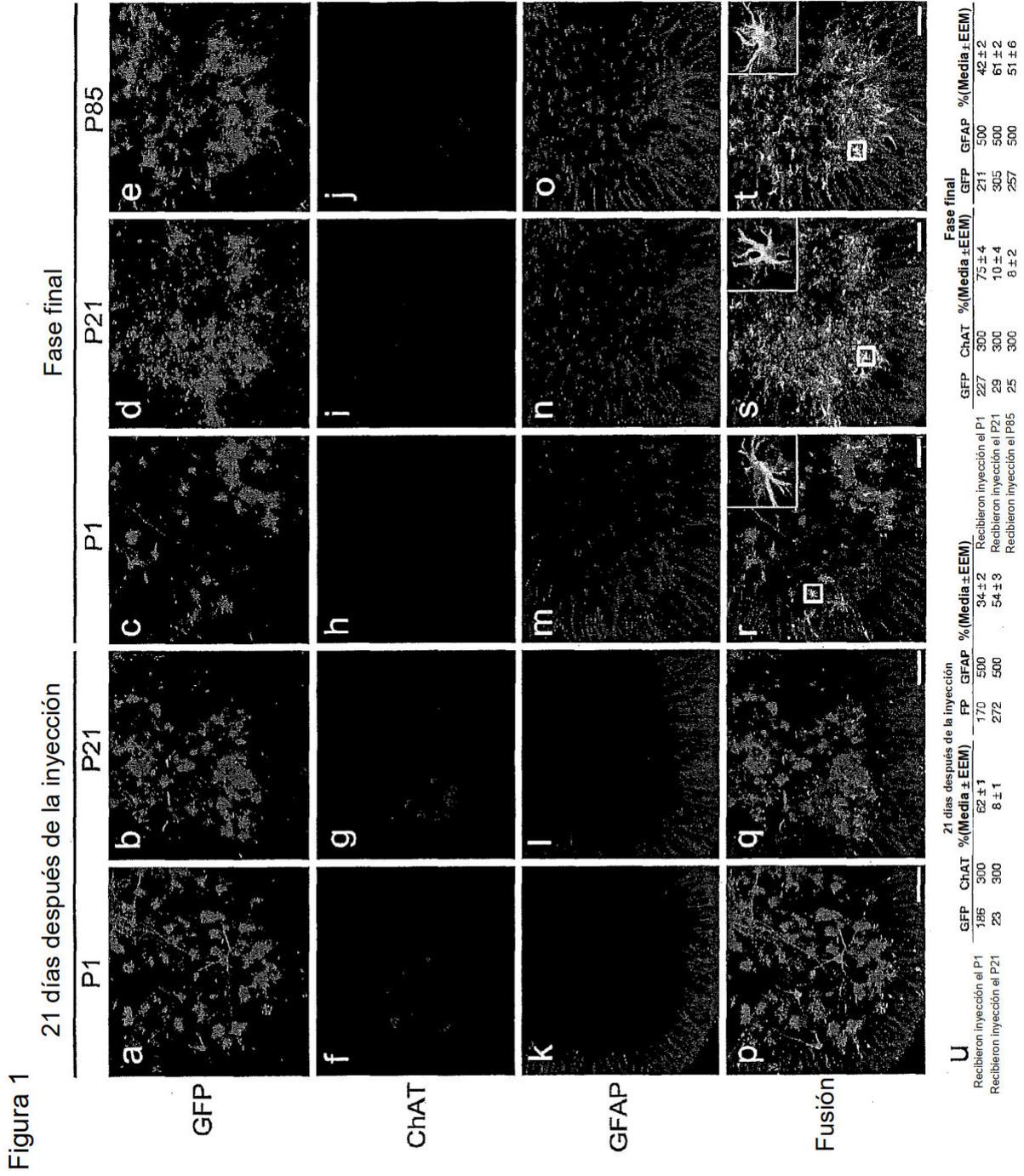


Figura 2

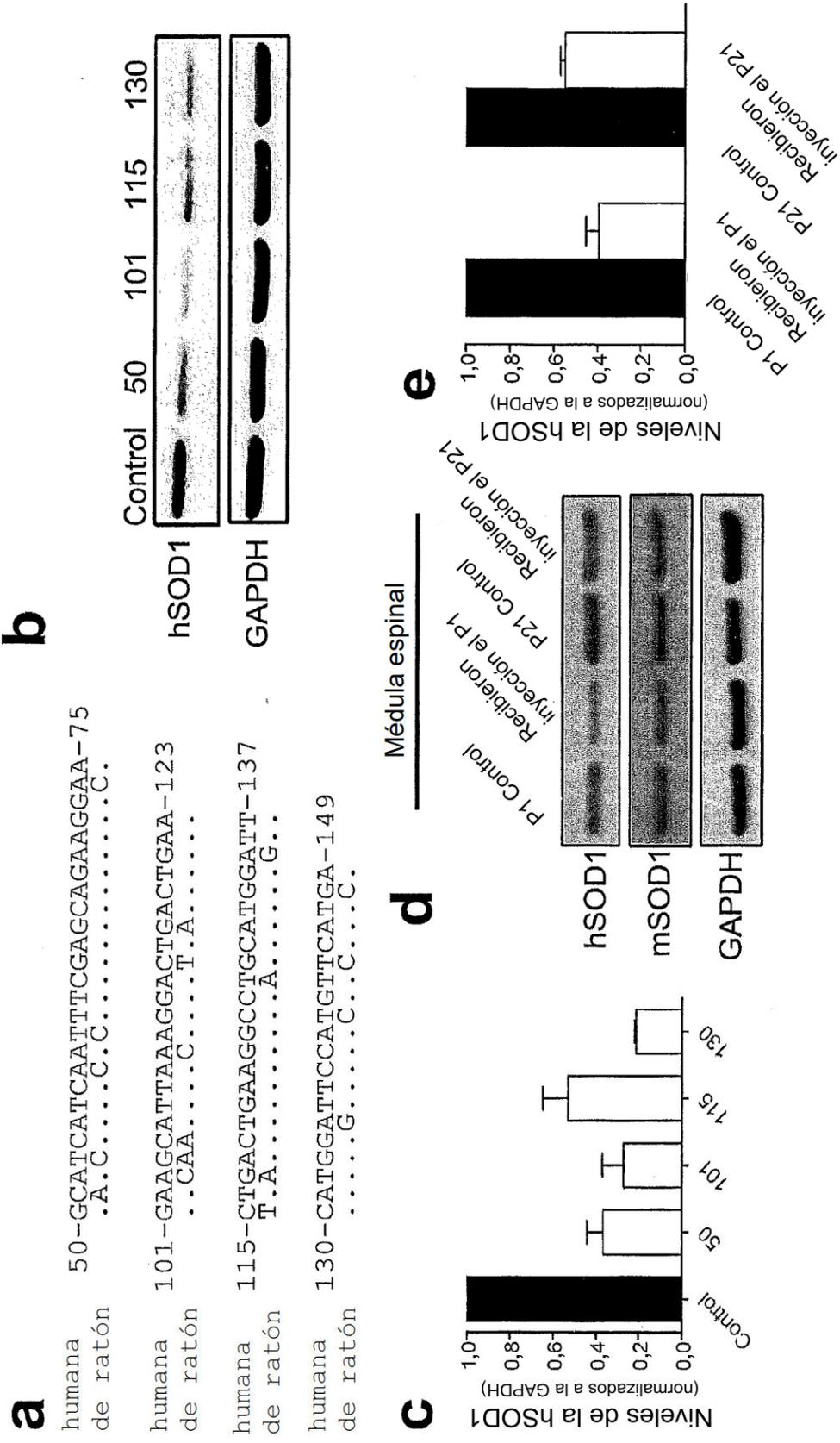


Figura 3

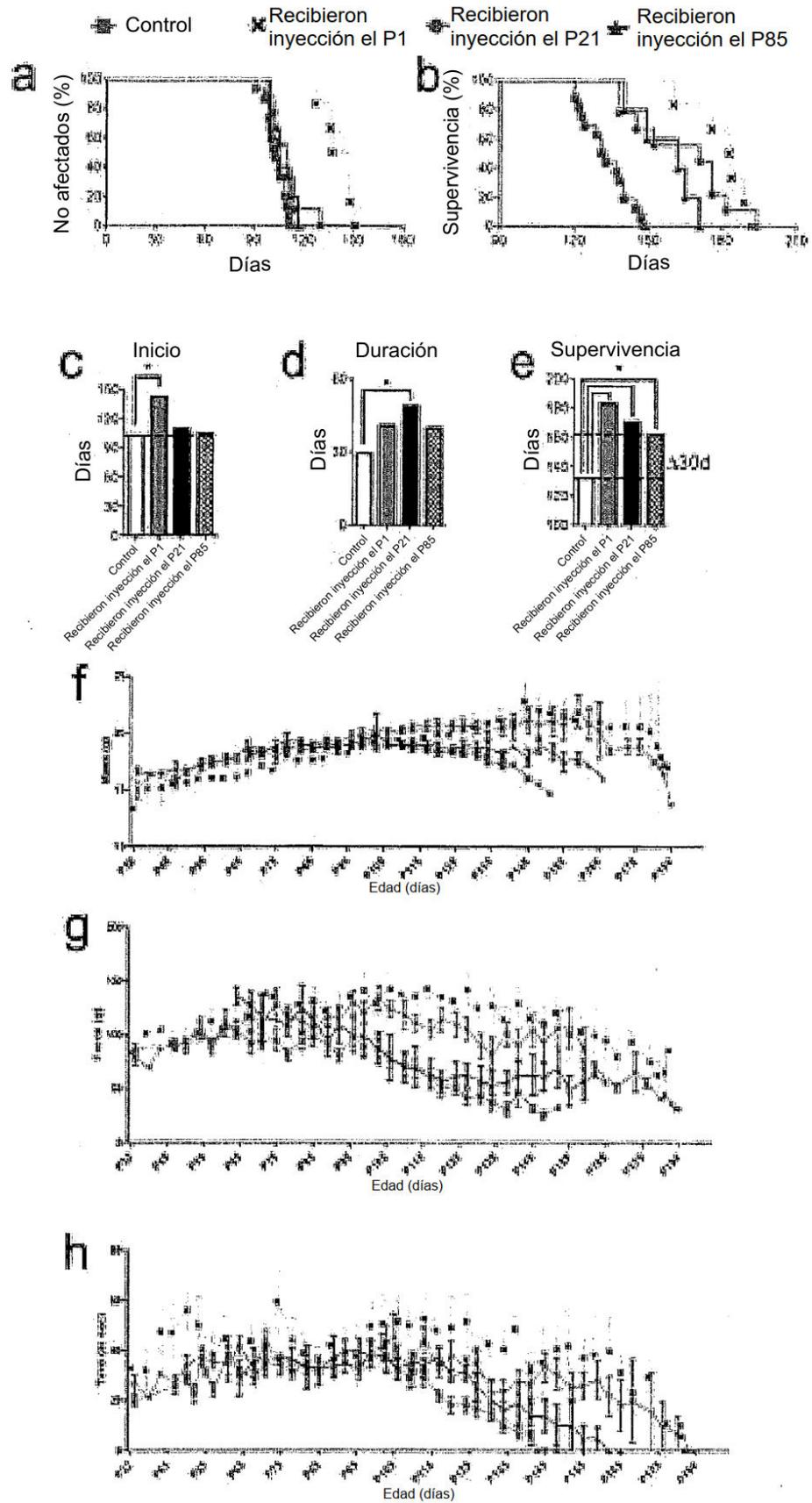
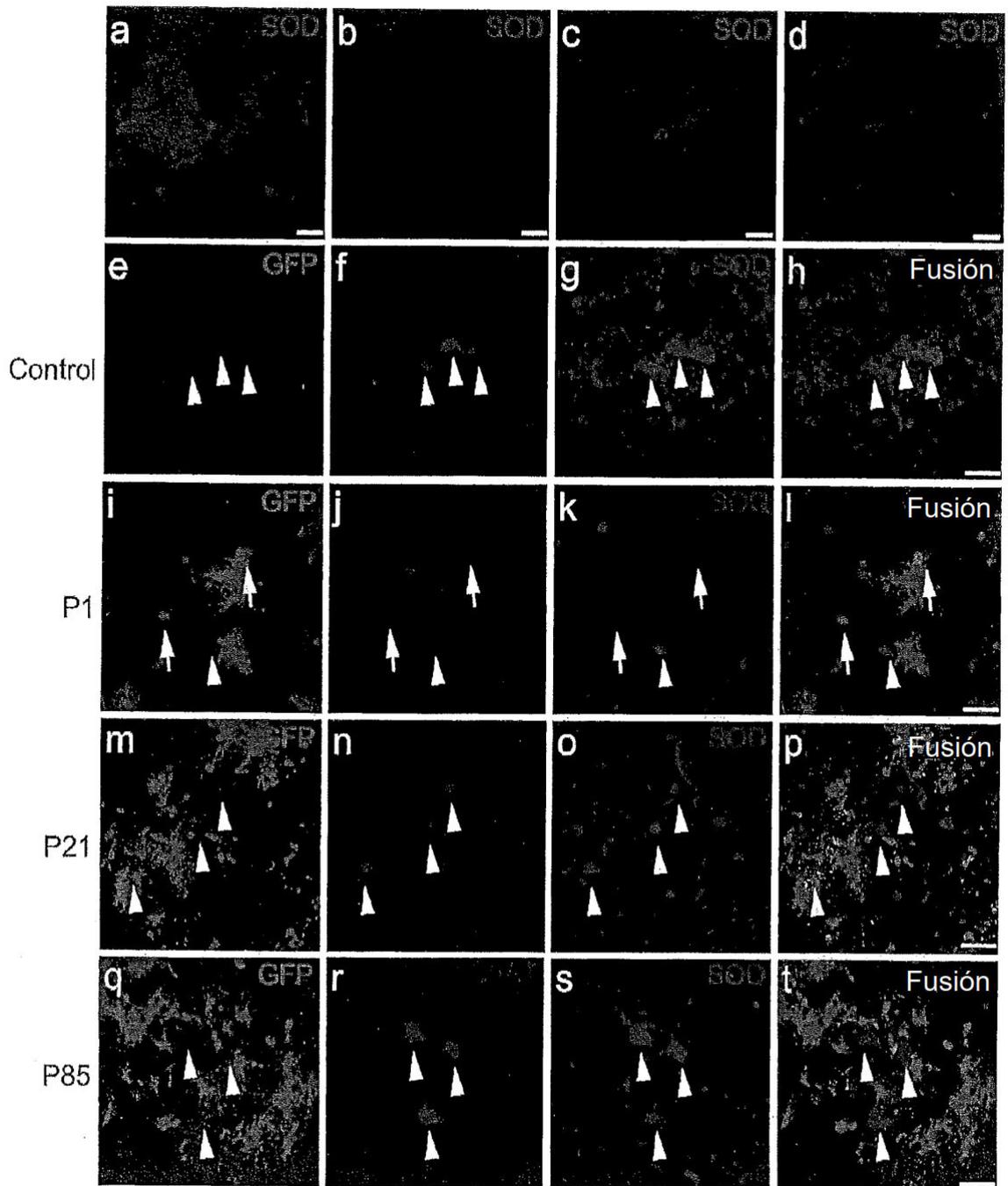
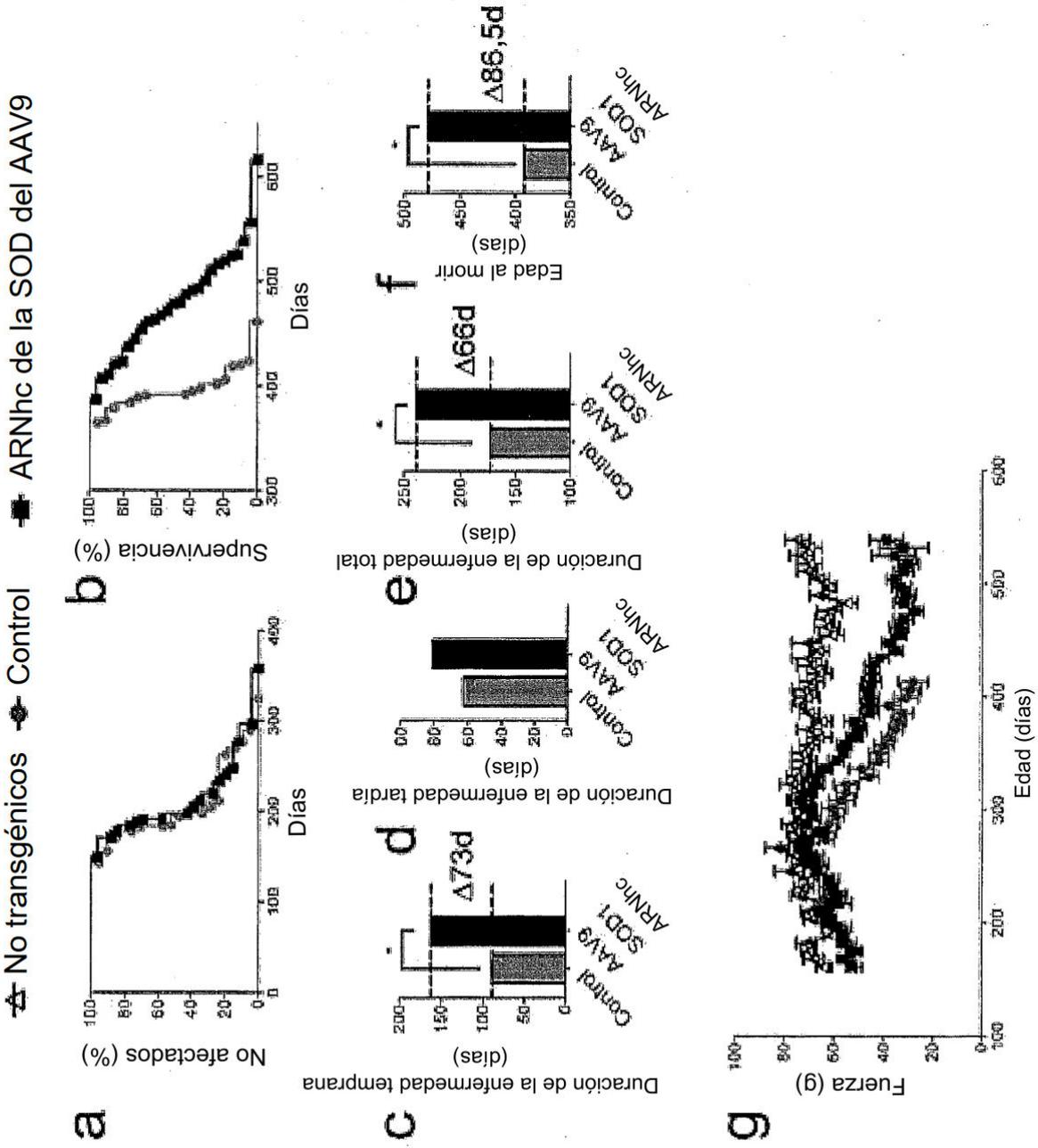


Figura 4





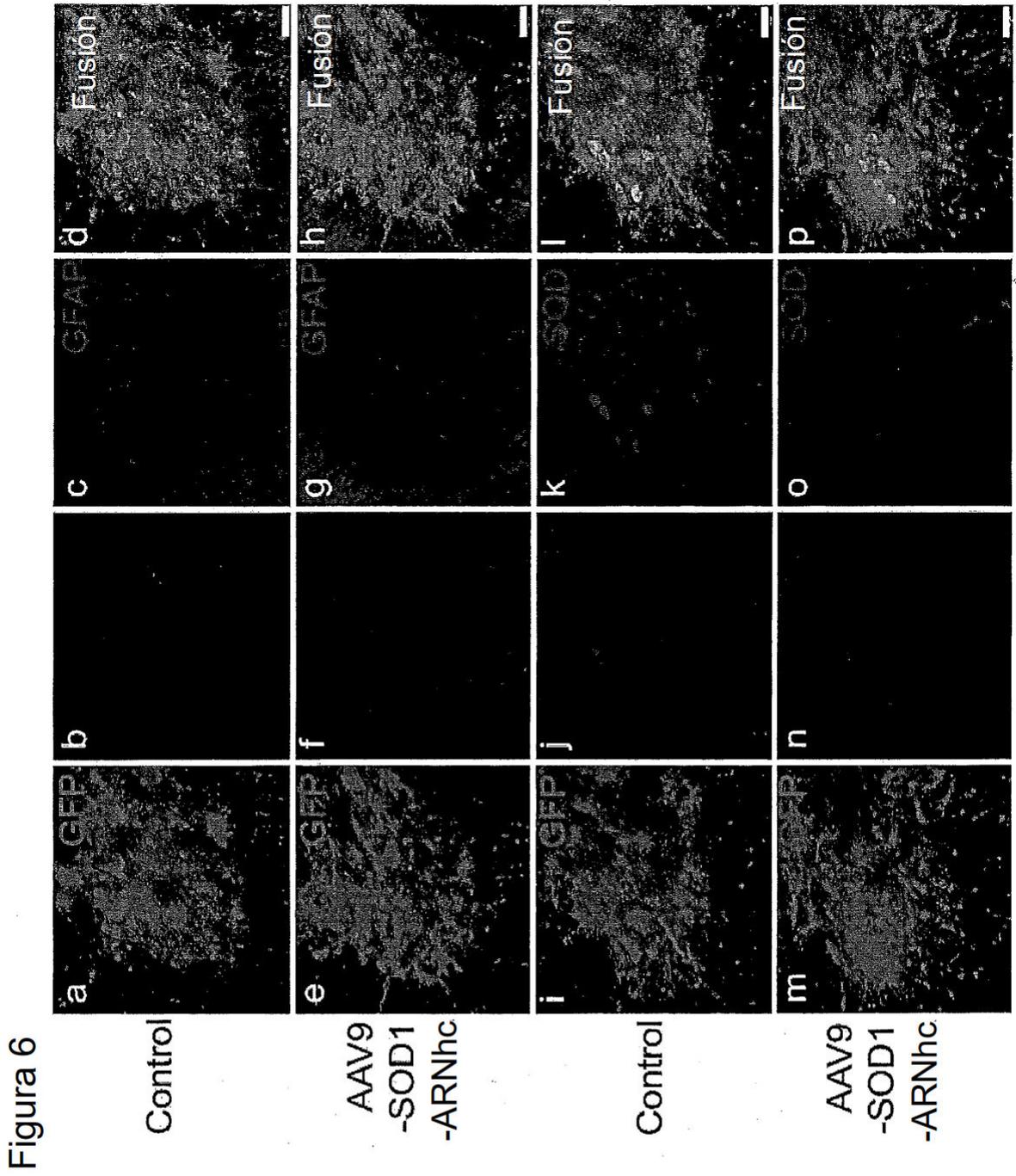


Figura 7

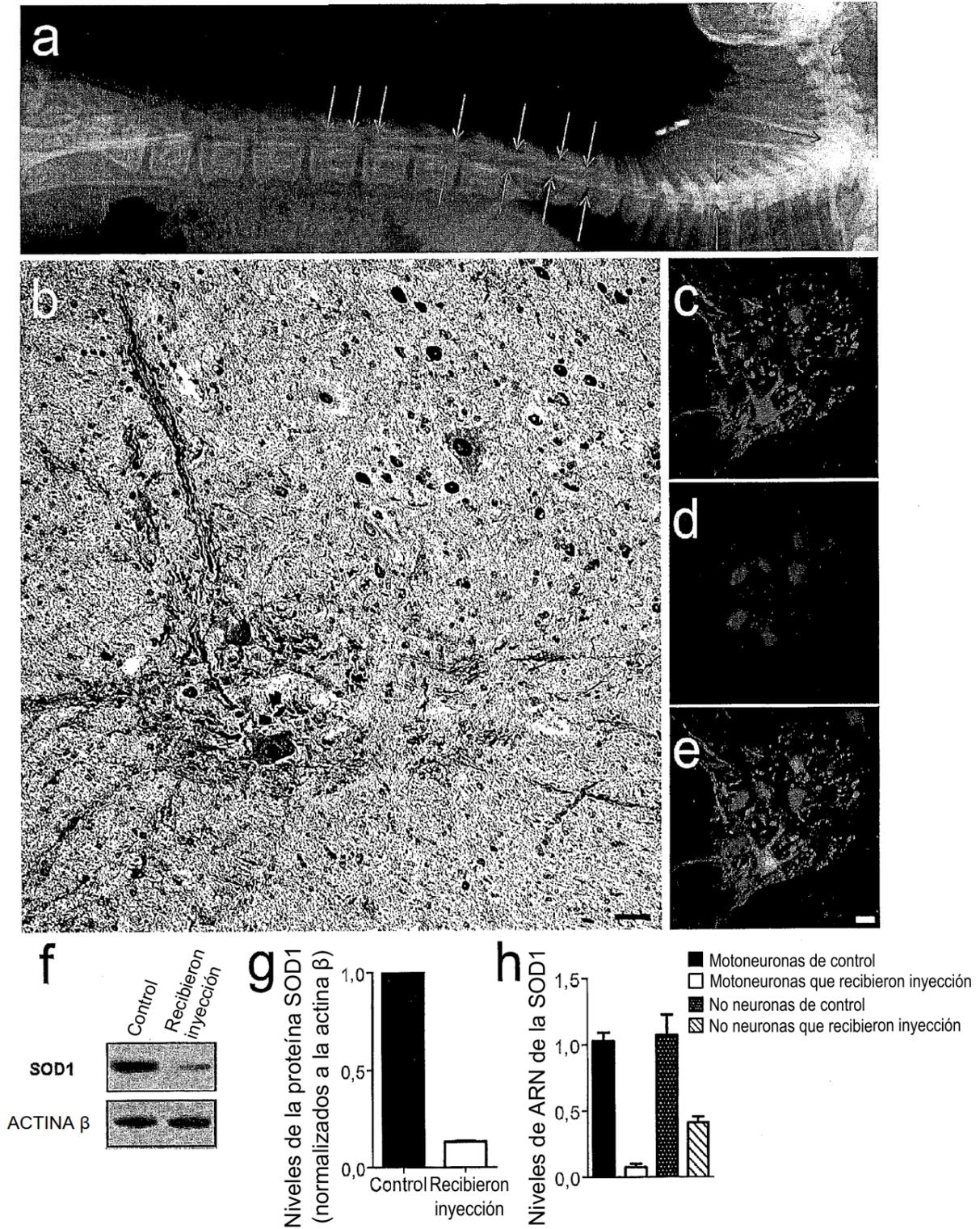


Figura 8

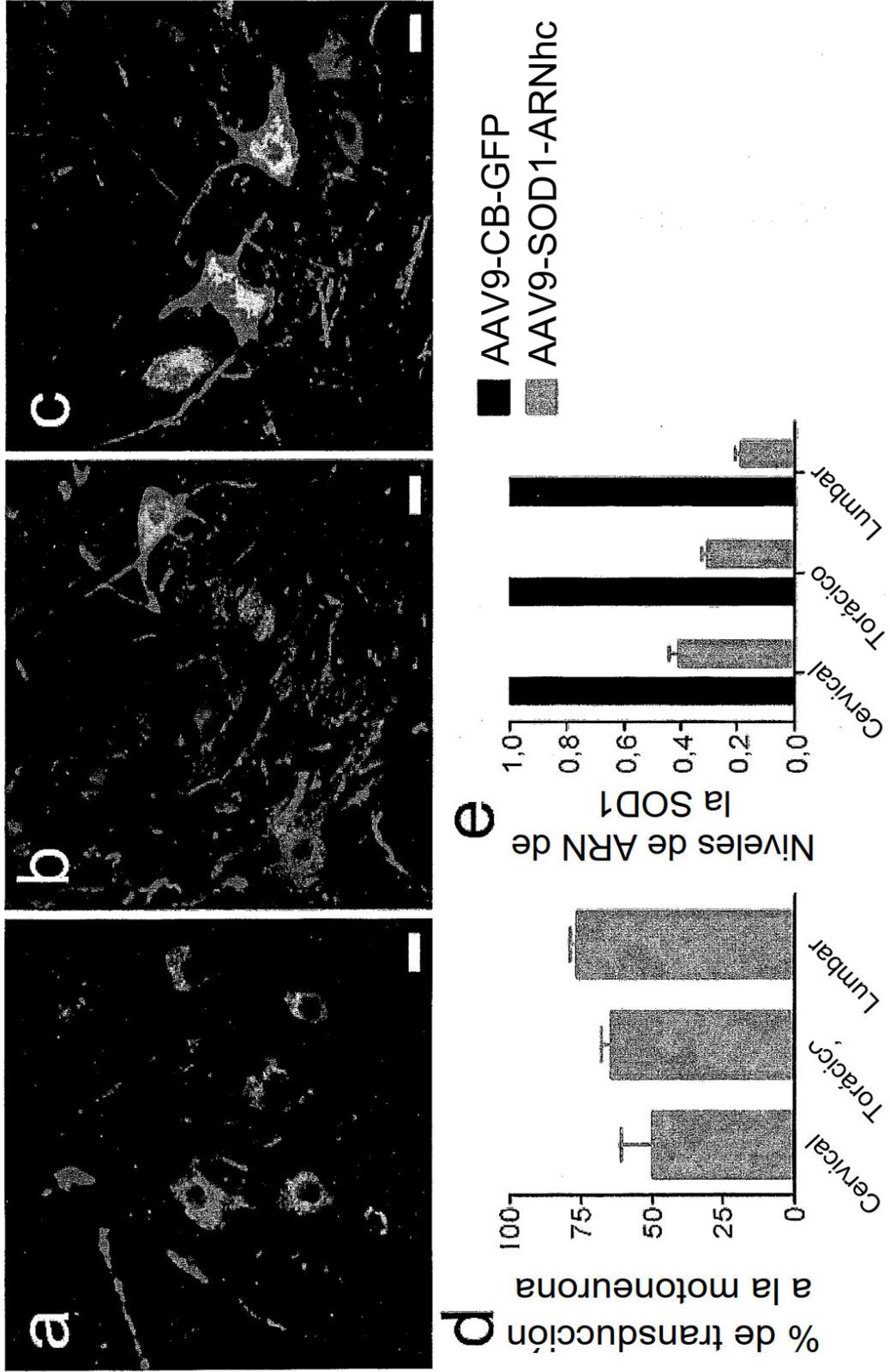
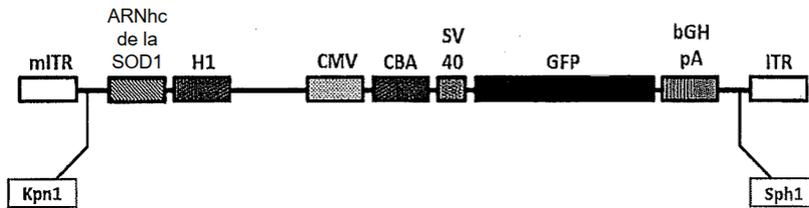


Figura 9

a ARNhc de la SOD1 del AAV



b Construcción clínica de ARNhc de la SOD1

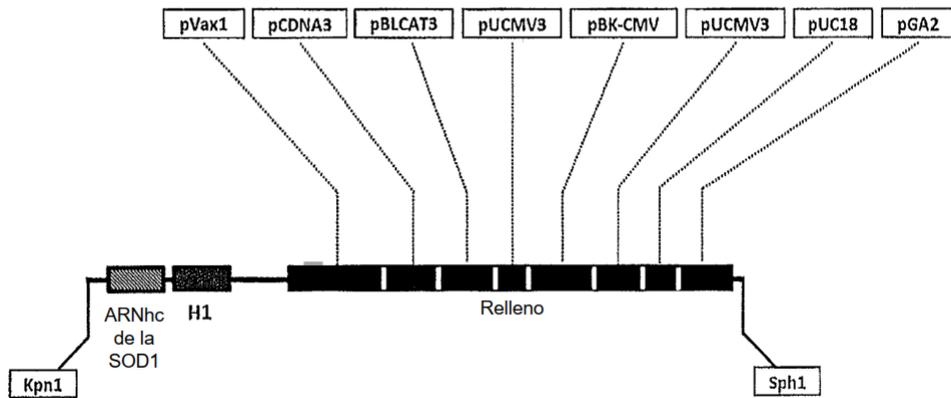


Figura 10

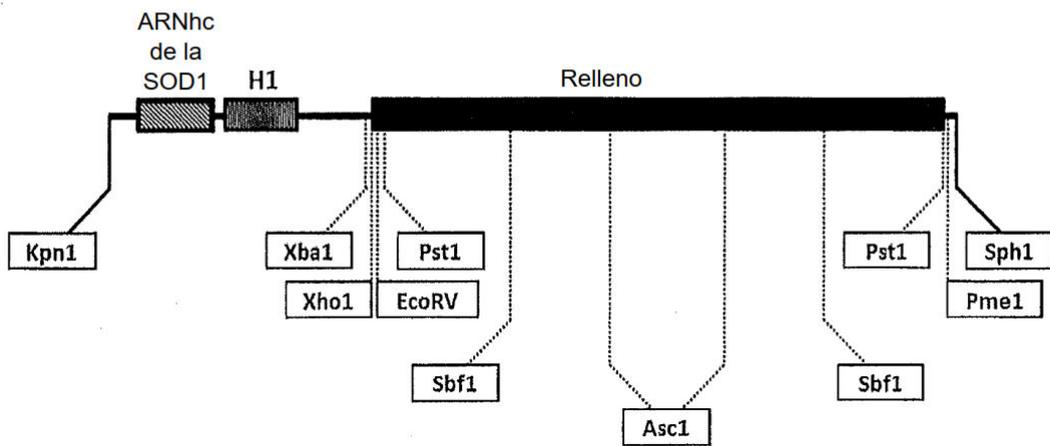


Figura 11

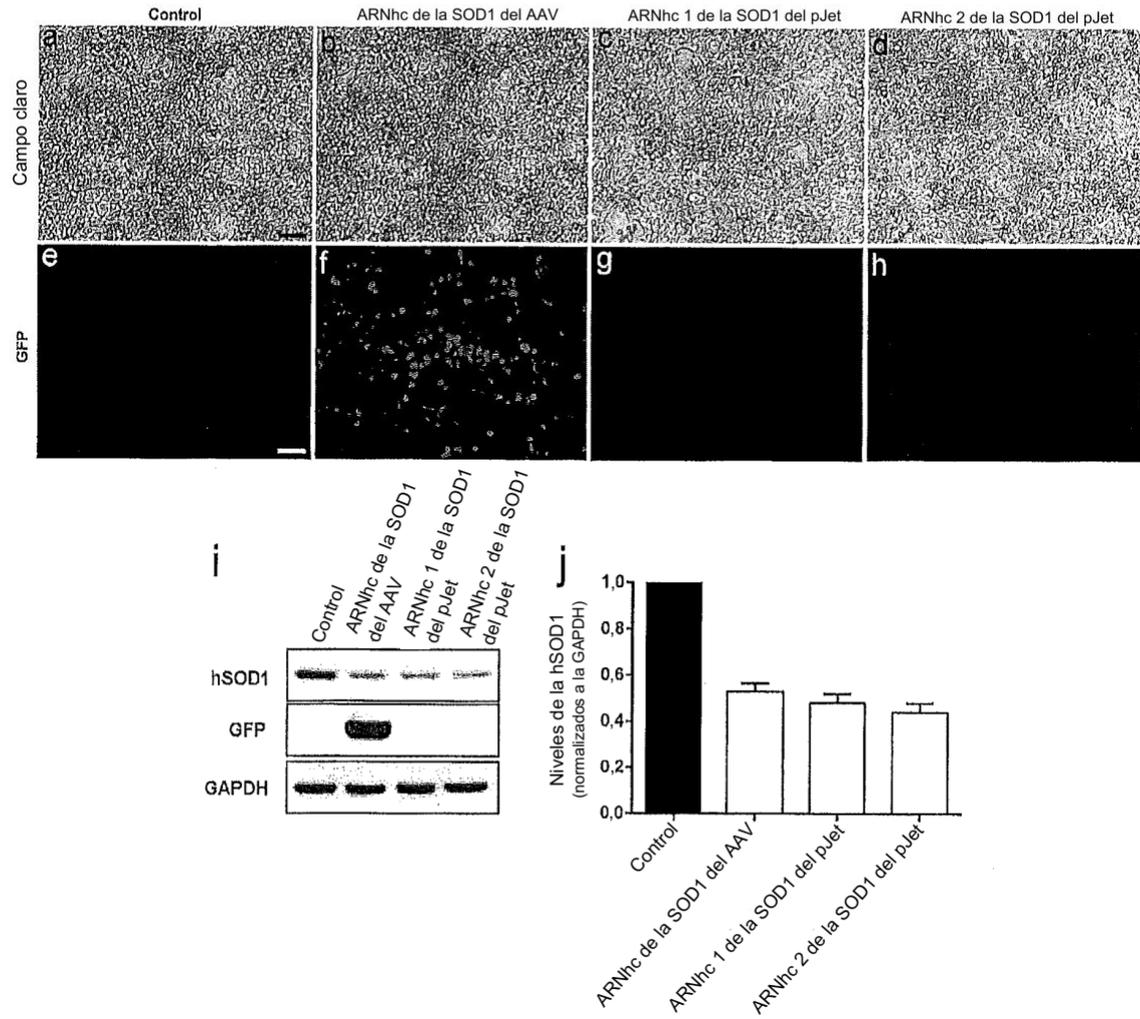


Figura 12

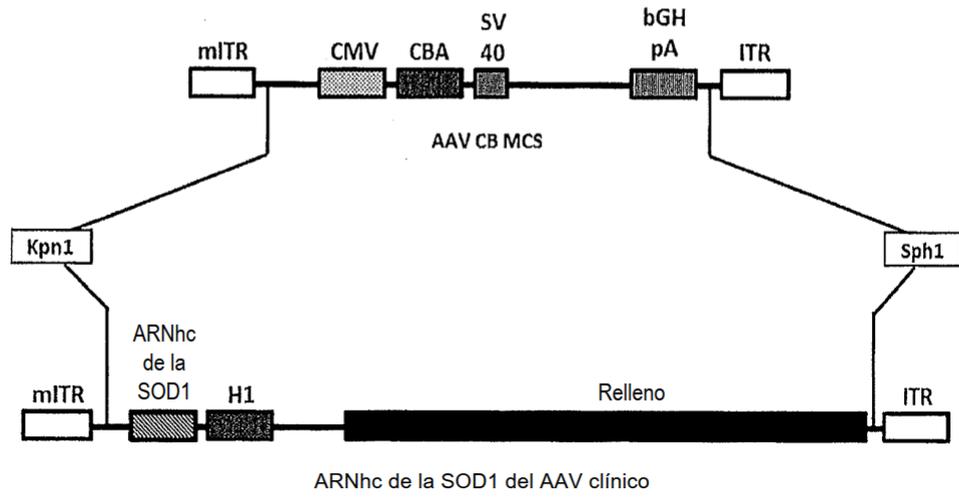


Figura 13

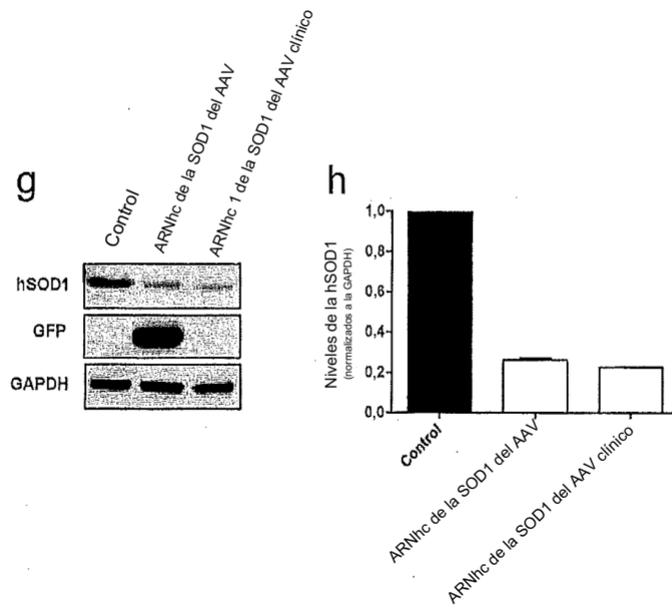
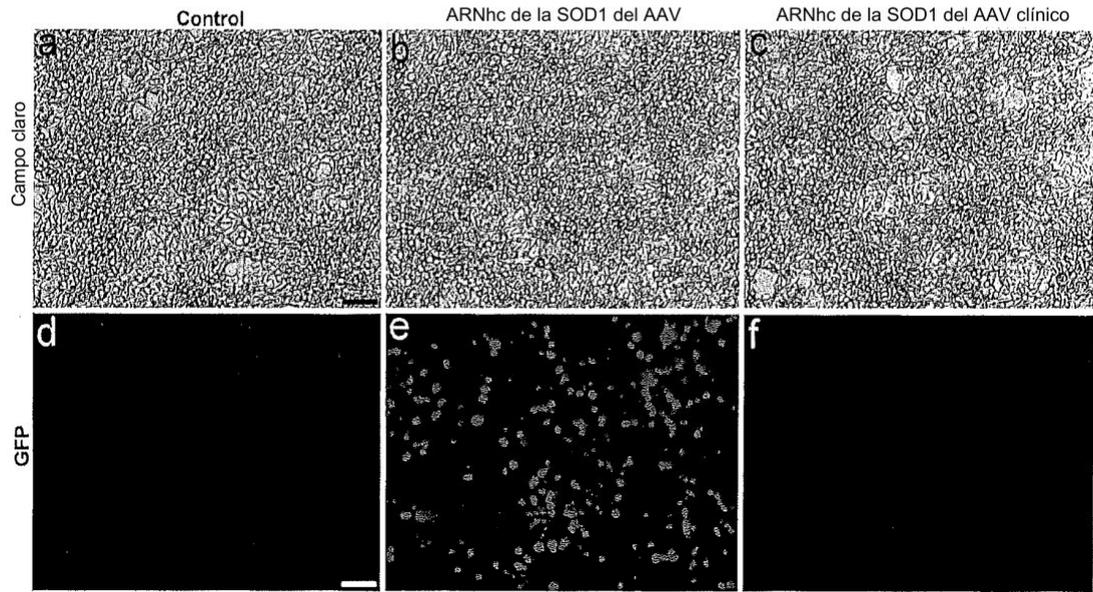


Figura complementaria 1

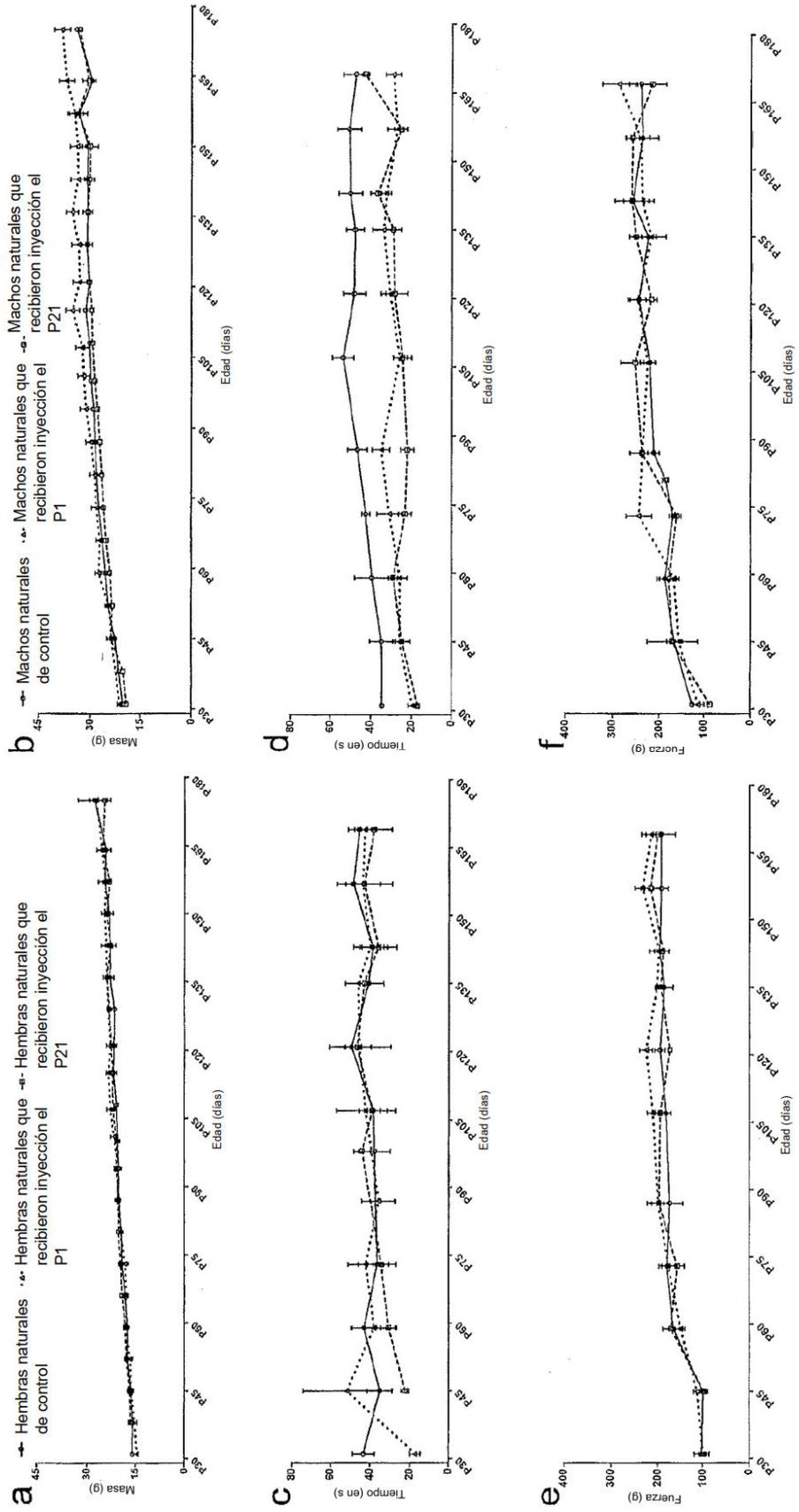


Figura complementaria 2

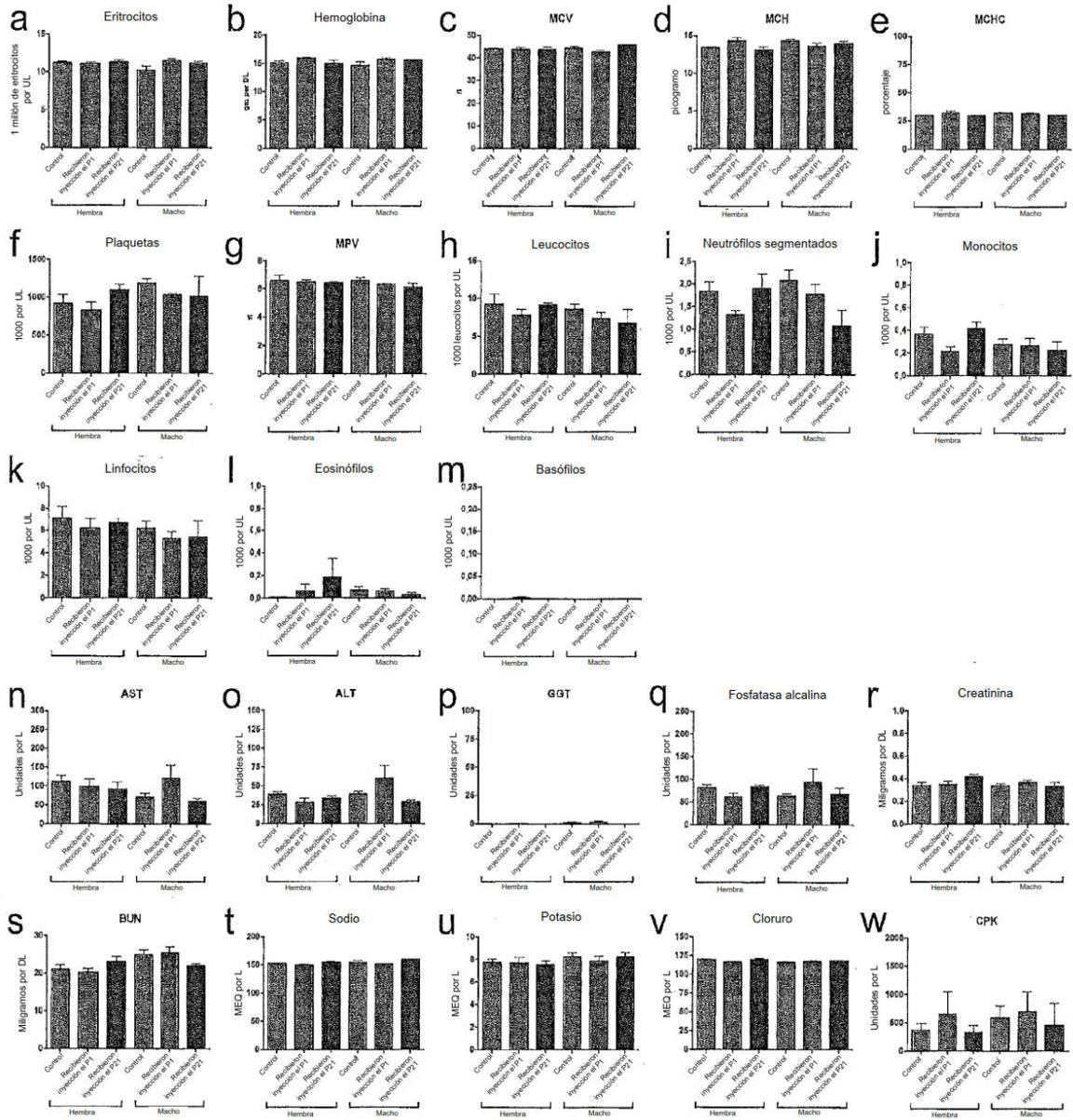


Figura complementaria 3

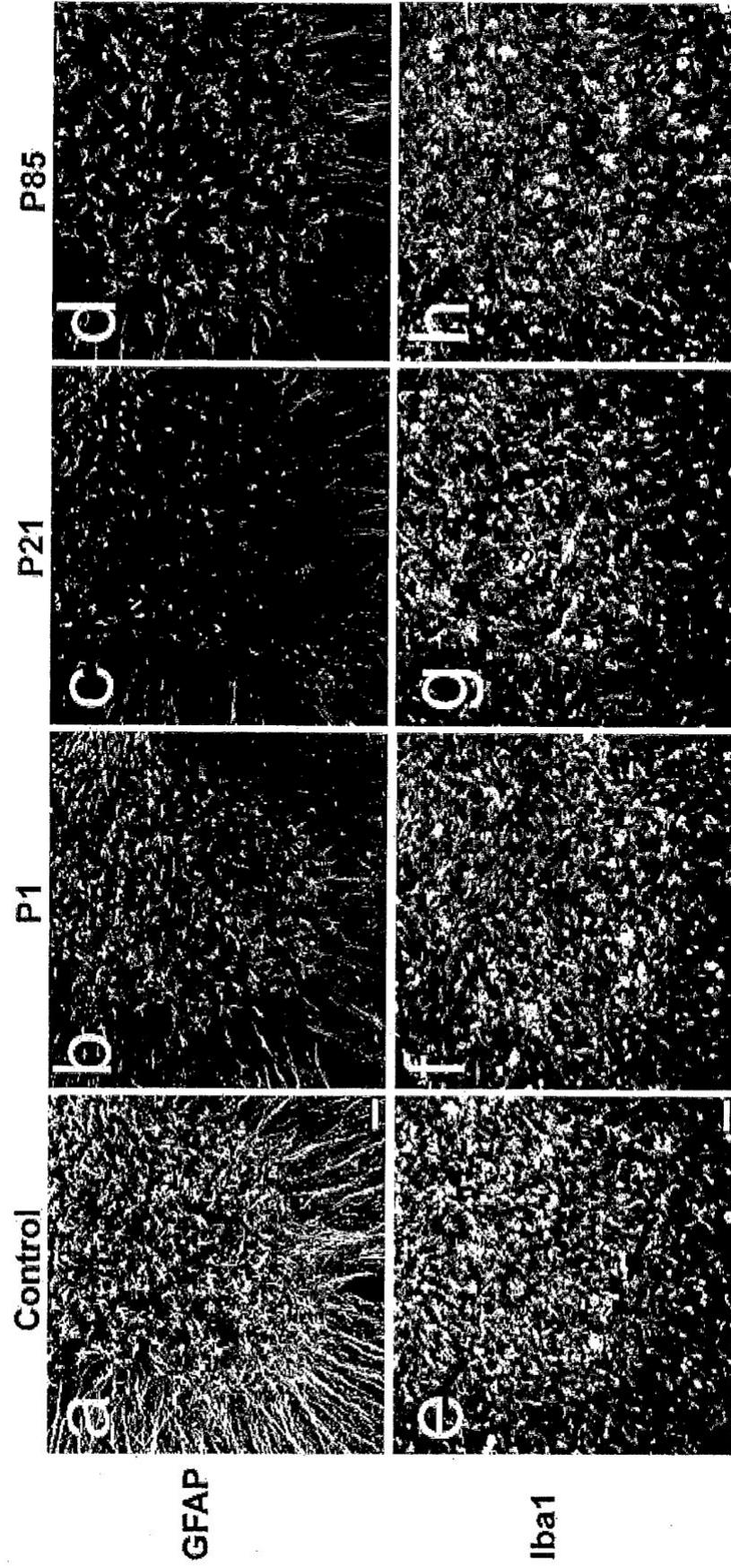


Figura complementaria 4

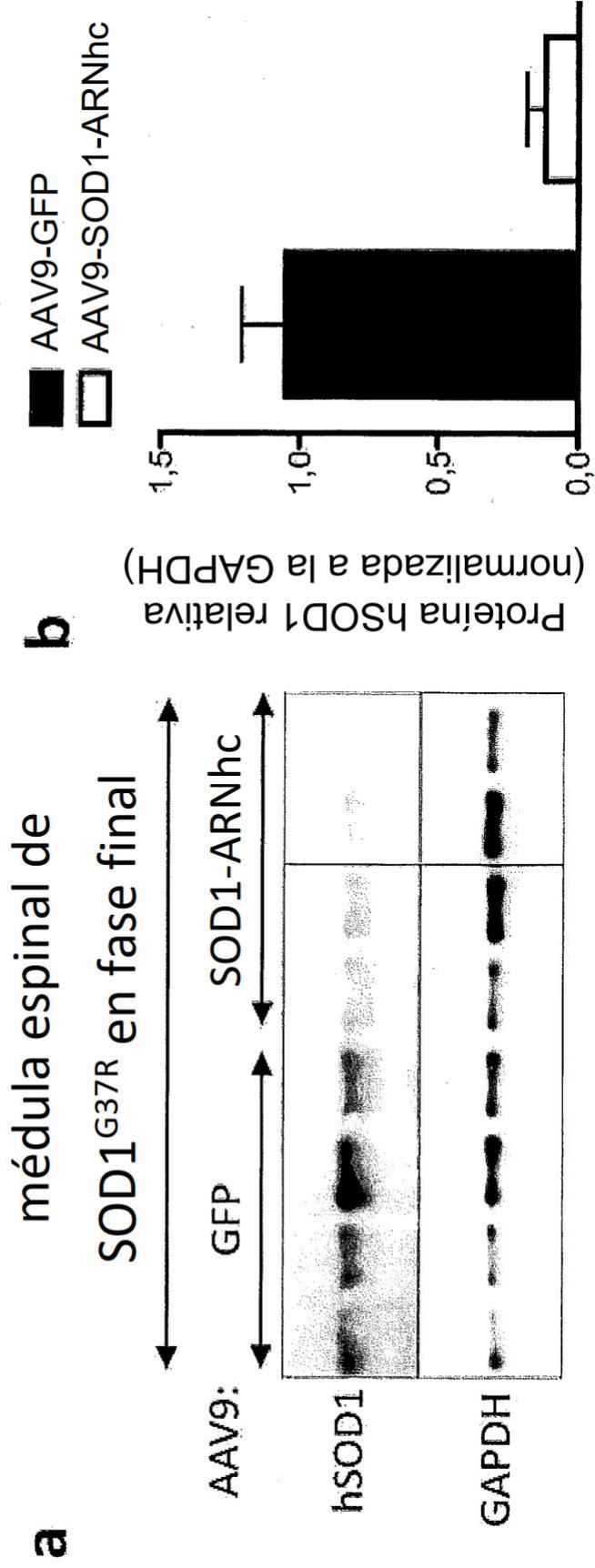


Figura complementaria 5

a

Humana 130-CATGGATTCCCATGTTCAATGA-149
De monoC.

b

