

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 789**

51 Int. Cl.:
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/864 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07839216 .4**
96 Fecha de presentación: **03.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2066791**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.06.2009**

54 Título: **Terapia génica para la esclerosis lateral amiotrófica y otros trastornos de la médula espinal**

30 Prioridad:
03.10.2006 US 827977 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.11.2012

73 Titular/es:
GENZYME CORPORATION (100.0%)
500 KENDALL STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US

72 Inventor/es:
O'RIORDAN, CATHERINE y
WADSWORTH, SAMUEL

74 Agente/Representante:
PONTI SALES, Adelaida

ES 2 391 789 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Terapia génica para la esclerosis lateral amiotrófica y otros trastornos de la médula espinal

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento de trastornos que afectan a la función motora de un sujeto y, en particular, a la función motora afectada por una enfermedad o lesión del cerebro y/o de la médula espinal.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es un estado neurodegenerativo progresivo que implica la pérdida de motoneuronas grandes en el cerebro y la médula espinal. Se caracteriza por debilidad progresiva, atrofia y espasticidad, lo que conduce a parálisis y fallo respiratorio en un plazo de cinco años después de su inicio. La ELA familiar supone un 10 % de todos los casos de ELA; aproximadamente un 25 % de estos casos se debe a mutaciones en el gen de la Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1) [1]. Hasta la fecha se han identificado 109 mutaciones diferentes en el gen de la SOD1; éstas abarcan los cinco exones [2]. Aparte de mutaciones muy raras en los genes de la cadena pesada de los neurofilamentos (NFH), la dinactina, el gen de la proteína de unión vesicular 1 y el gen de la alsina, la SOD1 es el único locus importante identificado susceptible para la ELA. La SOD1 es una enzima principalmente citoplasmática que cataliza la descomposición de los iones superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, que a su vez es degradado por la glutatión peroxidasa o catalasa para formar agua. Varias líneas de evidencias sostienen que la proteína SOD1 mutante resulta neurotóxica debido a una función adversa adquirida que acarrea tanto una patología oxidativa como una agregación de proteínas, con trastornos secundarios del metabolismo de glutamato, la función mitocondrial, el transporte axonal y la homeostasis del calcio [3]. La toxicidad de la SOD1 mutante es confirmada por la observación de que la expresión transgénica de altos niveles de la proteína SOD1 mutante en ratones produce un fenotipo de la enfermedad de las motoneuronas, dependiendo la edad de inicio y la duración de la enfermedad del número de copias [4].

[0003] Hasta la fecha, pocas intervenciones terapéuticas han alterado el fenotipo de las motoneuronas en los ratones transgénicos con ELA. Aunque hasta ahora se han ensayado más de 100 moléculas pequeñas, solo unas pocas han presentado un beneficio marginal (por ejemplo, riluzol [5], celecoxib [6], arimoclomol [7]). Por el contrario, algunas formas de terapia proteica han resultado beneficiosas. Así, se obtuvo una mejora de la supervivencia administrando el factor de crecimiento similar a insulina 1 por vía transgénica [8] o mediante la liberación de VAA2 por inyección IM y el transporte axonal retrógrado siguiente a los nervios motores [9]. Otras dos proteínas que han mostrado ser promotoras terapéuticamente como agentes neuroprotectores son la eritropoyetina [10] y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [11, 12]. El último es de interés porque el análisis genético ha indicado que variantes hipomórficas del gen del VEGF suponen un factor de riesgo para la ELA [13]. Además, los ratones que carecen de elementos promotores de respuesta a hipoxia desarrollan una enfermedad de las motoneuronas de progresión lenta [14]. Seguidamente se ha documentado que la liberación lentivírica del VEGF en la médula espinal de ratones con ELA retrasa la muerte [15]. Dos investigadores independientes han informado de que la infusión del VEGF en el líquido cerebroespinal de ratones [16] y ratas [17] con ELA también ralentiza el curso de la enfermedad.

[0004] La terapia génica es una modalidad terapéutica emergente para trastornos que afectan al sistema nervioso central (SNC). El desarrollo de vectores víricos capaces de infectar eficazmente neuronas postmitóticas ha facilitado la terapia génica en el SNC. El sistema nervioso central se compone de la médula espinal y el cerebro. La médula espinal conduce información sensorial desde el sistema nervioso periférico hasta el cerebro y conduce información motora desde el cerebro hasta los diversos efectores. Para una revisión sobre los vectores víricos para la liberación de genes en el sistema nervioso central, véase Davidson y col. (2003) Nature Rev. 4: 353 – 364.

50

[0005] Los vectores víricos adeno-asociados (VAA) se consideran útiles para la terapia génica en el SNC porque presentan perfiles de toxicidad y de inmunogenicidad favorables, son capaces de transducir células neuronales y son capaces de mediar la expresión a largo plazo en el SNC (Kaplitt y col. (1994) Nat. Genet. 8: 148 – 154; Bartlett y col. (1998) Hum. gene Ther. 9: 1181 – 1186; y Passini y col. (2002) J. Neurosci. 22: 6437 – 6446).

55

[0006] Una propiedad útil de los vectores VAA reside en la capacidad de algunos vectores VAA para ser transportados en sentido retrógrado y/o anterógrado en las células neuronales. Las neuronas de una región del cerebro están interconectadas por medio de axones con regiones distales del cerebro, proporcionando de este modo un sistema de transporte para la liberación de vectores. Por ejemplo, un vector VAA se puede administrar en o cerca de los terminales axonales de las neuronas. Las neuronas internalizan el vector VAA y lo transportan de manera retrógrada al cuerpo celular a lo largo del axón. Se ha mostrado que propiedades similares del adenovirus, el VHS y el virus de la pseudorrabia liberan genes en estructuras distales dentro del cerebro (Soudas y col. (2001) FASEB J. 15: 2283 – 2285; Breakefield y col. (1991) New Biol. 3: 203 – 218; y deFalco y col. (2001) Science, 291: 2608 – 2613).

60

[0007] Varios grupos han informado que la transducción del cerebro con el serotipo 2 del VAA (VAA2) está limitada al punto de inyección intracraneal (Kaplitt y col. (1994) Nat. Genet. 8: 148 – 154; Passini y col. (2002) J. Neurosci. 22: 6437 – 6446; y Chamberlin y col. (1998) Brain Res. 793: 169 – 175). Informes recientes sugieren que el transporte axonal retrógrado de los vectores víricos neurotróficos, que incluyen los vectores VAA y lentivíricos, también puede darse en circuitos selectos del cerebro normal de rata (Kaspar y col. (2002) Mol. Ther. 5: 50 – 56; Kaspar y col. (2003) Science 301: 839 – 842 y Azzouz y col. (2004) Nature 429: 413 – 417). Roaul y col. (2005) Nat. Med. 11 (4): 423 – 428 y Ralph y col. (2005) Nat. Med. 11 (4): 429 – 433, informan que la inyección intramuscular de lentivirus que expresan ARN interferente que silencia la Cu/Zn superóxido dismutasa humana (SOD 1) retrasa el inicio de la enfermedad de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en un modelo terapéuticamente relevante de la ELA en roedores.

[0008] Las células transducidas con vectores VAA pueden expresar un producto transgénico terapéutico, tal como una enzima o un factor neurotrófico, para mediar efectos beneficiosos dentro de las células. Estas células también pueden secretar el producto transgénico terapéutico, el cual puede ser captado después por células distales en las que puede mediar sus efectos beneficiosos. Este proceso se ha descrito como corrección cruzada (Neufeld y col. (1970) Science 169: 141 – 146).

[0009] En la técnica existe la demanda de composiciones para tratar disfunciones de la médula espinal que conducen a la pérdida de la función motora en pacientes humanos.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0010] La invención es como sigue:

1. Un vector vírico adeno-asociado del pseudotipo 2/7 ó 2/8 que codifica la HIF-1-alfa, para el uso en un procedimiento de tratamiento de un mamífero con un trastorno de las motoneuronas.
2. El vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con la realización 1, en el que el pseudotipo del vector vírico adeno-asociado es 2/7.
3. El vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con la realización 1, en el que el pseudotipo del vector vírico adeno-asociado es 2/8.
4. El vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en el que el vector se ha de inyectar en la médula espinal del mamífero.
5. El vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con la realización 4, en el que el vector se ha de liberar en una pluralidad de lugares de la médula espinal.
6. El vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en el que el vector codifica una proteína de fusión formada por la HIF-1-alfa y la VP16 del VHS.
7. El vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en el que el vector codifica una proteína de fusión formada por la HIF-1-alfa y el NF-κB.
8. El vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con la realización 7, en el que la proteína de fusión es codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1.
9. El vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 8, en el que el mamífero presenta un estado patológico seleccionado del grupo formado por atrofia muscular bulboespinal, ataxia espinocerebelosa, atrofia muscular espinal y lesión traumática de la médula espinal.
10. El vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 8, en el que el mamífero tiene esclerosis lateral amiotrófica.
11. El vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el mamífero se selecciona del grupo formado por un roedor, un murino, un ser humano y un simio.
12. El vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con la realización 11, en el que el mamífero es un ser humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0011] La **figura 1** muestra la liberación del genoma vectorial en la médula espinal mediante diferentes modos de liberación y pseudotipos de vectores.

[0012] La **figura 2** muestra la liberación del genoma vectorial en el cerebro mediante diferentes modos de liberación y pseudotipos de vectores.

5 **[0013]** La **figura 3** muestra el número de genomas vectoriales liberados en el músculo después de la inyección intramuscular de los vectores VAA.

[0014] La **figura 4** muestra la expresión génica de EPO, VEGF e IGF-1 después de la transducción de un cerebro de ratón con un vector VAA que codifica la HIF-1-alfa NF- κ B.

10

[0015] La **figura 5** muestra una curva de supervivencia de Kaplan-Meier que demuestra un aumento estadísticamente significativo ($p = 0,033$) en la supervivencia de ratones con ELA después de la administración intraespinal de VAA2/8 HIF-1 α NF κ B (supervivencia de 133 días en los ratones control frente a una supervivencia de 139 días en los ratones tratados con HIF-1-alfa NF κ B).

15

[0016] La **figura 6** muestra la hibridación *in situ* de la HIF-1-alfa NF κ B en las médulas espinales de ratones con ELA tratados con VAA2/8 HIF-1 α NF κ B y sugiere que la transducción se produce principalmente en la región lumbar de la médula espinal. Los animales 6817, 6715 y 6389 fueron tratados con VAA2/8 HIF-1 α NF κ B; el animal 1460 era un control animal.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0017] Con el fin de que la presente invención sea más fácil de entender, se definen en primer lugar ciertos términos. Otras definiciones se presentarán a lo largo de la descripción detallada.

25

[0018] En la práctica de la presente invención se usarán, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante que son del estado la técnica. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª edición (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel y col. eds. (1987)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, y ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

30

[0019] Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas en singular "un/una" y "el/la" incluyen referencias en plural, salvo que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "una célula" incluye una pluralidad de células, incluidas las mezclas de ellas.

35

[0020] Como se usa en la presente memoria, la expresión "que comprende" pretende significar que las composiciones y procedimientos incluyen los elementos enumerados pero no excluyen otros. Cuando se usa para definir composiciones y procedimientos, "formado esencialmente por" significa que se excluyen otros elementos de importancia esencial para la combinación. Así, una composición formada esencialmente por los elementos definidos en la presente memoria no excluirá trazas de contaminantes procedentes del procedimiento de aislamiento y purificación y vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes y similares. "Formado por" significa que se excluyen más que elementos traza de otros ingredientes y pasos de procedimiento sustanciales para la administración de las composiciones de esta invención.

40

45

[0021] Todas las designaciones numéricas, por ejemplo pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluidos los intervalos, son aproximaciones que varían (+) o (-) en incrementos de 0,1. Se entiende, aunque no siempre se indique explícitamente, que todas las designaciones numéricas vienen precedidas por el término "aproximadamente". También se entiende, aunque no siempre se indique explícitamente, que los reactivos descritos en la presente memoria son meramente ejemplos y que se conocen equivalentes suyos en la técnica.

50

[0022] El término "transgén" se refiere a un polinucleótido que se introduce en una célula y que se puede transcribir en ARN y, opcionalmente, traducir y/o expresar en condiciones apropiadas. En un aspecto, confiere una propiedad deseada a la célula en la que se ha introducido o, por el contrario, conduce a un resultado terapéutico o diagnóstico deseado.

55

[0023] Las expresiones "partículas genómicas (pg)" o "equivalentes genómicos", como se usan en referencia a un título vírico, se refieren al número de viriones que contienen el genoma de ADN del VAA recombinante, independientemente de la infectividad o funcionalidad. El número de partículas genómicas en una preparación vectorial concreta se puede medir mediante los procedimientos que se describen en los ejemplos de la presente memoria o, por ejemplo, en Clark y col. (1999) Hum. Gene Ther., 10: 1031 – 1039; Veldwijk y col. (2002) Mol. Ther., 6: 272 – 278.

60

[0024] Las expresiones "unidad de infección (ui)", "partícula infecciosa" o "unidad de replicación", como se usan en referencia a un título vírico, se refieren al número de partículas vectoriales VAA recombinantes infecciosas y competentes para replicación medido en el ensayo de formación de placas, conocido también como ensayo de replicación, como se describe, por ejemplo, en McLaughlin y col. (1988) J. Virol., 62: 1963 – 1973.

5

[0025] La expresión "unidad de transducción (ut)", como se usa en referencia a un título vírico, se refiere al número de partículas vectoriales VAA recombinantes infecciosas que dan lugar a la producción de un producto transgénico funcional, medido en ensayos funcionales como los que se describen en los ejemplos de la presente memoria o, por ejemplo, en Xiao y col. (1997) Exp. Neurobiol., 144: 113 – 124; o en Fisher y col. (1996) J. Virol., 70: 520 – 532 (ensayo LFU).

10

[0026] Las expresiones "terapéutico", "cantidad terapéuticamente eficaz" y sus afines se refieren a aquella cantidad de un ARN, ADN o producto de expresión de ADN y/o ARN que previene o retrasa el inicio o mejora los síntomas en un sujeto, o que logra un resultado biológico deseado, tal como la corrección de una neuropatología, por ejemplo de una patología celular asociada a una enfermedad de las motoneuronas, tal como la ELA. La expresión "corrección terapéutica" se refiere al grado de corrección que previene o retrasa el inicio o mejora los síntomas en un sujeto. La cantidad eficaz se puede determinar mediante procedimientos empíricos conocidos.

15

[0027] Una "composición" también pretende abarcar una combinación de agente activo y otro vehículo, por ejemplo un compuesto o composición inerte (por ejemplo, un agente o marca detectable) o activo, tal como un adyuvante, diluyente, aglutinante, estabilizador, tampones, sales, disolventes lipófilos, conservante, adyuvante y similares. Los vehículos también incluyen excipientes y aditivos farmacéuticos, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos y carbohidratos (por ejemplo, azúcares, que incluyen monosacáridos, di-, tri-, tetra- y oligosacáridos; azúcares derivatizados, tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcares), que pueden estar presentes solos o en combinación, representando, solos o en combinación, entre 1 y 99,99 % en peso o volumen. Ejemplos de excipientes proteicos incluyen albúmina de suero, como albúmina de suero humana (ASH), albúmina humana recombinante (AHR), gelatina, caseína y similares. Los representantes de los componentes de tipo aminoácido / anticuerpo, que también pueden presentar capacidad tamponante, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo y similares. Dentro del alcance de esta invención también se encuentran los excipientes de tipo carbohidrato, ejemplos de los cuales incluyen pero no se limitan a monosacáridos, tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y mioinositol.

20

25

30

35

[0028] El término "vehículo" incluye asimismo un tampón o un agente que ajusta el pH; típicamente, el tampón es una sal preparada a partir de un ácido o base orgánica. Los tampones representativos incluyen sales de ácidos orgánicos, tales como sales del ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; tampones Tris, hidrocloreuro de trometamina o fosfato. Otros vehículos incluyen excipientes / aditivos poliméricos, tales como polivinilpirrolidonas, ficolos (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil.-cuadratura.-ciclodextrina), polietilenglicoles, aromas, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, agentes tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos tales como "TWEEN 20" y "TWEEN 80"), lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol) y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).

40

45

[0029] Como se usa en la presente memoria, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" engloba cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales, como una solución salina tamponada con fosfato, agua y emulsiones tales como una emulsión de aceite / agua o de agua / aceite, y diversos tipos de agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizadores y conservantes y cualquiera de los vehículos señalados anteriormente, con la condición adicional de que sean aceptables para el uso *in vivo*. Para ejemplos de vehículos, estabilizadores y adyuvantes, véanse Martin REMINGTON'S PHARM. SCI. 15ª ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) y Williams & Williams (1995), y "PHYSICIAN'S DESK REFERENCE", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998).

50

55

[0030] En la presente memoria, "sujeto", "individuo" o "paciente" se usan indistintamente refiriéndose a un vertebrado, preferentemente a un mamífero, con especial preferencia a un ser humano. Los mamíferos incluyen pero no se limitan a ratones, ratas, simios, seres humanos, animales de granja, animales deportivos y mascotas.

60

[0031] Un "control" es un sujeto o muestra alternativa usada en un experimento con el propósito de comparación. Un control puede ser "positivo" o "negativo". Por ejemplo, cuando el propósito del experimento es determinar la correlación entre un nivel de expresión alterado de un gen y un tipo concreto de patología (véase ELA, por ejemplo, más adelante), generalmente es preferible usar un control positivo (un sujeto o una muestra de un sujeto que porta tal alteración y muestra síntomas característicos de esa enfermedad) y un control negativo (un sujeto o una muestra de un sujeto que carece de la expresión alterada y de síntomas clínicos de esa enfermedad).

65

[0032] Cuando se aplica a un gen, "expresado diferencialmente" se refiere a la producción diferencial de ARNm transcrito a partir de un gen o del producto proteico codificado por el gen. Un gen expresado diferencialmente puede estar expresado en exceso o expresado en defecto en comparación con el nivel de expresión de una célula normal o control. En un aspecto, se refiere a un diferencial que es al menos 1,5 veces o al menos 2,5 veces o, alternativamente, al menos 5 veces o, alternativamente, al menos 10 veces mayor o menor que el nivel de expresión detectado en una muestra control. La expresión "expresado diferencialmente" también se refiere a secuencias de nucleótidos de una célula o tejido que se expresan cuando son silenciosas en una célula control o no se expresan cuando se expresan en una célula control.

10

[0033] Como se usa en la presente memoria, el término "modular" significa variar la cantidad o intensidad de un efecto o resultado, por ejemplo potenciar, aumentar, disminuir o reducir.

[0034] Como se usa en la presente memoria, el término "mejorar" es sinónimo de "aliviar" y significa reducir o amainar. Por ejemplo, los síntomas de una enfermedad o un trastorno se pueden mejorar haciéndolos más soportables.

[0035] Cuando la transferencia génica es mediada por un vector vírico de ADN, tal como un adenovirus (Ad) o un virus adeno-asociado (VAA), una construcción vectorial se refiere al polinucleótido que comprende el genoma vírico, o parte de él, y un transgén. Los adenovirus (Ad) constituyen un grupo de virus homogéneo, relativamente bien caracterizado, que incluye más de 50 serotipos. Véase, por ejemplo, la solicitud internacional PCT nº WO 95/27071. Los Ad son fáciles de cultivar y no necesitan integrarse en el genoma de la célula huésped. También se han construido vectores derivados de Ad recombinantes, en particular aquellos que reducen el potencial para la recombinación y la generación de virus naturales. Véanse las solicitudes internacionales PCT nº WO 95/00655 y WO 95/11984. El VAA natural presenta una alta infectividad y especificidad integrándose en el genoma de la célula huésped. Véanse Hermonat y Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6466 – 6470, y Lebkowski y col. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 3988 – 3996.

[0036] El HIF-1 es una proteína heterodimérica compuesta por dos subunidades: (i) una subunidad beta (β) que se expresa de forma constitutiva (compartida con otros factores de transcripción relacionados) y (ii) una subunidad alfa (α) (véase, por ejemplo, el documento WO 96/39426, que describe la purificación por afinidad y la clonación molecular de HIF-1 α), cuya acumulación está regulada por un mecanismo postraduccional de manera que solo se pueden detectar niveles altos de la subunidad alfa en condiciones de hipoxia. Ambas subunidades son miembros de la familia de factores de transcripción con motivos hélice-bucle-hélice básicos (bHLH)-PAS. Estos dominios regulan la unión de ADN y la dimerización. Se cree que el dominio de transactivación se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína.

[0037] El HIF-1 está implicado en la regulación de una serie de genes diana (véase, por ejemplo, Bracken y col., Cell. Mol. Life Sci. 60 (2003) 1376 – 1393 para una revisión de los factores inducibles por hipoxia). Entre los genes diana para el HIF-1 se encuentran el VEGF y la eritropoyetina.

[0038] Para estabilizar el factor proteico inducible por hipoxia en condiciones normóxicas y obtener una activación transcripcional constitutiva alta, se puede usar, en el contexto de la presente invención, una proteína de fusión híbrida / quimérica formada por los dominios de unión a ADN y de dimerización de la HIF-1 α en el extremo amino-terminal y un dominio de activación de la transcripción funcional de una proteína activadora de la transcripción en el extremo carboxi-terminal. Para crear esta proteína de fusión, el dominio de transactivación endógeno de la HIF-1 α se sustituye por un dominio de transactivación heterólogo. En una realización, el dominio de transactivación procede de la proteína VP16 del virus del herpes simple (VHS). En la presente memoria se denomina construcción o construcción de fusión HIF-1-alfa-VP16. En otra realización, el dominio de transactivación es el dominio de transactivación del NF- κ B, que puede ser el dominio de transactivación del NF- κ B humano. En la presente memoria descriptiva se denomina construcción o construcción de fusión HIF-1-alfa-NF κ B. Se puede usar cualquier secuencia que codifique la HIF-1-alfa de mamíferos. El dominio de transactivación heterólogo también puede ser uno de los factores de transcripción de levaduras, como GAL4 y GCN4. Para la liberación en seres humanos se usan ventajosamente construcciones de HIF-1- α que comprenden secuencias codificantes humanas.

55

[0039] La hipoxia (un estado en el que la demanda tisular o celular de O₂ supera a la oferta) es un potente modulador de la expresión génica. La respuesta fisiológica a la hipoxia implica una mayor eritropoyesis (Jelkman, Physiol. Rev. 72: 449 – 489 (1992)), la neovascularización de tejidos isquémicos (White y col., Circ. Res. 71: 1490 – 1500 (1992)) y el cambio al metabolismo basado en la glucólisis (Wolfe y col., Eur. J. Biochem. 135: 405 – 412 (1983)). Estas respuestas adaptativas o bien aumentan el suministro de O₂ o bien activan rutas metabólicas alternativas que no requieren O₂. Los productos génicos involucrados en estos procesos incluyen, por ejemplo: (i) EPO, que codifica la eritropoyetina, el regulador principal de la eritropoyesis y, por lo tanto, un determinante importante de la capacidad de la sangre para llevar O₂ (Jiang y col., J. Biol. Chem. 271 (30): 17771 – 78 (1996)); (ii) VEGF, que codifica el factor de crecimiento endotelial vascular, un regulador principal de la angiogénesis y, por lo tanto, un determinante importante de la perfusión tisular (Levy y col., J. Biol. Chem. 270: 13333 (1995); Liu y col.,

65

- Circ. Res. 77: 638 (1995); Forsythe y col., Mol. Cell. Biol. 16: 4604 (1996)); (iii) ALDA, ENO1, LDHA, PFKL y PGK1, que codifican las enzimas glucolíticas aldolasa A, enolasa 1, lactato deshidrogenasa A, fosfofructoquinasa L y fosfoglicerato quinasa 1, respectivamente, las cuales proporcionan una ruta metabólica para la generación de ATP en ausencia de O₂ (Firth y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91: 6496 (1994); Firth y col., J. Biol. Chem. 270: 21021 (1995); Semenza y col., J. Biol. Chem. 269: 23757 (1994)); y (iv) HO1 e iNOS, que codifican la hemo oxigenasa 1 y la óxido nítrico sintasa inducible, las cuales son responsables de la síntesis de las moléculas vasoactivas monóxido de carbono y óxido nítrico, respectivamente (Lee y col., J. Biol. Chem. 272: 5375; Melillo y col., J. Exp. Med. 182: 1683 (1995)).
- 10 **[0040]** Un mediador importante de estas respuestas es la interacción de un complejo transcripcional que comprende un factor proteico de unión a ADN, inducible por hipoxia, con su sitio afín de reconocimiento de ADN, un elemento de respuesta a hipoxia (ERH) localizado dentro de los elementos promotores / potenciadores de los genes inducibles por hipoxia. Los ERH constan de un sitio de unión al factor proteico inducible por hipoxia (que contiene la secuencia consenso 5'-CGTG-3'), así como de secuencias de ADN adicionales necesarias para la función, que en
15 algunos elementos incluyen un segundo sitio de unión.
- [0041]** En una realización, la HIF-1 α es, por ejemplo, la HIF-1 α humana. En otra realización, el dominio de unión a ADN de la HIF-1 α comprende los aminoácidos 1-390 de la HIF-1 α humana.
- 20 **[0042]** Se indica que el dominio proteico capaz de activar la transcripción no deriva de un factor proteico inducible por hipoxia. En otra realización, el dominio proteico capaz de activar la transcripción deriva de una proteína seleccionada del grupo formado por: VP16 del VHS; NF κ B; un factor de choque térmico; p53; fos; v-jun; el factor EF-C; tat del VIH; E2 del VPH; Ad E1 α ; Sp1; AP1; CTF/NF 1; E2F 1; HAP1; HAP2; MCM1; PHO2; GAL4; GCN4; y GAL11.
25
- [0043]** En una realización, el dominio proteico capaz de activar la transcripción es sintético. En otra realización, el factor proteico inducible por hipoxia es la HIF-1 α (por ejemplo, la HIF-1 α humana) y el dominio proteico capaz de activar la transcripción es un dominio de activación de la transcripción procedente de la VP16 del VHS. En otra realización más, el factor proteico inducible por hipoxia es la HIF-1 α (por ejemplo, la HIF-1 α humana) y el dominio
30 proteico capaz de activar la transcripción es un dominio de activación de la transcripción procedente de NF κ B.
- [0044]** La presente memoria describe un procedimiento para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, que incluye la ELA, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína transactivadora quimérica, biológicamente activa que comprende el dominio de
35 unión a ADN de un factor proteico inducible por hipoxia y un dominio proteico capaz de activar la transcripción.
- [0045]** Se describe que la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína transactivadora quimérica biológicamente activa comprende el dominio de unión a ADN de un factor proteico inducible por hipoxia (HIF) y un dominio proteico capaz de activar la transcripción.
40
- [0046]** El HIF-1 es una proteína heterodimérica compuesta por dos subunidades: (i) una subunidad beta (β) que se expresa de forma constitutiva, conocida también como translocador nuclear del receptor de hidrocarburos arílicos (ARNT) (compartida con otros factores de transcripción relacionados (por ejemplo, el receptor de dioxina / hidrocarburos arílicos (DR/AhR)); y (ii) una subunidad alfa (α) (véase, por ejemplo, el documento WO 96/39426, la
45 solicitud internacional nº PCT/US96/10251, que describe la reciente purificación por afinidad y la clonación molecular de HIF-1 α), cuya acumulación está regulada por un mecanismo postraduccional de manera que solo se pueden detectar niveles altos de la subunidad alfa en condiciones de hipoxia. Ambas subunidades son miembros de la familia de factores de transcripción con motivos hélice-bucle-hélice básicos (bHLH)-PAS. Estos dominios regulan la unión de ADN y la dimerización. El dominio de transactivación se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína.
50 La región básica consta de aproximadamente 15 aminoácidos predominantemente básicos, responsables de la unión directa al ADN. Esta región es adyacente a dos hélices α anfipáticas separadas por un bucle de longitud variable que forma la interfase de dimerización primaria entre los miembros de la familia (Moore, A.W. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 10436-41 (2000)). El dominio PAS, denominado así por las tres primeras proteínas en las que se identificó (Per, ARNT y Sim), abarca 200 – 300 aminoácidos que contienen dos regiones bastante hidrófobas
55 poco conservadas de aproximadamente 50 aminoácidos, denominadas PAS A y PAS B.
- [0047]** Mientras que la HIF-1 β (ARNT) se expresa de forma constitutiva en grandes cantidades, la acumulación del HIF-1 en la célula es sensible a la concentración de O₂, de manera que solo se detectan niveles elevados durante la hipoxia. Esta observación ha llevado a proponer un mecanismo para la activación del gen diana por medio del cual
60 la concentración de O₂ se detecta mediante una proteína sensora y, a través de un mecanismo de señalización complejo, conduce a la estabilización de la subunidad HIF-1 α . La HIF-1 α se encuentra entonces disponible para complejarse con la HIF-1 β y unirse selectivamente a los sitios ERH en el promotor / potenciador del (los) gen (es) diana. Se piensa que las regiones de la proteína HIF-1 α implicadas en conferir esta respuesta coinciden con las regiones implicadas en la transactivación.
65

- [0048]** Se cree que la inducción de la actividad del HIF-1 en respuesta a hipoxia se produce mediante la estabilización de la proteína HIF-1 α . Las regiones de la HIF-1 α implicadas en esta respuesta se han localizado en el extremo C-terminal de la proteína y se solapan con el dominio de transactivación. Por ejemplo, Jiang y col., *J. Biol. Chem.* 271 (30): 17771 – 78 (1996), demostraron que la HIF-1 α truncada en el aminoácido 390 perdía la actividad de transactivación pero retenía la capacidad de unirse a ADN y mostraba altos niveles de proteína en condiciones tanto normóxicas como hipóxicas. Este resultado ha demostrado que el dominio de transactivación y la región que confiere inestabilidad bajo normoxia se encuentran en la mitad C-terminal de la proteína. Pugh y col., *J. Biol. Chem.* 272 (17): 11205 – 14 (1997), han localizado, además, las regiones implicadas en dos áreas, los aminoácidos 549 – 582 y 775 – 826.
- [0049]** Un dominio de aproximadamente 200 aminoácidos, denominado "dominio de degradación dependiente de oxígeno" (ODD), media la degradación de la HIF-1 α (Huang, L., J. Gu, M. Schau y H. Bunn. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7987 – 92). La delección del ODD (HIF-1 α □ODD) da lugar a una HIF-1 α activa de forma constitutiva, independientemente de la concentración de oxígeno (Huang, L., J. Gu, M. Schau y H. Bunn. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7987 – 92; patente de Estados Unidos nº 6,124,131).
- [0050]** La presente memoria describe moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas transactivadoras quiméricas biológicamente activas que comprenden un dominio de la proteína HIF-1 α suficiente para la unión al ADN y la dimerización con la HIF-1 β (ARNT) y un dominio proteico capaz de activar la transcripción.
- [0051]** En ratones se producen dos transcritos de la HIF-1 α (I.1 y I.2) a partir de promotores diferentes en vez de por ajuste alternativo (Wenger, R. H., y col., *Eur. J. Biochem.* 246: 155 – 65 (1997)). Ambos transcritos se traducen eficazmente de forma independiente de oxígeno, pero difieren en que el transcrito I.1 codifica una proteína que carece de los 12 primeros aminoácidos amino-terminales y cuya expresión está restringida a ciertos tejidos, mientras que el I.2 se expresa de forma ubicua y codifica una proteína de longitud completa. Aparte de estas diferencias, no se ha observado ninguna especificidad en la actividad de unión a ADN o de transactivación (Wenger, R. H., y col., *Blood* 91: 3471 – 80 (1998); Gorchach, A., y col., *Biochem Biophys. Acta* 1493: 125 – 134 (2000)). En humanos también se han observado varias variantes de ajuste de la HIF-1 α . Por ejemplo, se ha descubierto que una variante de ajuste de la HIF-1 α que carece del exón 14 está presente en la piel y en varias líneas celulares (Gothie, E., y col., *J. Biol. Chem.* 275: 6922 – 27 (2000)). Esto conduce a un desplazamiento del marco de lectura y codifica una proteína más corta (736 aminoácidos), la cual, aunque sigue siendo inducible por hipoxia, carece de un TAD carboxi-terminal y, por lo tanto, es menos activa que la HIF-1 α natural (Gothie, E., y col., *J. Biol. Chem.* 275: 6922 – 27 (2000)). También se ha identificado una isoforma dominante negativa que carece de los exones 11 y 12 y que codifica una proteína que presenta una longitud de 516 aminoácidos, es estable bajo normoxia y no muestra transactivación (Chun, Y. S., y col., *Biochem. J.* 362: 71 – 79 (2002)). Además, una variante de ajuste inducida por cinc que carece del exón 12 actúa también como dominante negativo, inhibiendo la actividad del HIF mediante la unión a ARNT y evitando su acumulación nuclear (Chun, Y. S., y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268: 652 – 56 (2000)).
- [0052]** Las secuencias representativas de la HIF-1 α humana incluyen, por ejemplo, los números de acceso a Genbank NM_001530 (variante de transcrito 1) y NM_181054 (variante de transcrito 2). Las secuencias representativas de la subunidad HIF-1 β humana incluyen, por ejemplo, los números de acceso a Genbank NM_001668 (variante de transcrito ARNT 1), NM_178426 (variante de transcrito ARNT 2) y NM_178427 (variante de transcrito ARNT 3).
- [0053]** Poco después de que se clonara la HIF-1 α se identificó una proteína estrechamente relacionada, la HIF-2 α (denominada también PAS endotelial (EPAS), factor relacionado con HIF (HRF) y miembro de la superfamilia PAS 2 (MOP2)) (Tian, H., y col., *Genes Dev.* 11: 72 – 82 (1997); Ema, M., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4273 – 78 (1997); Flamme, I., y col., *Mech. Dev.* 63: 51 – 60 (1997); Hogenesch, J. B., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5474 – 79 (1998)). La HIF-2 α muestra una identidad de aminoácidos del 48 % con el HIF-1 α y menos similitud con otros miembros de la familia de factores de transcripción con el dominio bHLH/PAS (secuencias representativas de la HIF-2 α humana son los números de acceso a Genbank NM_001430 y U81984; una secuencia representativa de la HIF-2 α de ratón es el número de acceso a Genbank U81983). Se ha descubierto que la HIF-2 α , igual que la HIF-1 α , se heterodimeriza con ARNT y se une a los ERH (Tian, H., y col., *Genes Dev.* 11: 72 – 82 (1997); Ema, M., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4273 – 78 (1997)). El análisis de delección ha demostrado que tanto la HIF-1 α como la HIF-2 α comparten una arquitectura de dominios funcional común. Específicamente, la HIF-1 α y la HIF-2 α poseen, además de los dominios amino-terminales bHLH y PAS, dos dominios de transactivación (TAD) separados por una región denominada dominio inhibidor (ID), que es responsable de la represión normóxica de la actividad de los TAD. Los TAD amino-terminales (N-TAD) se solapan con un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) que confiere estabilidad normóxica a las proteínas HIF α (Bracken, C.P., y col., *CMLS. Cell. Mol. Life Sci.* 60: 1376 – 93 (2003)).
- [0054]** Las HIF-2 α humana y murina muestran una amplia identidad de la secuencia de aminoácidos primaria con la HIF-1 α (48 %). La conservación de secuencias entre las dos proteínas es máxima en las regiones bHLH (85 %),

PAS-A (68 %) y PAS-B (73 %). Una segunda región de identidad de secuencias se encuentra en los extremos C-terminales de las proteínas HIF-1 α y HIF-2 α . Se ha demostrado que esta región conservada en la HIF-1 α murina contiene un dominio de respuesta a hipoxia (Li y col., *J. Biol. Chem.* 271 (35): 21262 – 67 (1996)). El alto grado de similitud de secuencia entre la HIF-1 α y la HIF-2 α sugiere que comparten función (es) fisiológica (s) común (es). Las condiciones de hipoxia estimulan la capacidad de la HIF-1 α para transactivar los genes diana que contienen la secuencia consenso de los ERH. La actividad de la HIF-2 α también es más intensa en células que crecen en condiciones de hipoxia.

[0055] Los patrones de expresión de ARN han revelado que tanto la HIF-1 α como la HIF-2 α se expresan de forma prácticamente ubicua e independiente de oxígeno en los tejidos humanos y de ratón (Tian, H., y col., *Genes Dev.* 11: 72 – 82 (1997); Ema, M., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4273 – 78 (1997); Flamme, I., y col., *Mech. Dev.* 63: 51 – 60 (1997); Wenger, R. H., y col., *Kidney Int.* 51: 560 – 63 (1997); Wiesener, M.S., y col., *Blood* 92: 2260 – 68 (1998)). El análisis del patrón de expresión citoespecífico ha revelado, sin embargo, que, al contrario que la HIF-1 α ubicua, el ARNm de la HIF-2 α se expresa predominantemente en tipos celulares específicos, como en células endoteliales, epiteliales, neuronales, fibroblastos y macrófagos (Bracken, C. P., y col., *CMLS. Cell. Mol. Life Sci.* 60: 1376 – 93 (2003)).

[0056] Asimismo se ha descubierto un tercer gen de la HIF α , denominado HIF-3 α . Al igual que la HIF-1 α y la HIF-2 α , la HIF-3 α se expresa en una diversidad de tejidos, se dimeriza con ARNT, se une a las secuencias de ADN de los ERH y regula por aumento la expresión de reporteros de manera inducible por hipoxia y dependiente de ARNT (Gu, Y. Z., y col., *Gene Expr.* 7: 205 – 13 (1998)). Se ha identificado una variante de ajuste de la HIF-3 α , denominada PAS inhibidora (IPAS). La IPAS parece carecer de una actividad de transactivación endógena pero actúa de regulador dominante negativo del HIF, interactuando con la región amino-terminal de la HIF-1 α y evitando la unión a ADN. Secuencias representativas de la HIF-3 α humana son los números de acceso a Genbank NM_152794 (variante 1 del transcrito de HIF-3 α), NM_152794 (variante 2 del transcrito de HIF-3 α) y NM_022462 (variante 3 del transcrito de HIF-3 α).

[0057] En la presente memoria, y como es evidente para los expertos en la técnica, se describen las secuencias de HIF-1 α , HIF-2 α y/o HIF-3 α , incluyendo las secuencias de cualquier variante de ajuste conocida o descubierta.

[0058] Se ha descubierto mucho acerca de la regulación de la HIF- α . El recambio normóxico de la HIF- α es muy rápido y, como resultado, la proteína HIF- α esencialmente no se puede detectar en condiciones normóxicas (Wang, G. L., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5510 – 14 (1995); Yu, A.Y., y col., *Am. J. Physiol.* 275: L818 – L926 (1998); Huang, L.E., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7987 – 92 (1998)). Esta estabilidad normóxica está controlada por el ODDD central de 200 aminoácidos que se solapa con el N-TAD (Huang, L.E., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7987 – 92 (1998)). La rápida acumulación de HIF-1 α y HIF-2 α que se produce bajo hipoxia es mediada por un aumento de la estabilidad de la proteína. Por el contrario, la presión de oxígeno no presenta un efecto importante en la transcripción o traducción de la HIF- α (Wenger, R. H., y col., *Kidney Int.* 51: 560 – 63 (1997); Huang, L.E., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7987 – 92 (1998); Huang, L.E., y col., *J. Biol. Chem.* 271: 32253 – 59 (1996); Powell, J. D., y col., *Biol. Reprod.* 67: 995 – 1002 (2002); Kallio, P. J., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5667 – 72 (1997)). De forma similar, el oxígeno no afecta significativamente a los niveles de ARNm o proteicos de ARNT, que se expresan de forma constitutiva (Huang, L.E., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7987 – 92 (1998); Huang, L.E., y col., *J. Biol. Chem.* 271: 32253 – 59 (1996); Kallio, P. J., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5667 – 72 (1997)).

[0059] La inestabilidad normóxica de la HIF- α es mediada por poliubiquitinación y degradación siguiente por el proteasoma. Esto se ha demostrado usando inhibidores del proteasoma o mutaciones de la enzima activadora de ubiquitina E1 (Huang, L.E., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7987 – 92 (1998); Kallio, P. J., y col., *J. Biol. Chem.* 274: 6519 – 25 (1999)). Así, la HIF- α se poliubiquitina bajo normoxia, disminuyendo el grado de ubiquitinación bajo hipoxia (Huang, L.E., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7987 – 92 (1998); Kallio, P. J., y col., *J. Biol. Chem.* 274: 6519 – 25 (1999); Sutter, C. H., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4748 – 56 (2000)). Además, se ha demostrado que la HIF-1 α interactúa físicamente con la subunidad proteosomal 20S PSMA7 (Cho, S., y col., *FEBS Lett.* 498: 62 – 66 (2001)).

[0060] La proteína supresora de tumores del síndrome de von Hippel-Lindau (VHL) es un componente de un complejo ubiquitina-proteína ligasa E3 que contiene las elonginas B y C, Cullin 2 y Rbx1, y ésta es la capacidad por medio de la cual la VHL media la degradación proteasomal de HIF-1 α y HIF-2 α (Lisztwan, J., y col., *Genes Dev.* 13: 1822 – 33 (1999)). Esto lo demuestra el descubrimiento de que, en condiciones normóxicas, la HIF-1 α es estable en células deficientes en VHL, pero la estabilidad normóxica de la proteína se restablece tras la transfección con VHL (Maxwell, P. H., y col., *Nature* 399: 271 – 75 (1999); Cockman, M.E., y col., *J. Biol. Chem.* 275: 25733 – 741 (2000)). La VHL es capaz de ejercer este efecto uniéndose bajo normoxia a los aminoácidos 517 – 571 ó 380 – 417 de la HIF-1 α (los aminoácidos 517-534 y 383-418 de la HIF-2 α) a través de su dominio β , mientras que el dominio α se une a las elonginas. La ubiquitina se transfiere después a restos del HIF, marcando la proteína para la degradación proteasomal (Cockman, M.E., y col., *J. Biol. Chem.* 275: 25733 – 741 (2000); Ohh, M., y col., *Nat. Cell Biol.* 2: 423 –

27 (2000); Tanimoto, K., y col., *EMBO J.* 19: 4298 – 4309 (2000); Masson, N., y col., *EMBO J.* 20: 5197 – 5206 (2001); Srinivas, V., y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260: 557 – 61 (1999)).

5 **[0061]** Se ha descubierto que la unión de la VHL al HIF bajo normoxia, y por tanto el principal mecanismo por medio del cual se confiere inestabilidad a la proteína HIF, es mediada por la hidroxilación irreversible de dos restos de prolina (P402 y P564 en la HIF-1 α , P405 y P530 en la HIF-2 α) (Jaakkola, P., y col., *Science* 292: 468 – 72 (2001); Ivan, M., y col., *Science* 292: 464 – 68 (2001); Yu, F., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9630 – 35 (2001); Chan, D. A., y col., *J. Biol. Chem.* 277: 40112 – 17 (2002)). Estos restos se hidroxilan únicamente bajo normoxia, permitiendo la unión de alta afinidad de la VHL al HIF (Min, J.H., y col., *Science* 296: 1886 – 89 (2002)). La
10 identificación de eg19, una HIF proilil-hidroxilasa de *Caenorhabditis elegans*, permitió la clonación de tres homólogos de mamífero denominados proteínas que contienen el dominio proilil-hidroxilasa (PHD) 1, 2 y 3, o HIF proilil-hidroxilasas (HPH) 3, 2 y 1, respectivamente (Bruick, R.K., y col., *Science* 294: 1337 – 40 (2001); Epstein, A.C., y col., *Cell* 107: 43 – 54 (2001); Ivan, M., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13459 – 464 (2002); Lieb, M. E., y col., *Biochem. Cell Biol.* 80: 421 – 426 (2002); Huang, J., y col., *J. Biol. Chem.* 277: 39792 – 800 (2002)). También se ha
15 identificado una cuarta PHD/HPH que se expresa ampliamente (Oehme, F., y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296 (2): 343 – 49 (2002)).

[0062] Las PHD/HPH son enzimas dependientes de 2-oxogluterato que requieren oxígeno (O₂) para la hidroxilación. Contienen hierro unido a dos restos de histidina y a uno de ácido aspártico que, cuando se mantiene
20 en su estado ferroso mediante ascorbato, se une a dioxígeno. Un oxígeno se transfiere al resto de prolina diana del HIF; el segundo reacciona con 2-oxogluterato para producir succinato y dióxido de carbono. Así, en ausencia de oxígeno, no hay actividad enzimática, no se modifican los restos de prolina del HIF y no se produce la unión VHL/HIF, lo que provoca la estabilización de la proteína HIF- α .

25 **[0063]** Por lo tanto, es probable que las PHD/HPH funcionen como sensores directos de oxígeno en las células que modulan directamente el HIF en respuesta a la concentración fisiológica de oxígeno (Bracken, C.P., y col., *CMLS. Cell. Mol. Life Sci.* 60: 1376 – 93 (2003)).

[0064] En la presente memoria se describen las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas
30 transactivadoras quiméricas que comprenden un dominio de un factor proteico inducible por hipoxia no mamífero. Como reconocerá el experto en la técnica, la respuesta adaptativa a la hipoxia es probable que se haya conservado a lo largo de la evolución. Por consiguiente, cabe esperar que los factores proteicos inducibles por hipoxia estén presentes en una gran variedad de especies, que incluyen vertebrados no mamíferos e invertebrados, tales como insectos. Véase, por ejemplo, Bacon y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 249: 811 – 816 (1998), que describe la
35 similitud funcional entre la proteína Sima hélice-bucle-hélice básica PAS de *Drosophila* y la proteína HIF-1 α de mamíferos.

[0065] El experto en la técnica podrá obtener las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos para los factores
40 proteicos inducibles por hipoxia no mamíferos mediante una diversidad de técnicas, por ejemplo mediante hibridación cruzada y amplificación, usando las secuencias completas mencionadas en la presente memoria o parte de ellas. Una vez determinada la secuencia que codifica un candidato para el factor proteico inducible por hipoxia, se puede determinar la localización de las regiones de la proteína que son suficientes para la unión a los ERH y la dimerización con HIF-1 β usando, por ejemplo, los mismos tipos de técnicas usados para determinar la ubicación de aquellos dominios dentro de la proteína HIF-1 α humana. Los dominios relevantes de los factores proteicos
45 inducibles por hipoxia no mamíferos se pueden producir sintéticamente o mediante manipulaciones dirigidas del ADN que codifica los factores proteicos inducibles por hipoxia conocidos de mamífero. También cabe esperar que los motivos de secuencia comunes a diversos factores proteicos inducibles por hipoxia mamíferos y no mamíferos sugieran secuencias consenso que, aunque tal vez no existan de forma natural en todas las especies, den lugar aun así a dominios apropiados. Todo esto es necesario para sustituir los dominios de la proteína HIF-1 α humana por
50 tales dominios del factor proteico inducible por hipoxia no mamífero. En la presente memoria se ejemplifica que éstos son capaces de unirse a los ERH y de dimerizarse con HIF-1 β (ARNT).

[0066] Por ejemplo, aunque la subunidad HIF-1 α es inestable en condiciones normóxicas, la expresión en exceso
55 de esta subunidad en células cultivadas a concentraciones de oxígeno normales es capaz de inducir la expresión de genes inducidos normalmente por hipoxia. Una estrategia alternativa sería modificar la subunidad HIF-1 α de manera que ya no se desestabilice en condiciones normóxicas, por lo que sería más potente en un intervalo de condiciones de oxígeno.

[0067] La sustitución de la región C-terminal (o de transactivación) del factor proteico inducible por hipoxia por un
60 dominio de transactivación potente procedente de una proteína activadora de la transcripción, como, por ejemplo, la VP16 del virus del herpes simple (VHS), el NF κ B o los factores de transcripción GAL4 y GCN4 de levaduras, está diseñada para estabilizar la proteína en condiciones normóxicas y proporcionar una activación transcripcional constitutiva potente.

65 **[0068]** Para estabilizar el factor proteico inducible por hipoxia en condiciones normóxicas y para proporcionar una

activación transcripcional constitutiva potente, se construyó una proteína de fusión híbrida / quimérica formada por los dominios de unión a ADN y de dimerización de la HIF-1 α y el dominio de transactivación de la proteína VP16 del virus del herpes simple (VHS). La administración de este híbrido / quimera a las células de un sujeto mediante terapia génica induce la expresión de genes que normalmente están regulados por aumento en respuesta a hipoxia (es decir, VEGF y similares). Se ha demostrado que una HIF-1 α híbrida estable constitutivamente es eficaz en el tratamiento de pacientes isquémicos (patentes de Estados Unidos nº 6,432,927 y 7,053,062, que se incorporan íntegramente en la presente memoria por referencia).

[0069] La administración de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína transactivadora quimérica biológicamente activa que comprende el dominio de unión a ADN de un factor proteico inducible por hipoxia (por ejemplo, HIF-1 α) y un dominio proteico capaz de activar la transcripción (por ejemplo, un dominio de activación transcripcional de la VP16 del VHS, un dominio de activación transcripcional del NF κ B) puede tratar trastornos motores neurodegenerativos en un paciente que lo necesite. En una realización, el dominio de unión a ADN es un dominio de unión a ADN de la HIF-1 α , y el dominio proteico capaz de activar la transcripción es un dominio de activación transcripcional de la VP16 del VHS. Una secuencia de ácido nucleico ADNc representativa de una construcción HIF-1 α -VP16 de este tipo, que contiene el dominio de unión a ADN y el dominio de dimerización con HIF-1 β de la HIF-1 α y el dominio de activación transcripcional de la VP16 del VHS, es la siguiente:

20

Continúa en página siguiente

ATGGAGGGCGCCGGCGGCGCGAACGACAAGAAAAAGATAAGTTCT
 GAACGTCGAAAAGAAAAGTCTCGAGATGCAGCCAGATCTCGGCGA
 AGTAAAGAATCTGAAGTTTTTTATGAGCTTGCTCATCAGTTGCCACT
 TCCACATAATGTGAGTTCGCATCTTGATAAGGCCTCTGTGATGAGG
 CTTACCATCAGCTATTTGCGTGTGAGGAACTTCTGGATGCTGGTG
 ATTTGGATATTGAAGATGACATGAAAGCACAGATGAATTGCTTTTA
 TTTGAAAGCCTTGGATGGTTTTTGTATGGTTCTCACAGATGATGGTG
 ACATGATTTACATTTCTGATAATGTGAACAAATACATGGGATTAAC
 TCAGTTTGAACATACTGGACACAGTGTGTTTGATTTTACTCATCCAT
 GTGACCATGAGGAAATGAGAGAAATGCTTACACACAGAAATGGCC
 TTGTGAAAAAGGGTAAAGAACAAAACACACAGCGAAGCTTTTTTCT
 CAGAATGAAGTGTACCCTAACTAGCCGAGGAAGAACTATGAACAT
 AAAGTCTGCAACATGGAAGGTATTGCACTGCACAGGCCACATTCAC
 GTATATGATACCAACAGTAACCAACCTCAGTGTGGGTATAAGAAAC
 CACCTATGACCTGCTTGGTGCTGATTTGTGAACCCATTCCTCACCCA
 TCAAATATTGAAATTCCTTTAGATAGCAAGACTTTCCTCAGTCGAC
 ACAGCCTGGATATGAAATTTTCTTATTGTGATGAAAGAATTACCGA
 ATTGATGGGATATGAGCCAGAAGAACTTTTAGGCCGCTCAATTTAT
 GAATATTATCATGCTTTGGACTCTGATCATCTGACCAAACTCATC
 ATGATATGTTTACTAAAGGACAAGTCACCACAGGACAGTACAGGA
 TGCTTGCCAAAAGAGGTGGATATGTCTGGGTTGAAACTCAAGCAAC
 TGTCACATATAACACCAAGAATTCTCAACCACAGTGCATTGTATGT
 GTGAATTACGTTGTGAGTGGTATTATTCAGCACGACTTGATTTTCTC
 CCTTCAACAAACAGAATGTGTCCTTAAACCGGTTGAATCTTCAGAT
 ATGAAAATGACTCAGCTATTCACCAAAGTTGAATCAGAAGATACA
 AGTAGCCTCTTTGACAACTTAAGCCGGAATTCCCGGGGATCTGGG
 CCCCCCGACCGATGTCAGCCTGGGGGACGAGCTCCACTTAGACGG
 CGAGGACGTGGCGATGGCGCATGCCGACGCGCTAGACGATTTCGA
 TCTGGACATGTTGGGGGACGGGGATTCCCGGGGCCGGGATTTACC
 CCCCACGACTCCGCCCCCTACGGCGCTCTGGATATGGCCGACTTCG

 AGTTTGAGCAGATGTTTACCGATGCCCTTGGAAATTGACGAGTACGG
 TGGGTAG (SEQ ID NO: 1).

[0070] En esta secuencia de ácidos nucleicos representativa, la secuencia de los dominios de unión a ADN de la HIF-1 α y de dimerización con la HIF-1 β es la siguiente:

ATGGAGGGCGCCGGCGGCGCGAACGACAAGAAAAAGATAAGTTCT
GAACGTCGAAAAGAAAAGTCTCGAGATGCAGCCAGATCTCGGCGA
AGTAAAGAATCTGAAGTTTTTTATGAGCTTGCTCATCAGTTGCCACT
TCCACATAATGTGAGTTCGCATCTTGATAAAGCCTCTGTGATGAGG
CTTACCATCAGCTATTTGCGTGTGAGGAAACTTCTGGATGCTGGTG
ATTTGGATATTGAAGATGACATGAAAGCACAGATGAATTGCTTTTA
TTTGAAAGCCTTGGATGGTTTTTGTATGGTTCTCACAGATGATGGTG
ACATGATTTACATTTCTGATAATGTGAACAAATACATGGGATTAAC
TCAGTTTGAACATACTGGACACAGTGTGTTTGATTTTACTCATCCAT
GTGACCATGAGGAAATGAGAGAAATGCTTACACACAGAAATGGCC
TTGTGAAAAAGGGTAAAGAACAAAACACACAGCGAAGCTTTTTTCT
CAGAATGAAGTGTACCCTAACTAGCCGAGGAAGAACTATGAACAT
AAAGTCTGCAACATGGAAGGTATTGCACTGCACAGGCCACATTCAC
GTATATGATACCAACAGTAACCAACCTCAGTGTGGGTATAAGAAAC
CACCTATGACCTGCTTGGTGCTGATTTGTGAACCCATTCCTCACCCA
TCAAATATTGAAATTCCTTTAGATAGCAAGACTTTCCTCAGTCGAC
ACAGCCTGGATATGAAATTTTCTTATTGTGATGAAAGAATTACCGA
ATTGATGGGATATGAGCCAGAAGAACTTTTAGGCCGCTCAATTTAT
GAATATTATCATGCTTTGGACTCTGATCATCTGACCAAAACTCATC
ATGATATGTTTACTAAAGGACAAGTCACCACAGGACAGTACAGGA
TGCTTGCCAAAAGAGGTGGATATGTCTGGGTTGAAACTCAAGCAAC
TGTCACATATAACACCAAGAATTCTCAACCACAGTGCATTGTATGT
GTGAATTACGTTGTGAGTGGTATTATTCAGCACGACTTGATTTTCTC
CCTTCAACAAACAGAATGTGTCCTTAAACCGGTTGAATCTTCAGAT
ATGAAAATGACTCAGCTATTCACCAAAGTTGAATCAGAAGATACA
AGTAGCCTCTTTGACAAACTTAAG (SEQ ID NO: 2).

[0071] En esta secuencia representativa, la secuencia del dominio de activación transcripcional de la VP16 del VHS es la siguiente:

5

CCGGAATTCCCGGGGATCTGGGCCCCCCCGACCGATGTCAGCCTGG
 GGGACGAGCTCCACTTAGACGGCGAGGACGTGGCGATGGCGCATG
 CCGACGCGCTAGACGATTTGATCTGGACATGTTGGGGGACGGGG
 ATTCCCCGGGGCCGGGATTTACCCCCACGACTCCGCCCCCTACGG
 CGCTCTGGATATGGCCGACTTCGAGTTTGAGCAGA
 CCGGAATTCCCGGGGATCTGGGCCCCCCCGACCGATGTCAGCCTGG
 GGGACGAGCTCCACTTAGACGGCGAGGACGTGGCGATGGCGCATG
 CCGACGCGCTAGACGATTTGATCTGGACATGTTGGGGGACGGGG
 ATTCCCCGGGGCCGGGATTTACCCCCACGACTCCGCCCCCTACGG
 CGCTCTGGATATGGCCGACTTCGAGTTTGAGCAGATGTTTACCGAT
 GCCCTTGAATTGACGAGTACGGTGGGTAG (SEQ ID NO: 3).

[0072] La invención abarca otros ácidos nucleicos que codifican proteínas transactivadoras quiméricas biológicamente activas, por ejemplo una proteína que comprende los dominios de unión a ADN y de dimerización de la HIF-1 α y el dominio de transactivación de una proteína NF κ B (por ejemplo, una proteína NF κ B humana).

[0073] Los factores de transcripción eucariotas se componen con frecuencia de dominios de unión a ADN y activadores de la transcripción separados e independientes (Mitchell y Tjian, *Science* 245: 371 – 378 (1989)). La independencia de los dominios ha permitido la creación de proteínas de fusión funcionales formadas por los dominios de unión a ADN y de activación de proteínas heterólogas. Brent y Ptashne (*Nature* 312: 612 – 615 (1985)) construyeron proteínas reguladoras eucariotas quiméricas formadas por la proteína de unión a ADN lexA y el dominio de activación del factor de transcripción de levaduras GAL4. Mediante el uso de proteínas de fusión se han identificado varios tipos de dominios proteicos que actúan de activadores de la transcripción. Estos dominios poseen poca similitud de aminoácidos, pero a menudo se caracterizan por ser altamente ácidos (como en el caso de GAL4 y GNC4), ricos en glutamina (como en el caso de Sp1) o ricos en prolina (como en el caso de NF1, Ma y Ptashne, *Cell* 51: 113 – 119 (1987); Courey y Tjian (1988); Mermod y col., *Cell* 58: 741 – 753 (1989)).

[0074] Uno de los dominios activadores conocidos más eficaces está contenido en los 100 aminoácidos carboxi-terminales de la proteína del virión 16 (VP16) del virus del herpes simple (VHS) (Sadowski y col., *Nature* 335: 563 – 564 (1988); Triezenberg y col., *Genes & Dev.* 2: 718 – 729 (1988)). La VP16, conocida también como Vmw65 o factor alfa-trans-inductor de genes, es una proteína estructural del VHS que activa la transcripción de los promotores tempranos inmediatos del virus, incluidos los de ICPO e ICP4 (Campbell y col., *J. Mol. Biol.* 180: 1 – 19 (1984); Kristie y Roizman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4065 – 4069 (1984); Pellet y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5870 – 5874 (1985)). Aunque la VP16 activa específicamente promotores que contienen el denominado elemento TAATGARAT, la especificidad es creada por una proteína (s) celular de unión a ADN que se compleja con el (los) dominio (s) amino-terminal (es) de la VP16 (McKnight y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7061 – 7065 (1987); Preston y col., *Cell* 52: 425 – 434 (1988)).

[0075] La presente memoria proporciona ácidos nucleicos que codifican proteínas transactivadoras híbridas / quiméricas que comprenden una porción funcional de una proteína de unión a ADN y una porción funcional de una proteína activadora de la transcripción. Estas proteínas transactivadoras híbridas / quiméricas ofrecen una multitud de ventajas, como la activación específica de la expresión de genes inducibles por hipoxia que contienen elementos de respuesta a hipoxia (ERH), alcanzando de este modo niveles de expresión génica excepcionalmente elevados. Los ácidos nucleicos que codifican tales proteínas transactivadoras híbridas / quiméricas son capaces de funcionar en células de vertebrados y pueden codificar proteínas o dominios de proteínas transactivadores de la transcripción presentes en la naturaleza (por ejemplo, proteínas o dominios transactivadores de la transcripción presentes en la naturaleza y procedentes de células eucariotas, incluidas las células de vertebrados), proteínas o dominios transactivadores víricos o cualquier secuencia de aminoácidos sintética que sea capaz de estimular la transcripción a partir de un promotor de vertebrado. Ejemplos de tales proteínas transactivadoras incluyen pero no se limitan al factor de transcripción específico de linfocitos identificado por Muller y col. (*Nature* 336: 544 – 551 (1988)), la proteína fos (Lucibello y col., *Oncogene* 3: 43 – 52 (1988)); la proteína v-jun (Bos y col., *Cell* 52: 705 – 712 (1988)); el factor EF-C (Ostapchuk y col., *Mol. Cell. Biol.* 9: 2787 – 2797 (1989)); la proteína tat del VIH-1 (Arya y col., *Science* 229: 69 – 73 (1985)), la proteína E2 del papilomavirus (Lambert y col., *J. Virol.* 63: 3151 – 3156 (1989)), la proteína E1A del adenovirus (revisión en Flint y Shenk, *Ann. Rev. Genet.* (1989)), factores de choque térmico (HSF1

y HSF2) (Rabindran y col., PNAS 88: 6906 – 6910 (1991)); la proteína p53 (Levine, Cell 88: 323 – 331 (1997), Ko y Prives, Genes Dev. 10: 1054 – 1072 (1996)); Sp 1 (Kadonaga y col., Cell 51: 1079 – 1090 (1987)); AP1 (Lee y col., Nature 325: 368 – 372 (1987)); CTF/NF1 (Mermod y col., Cell 58: 741 – 753 (1989)); E2F1 (Neuman y col., Gene 173: 163 – 169 (1996)); HAP1 (Pfeifer y col., Cell 56: 291 – 301 (1989)); HAP2 (Pinkham y col., Mol. Cell. Biol. 7: 578 – 585 (1987)); MCM1 (Passmore y col., J. Mol. Biol. 204: 593 – 606 (1988)); PHO2 (Sengstag y Hinnen, NAR 15: 233 – 246 (1987)); y GAL11 (Suzuki y col., Mol. Cell. Biol. 8: 4991 – 4999 (1988)). En realizaciones concretas de la invención, la proteína transactivadora es la VP16 del virus del herpes simple (Sadowski y col., Nature 335: 563 – 564 (1988)); Triezenberg y col., Genes and Dev. 2: 718 – 729 (1988)), NF.kappa.B (Schmitz y Baeuerle, EMBO J. 10: 3805 – 3817 (1991); Schmitz y col., J. Biol. Chem. 269: 25613 – 25620 (1994); y Schmitz y col., J. Biol. Chem. 270: 15576 – 15584 (1995)) y los activadores GAL4 y GCN4 de levaduras.

[0076] Naturalmente, el experto en la técnica entenderá que los dominios de activación transcripcional útiles en las composiciones de esta invención también pueden ser sintéticos, es decir, basados en una secuencia que no está contenida en una proteína conocida presente en la naturaleza. Véase, por ejemplo, Pollock y Gilman, PNAS 94: 13388 – 13389 (1997), que enseñan que la activación transcripcional es un proceso inherentemente flexible en el que se exige poco, o nada, en cuanto a estructuras específicas o contactos proteicos estereoespecíficos. También revisa la variedad de moléculas diferentes que pueden funcionar como activadores de la transcripción y que incluyen motivos peptídicos cortos (de tan solo ocho aminoácidos), hélices anfipáticas simples e incluso dominios mutagenizados de proteínas no relacionadas con la activación transcripcional.

[0077] De acuerdo con la invención, las secuencias de ácido nucleico que codifican un dominio de unión a ADN y un dominio de transactivación se combinan de manera que conserven las propiedades respectivas de unión y de transactivación de cada uno de los dominios. En diversas realizaciones de la invención, el ácido nucleico que codifica la proteína transactivadora, o una parte de ella capaz de activar la transcripción, se puede insertar en el ácido nucleico en un locus que no destruya por completo la función del dominio de unión a ADN codificado. Las regiones de los factores proteicos inducibles por hipoxia que no son necesarias para las funciones de unión a ADN y de dimerización y las regiones de las proteínas que no son necesarias para la función de transactivación transcripcional son conocidas y/o se pueden identificar mediante procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, el análisis de mutaciones mapeadas, así como la identificación de las regiones que carecen de mutaciones mapeadas y que, presumiblemente, son menos sensibles a mutaciones que otras partes funcionalmente más relevantes de la molécula. Las construcciones recombinantes apropiadas se pueden generar usando técnicas convencionales de biología molecular, que incluyen las que se exponen en Maniatis (Molecular cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory (1989)).

[0078] La construcción de ADN recombinante que codifica la proteína transactivadora quimérica se puede colocar bajo el control de (es decir, unido funcionalmente a) un promotor adecuado y/u otra secuencia de control de la expresión. Puede resultar deseable colocar la proteína transactivadora bajo el control de una secuencia promotora constitutivamente activa, aunque la proteína transactivadora también se puede colocar bajo el control de un promotor inducible, como el promotor de metalotionina (Brinster y col., Nature 296: 39 – 42 (1982)) o un promotor histo-específico. Las secuencias promotoras que se pueden usar de acuerdo con la invención incluyen pero no se limitan a la región promotora temprana del SV40 (Benoist y Chambon, Nature 290: 304 – 310 (1981)), el promotor contenido en la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto y col., Cell 22: 787 – 797 (1980)), el promotor de la timidina quinasa del herpes (Wagner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 144 – 145 (1981)), el promotor / potenciador temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) humano (Boshart y col., Cell 41: 521 – 530 (1985)).

[0079] En una realización de la invención, la proteína transactivadora quimérica es codificada por pcDNA3/HIFNP16/Afl2. En otra realización, la proteína transactivadora quimérica es codificada por pcADN3/HIFNP16/RI, que es idéntico a pcDNA3/HIFNP16/Afl2 salvo por que el segmento de la VP16 se inserta detrás del codón 530 de la región codificante de la HIF-1 α .

[0080] De acuerdo con la invención, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas transactivadoras híbridas / quiméricas se pueden usar para regular específicamente la expresión de genes que contienen elementos de respuesta a hipoxia (ERH). Estos ERH corresponden a una secuencia de ácido nucleico que es reconocida por y se une a la proteína de unión a ADN usada como esqueleto de la proteína transactivadora quimérica.

[0081] En general, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas transactivadoras quiméricas se pueden usar para controlar selectivamente la expresión de los genes de interés. A modo de ejemplo pero sin limitación, las proteínas transactivadoras quiméricas se pueden colocar bajo el control de un promotor constitutivo y se pueden usar para aumentar de forma constitutiva la expresión de un gen de interés asociado con elementos de respuesta a hipoxia (ERH), por ejemplo cuando resulta deseable producir un producto génico concreto en cantidad en un cultivo celular o en un animal transgénico. De forma alternativa, una proteína transactivadora se puede colocar bajo el control de un promotor histo-específico de manera que el gen de interés se exprese en un tejido concreto. En realizaciones alternativas de la invención, la función transactivadora quimérica es inducible, de manera que la expresión de un gen de interés se puede incrementar o reducir selectivamente a través de los elementos de respuesta a hipoxia (ERH). Para una revisión de la expresión transgénica condicional e inducible, véanse Fishman,

Circ. Res. 82: 837 – 844 (1998) y Fishman, Trends Cardiovasc. Med. 5: 211 – 217 (1995).

[0082] Para más información sobre las construcciones de HIF-1-alfa, véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos con el nº de serie 6,432,947.

5

[0083] La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es un estado neurodegenerativo progresivo que implica la pérdida de motoneuronas grandes en el cerebro y la médula espinal. Se caracteriza por debilidad progresiva, atrofia y espasticidad, lo que conduce a parálisis y fallo respiratorio en un plazo de cinco años después de su inicio. La ELA familiar supone un 10 % de todos los casos de ELA; aproximadamente un 25 % de estos casos se debe a mutaciones en el gen de la Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1) [1]. Hasta la fecha se han identificado 109 mutaciones diferentes en el gen de la SOD1; éstas abarcan los cinco exones [2]. Aparte de mutaciones muy raras en los genes de la cadena pesada de los neurofilamentos (NFH), la dinactina, el gen de la proteína de unión vesicular 1 y el gen de la alsina, la SOD1 es el único locus importante identificado susceptible para la ELA. La SOD1 es una enzima principalmente citoplasmática que cataliza la descomposición de los iones superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, que a su vez es degradado por la glutatión peroxidasa o catalasa para formar agua. Varias líneas de evidencias sostienen que la proteína SOD1 mutante resulta neurotóxica a través de una función adversa adquirida que acarrea tanto una patología oxidativa como una agregación de proteínas, con trastornos secundarios del metabolismo de glutamato, la función mitocondrial, el transporte axonal y la homeostasis del calcio [3]. La toxicidad de la SOD1 mutante es confirmada por la observación de que la expresión transgénica de altos niveles de la proteína SOD1 mutante en ratones produce un fenotipo de la enfermedad de las motoneuronas, dependiendo la edad de inicio y la duración de la enfermedad del número de copias [4].

[0084] Hasta la fecha, pocas intervenciones terapéuticas han alterado el fenotipo de las motoneuronas en los ratones transgénicos con ELA. Aunque hasta ahora se han ensayado más de 100 moléculas pequeñas, solo unas pocas han presentado un beneficio marginal (por ejemplo, riluzol [5], celecoxib [6], arimoclomol [7]). Por el contrario, algunas formas de terapia proteica han resultado beneficiosas. Así, se obtuvo una mejora significativa de la supervivencia administrando el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1) por vía transgénica [8] o mediante la liberación de VAA2 por inyección IM y el transporte axonal retrógrado siguiente a los nervios motores [9]. Otras dos proteínas que han mostrado ser prometedoras terapéuticamente como agentes neuroprotectores son la eritropoyetina [10] y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [11, 12]. El último es de especial interés porque el análisis genético ha indicado que variantes hipomórficas del gen del VEGF suponen un factor de riesgo para la ELA [13]. Además, los ratones que carecen de elementos promotores de respuesta a hipoxia desarrollan una enfermedad de las motoneuronas de progresión lenta [14]. Seguidamente se ha documentado que la liberación lentivírica del VEGF a la médula espinal de ratones con ELA retrasa la muerte [15]. Dos investigadores independientes han informado de que la infusión del VEGF en el líquido cerebroespinal en ratones [16] y ratas [17] con ELA también ralentiza el curso de la enfermedad.

[0085] La presente memoria de la invención describe un procedimiento que aumenta los niveles de la familia VEGF de proteínas neurotróficas y/o de EPO y que comprende la inyección de un vector neurotrófico que codifica la HIF-1 α en la región de la médula espinal de un sujeto con ELA u otro trastorno de las motoneuronas. El procedimiento puede incrementar la concentración de más de una proteína neurotrófica de este tipo. Sin limitarse a ninguna teoría, la liberación de un transgén que codifica la HIF-1 α aumentará la expresión de diferentes genes diana del HIF-1, proporcionando así un beneficio a las motoneuronas en los lugares en los que se exprese la HIF-1 α .

[0086] Sin limitarse a ninguna teoría, la inyección directa de un vector neurotrófico en la médula espinal también supone una ventaja para la liberación de moléculas terapéuticas, tales como HIF-1 α , que funcionan con mayor eficacia cuando se expresan directamente en las células de la médula espinal. Por ejemplo, los vectores neurotróficos que codifican moléculas tales como ARN interferente corto (ARNic) se pueden liberar en las células de la médula espinal por inyección directa en la médula espinal. El ARNic liberado de esta manera puede ejercer directa e intracelularmente sus efectos en las células transducidas de la médula espinal.

[0087] Además, ciertos trastornos genéticos de las motoneuronas, tales como la atrofia muscular espinal (AME), se pueden tratar inyectando directamente en la médula espinal un vector neurotrófico que codifique un gen terapéutico. La inyección directa en la médula espinal proporciona un medio para liberar virus recombinantes directamente en las células del área de la médula espinal.

[0088] Los vectores víricos neurotróficos incluyen pero no se limitan a vectores víricos adeno-asociados (VAA), vectores víricos del herpes simple (patente de Estados Unidos nº 5,672,344) y vectores lentivíricos.

[0089] En la presente memoria se puede usar un VAA de cualquier serotipo o pseudotipo. El serotipo del vector vírico se puede seleccionar del grupo formado por VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7 y VAA8 (véanse, por ejemplo, Gao y col. (2002) PNAS 99: 11854 – 11859; y Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003). Se pueden usar otros serotipos aparte de los enumerados en la presente memoria. Además, se pueden usar vectores VAA pseudotipados. Los vectores VAA pseudotipados son aquellos que contienen las repeticiones terminales invertidas (RTI) de un serotipo de VAA y la cápsida de un segundo serotipo de VAA; por ejemplo, un vector VAA que contiene la cápsida de VAA2 y las RTI de VAA1 (es decir, VAA 1/2) o un

vector VAA que contiene la cápsida de VAA5 y las RTI de VAA2 (es decir, VAA 2/5).

[0090] Los vectores VAA derivan de parvovirus de ADN de cadena sencilla (cs) que no son patógenos para mamíferos (revisión en Muzyscka (1992) *Curr. Top. Microb. Immunol.* 158: 97 – 129). Brevemente, los vectores basados en el VAA carecen de los genes víricos *rep* y *cap*, que suponen el 96 % del genoma vírico, quedando las dos repeticiones terminales invertidas (RTI) flanqueantes de 145 pares de bases (pb), que se usan para iniciar la replicación de ADN, el empaquetamiento y la integración del virus. En ausencia de un virus auxiliar, el VAA natural se integra en el genoma de la célula huésped humana con especificidad preferencial por el sitio en el cromosoma 19q 13.3 o se puede mantener en el episoma. Una única partícula de VAA puede acomodar hasta 5 kb de ADNcs, quedando así aproximadamente 4,5 kb para un transgén y elementos reguladores, lo que típicamente es suficiente. Sin embargo, los sistemas de ajuste en trans, descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos nº 6,544,785, casi pueden duplicar este límite.

[0091] El VAA puede ser VAA7 o VAA8. Se han estudiado extensamente y caracterizado como vectores para la terapia génica muchos serotipos del virus adeno-asociado, especialmente el VAA2. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con la preparación de vectores basados en VAA funcionales para la terapia génica. En el gran volumen de bibliografía publicada se pueden encontrar numerosas referencias a diversos procedimientos de producción, purificación y preparación del VAA para la administración a sujetos humanos (véase, por ejemplo, *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Humana Press, 2003). En las patentes de Estados Unidos nº 6,180,613 y 6,503,888 se ha descrito, además, una terapia génica basada en VAA y dirigida a células del SNC. Otros ejemplos de vectores VAA son los vectores recombinantes de los serotipos VAA1, VAA2, VAA5, VAA6, VAA7 y VAA8 que codifican proteínas humanas. Otros vectores pseudotipados pueden ser los vectores VAA VAA2/1, VAA2/2, VAA2/6, VAA2/5, VAA2/7 y VAA2/8.

[0092] En ciertos procedimientos de la presente descripción, el vector comprende un transgén unido funcionalmente a un promotor. El transgén codifica una molécula biológicamente activa cuya expresión en el SNC produce una corrección al menos parcial de la neuropatología. El gen de la HIF-1-alfa es conocido en la técnica. Véanse, por ejemplo, NM_001530 y NP_001521. La secuencia de transactivación de la HIF-1-alfa se puede sustituir por secuencias de transactivación del NFκB. Véase, por ejemplo, NM_003998.

[0093] El nivel de expresión transgénica en células eucariotas viene determinado en gran medida por el promotor transcripcional dentro del casete de expresión transgénico. En algunas realizaciones se usan promotores que muestran una actividad a largo plazo y que son histo- e incluso citoespecíficos. Ejemplos no limitantes de promotores incluyen pero no se limitan al promotor del citomegalovirus (CMV) (Kaplitt y col. (1994) *Nat. Genet.* 8: 148 – 154), el promotor del CMV/globina β3 humana (Mandel y col. (1998) *J. Neurosci.* 18: 4271 – 4284), el promotor de la GFAP (Xu y col. (2001) *Gene Ther.* 8: 1323 – 1332), el promotor de la enolasa neuroespecífica (NSE) de 1,8 kb (Klein y col. (1998) *Exp. Neurol.* 150: 183 – 194), el promotor de la actina beta de pollo (CBA) (Miyazaki (1989) *Gene* 79: 269 – 277), el promotor de la β-glucuronidasa (GUSB) (Shiple y col. (1991) *Genetics* 10: 1009 – 1018) y los promotores de la ubiquitina, como los aislados de la ubiquitina A humana, la ubiquitina B humana y la ubiquitina C humana descritos en la patente de Estados Unidos nº 6,667,174. Para prolongar la expresión se pueden unir funcionalmente al transgén otros elementos reguladores, como, por ejemplo, el elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) (Donello y col. (1998) *J. Virol.* 72: 5085 – 5092) o el sitio de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH).

[0094] Para algunas aplicaciones de la terapia génica en el SNC puede ser necesario controlar la actividad transcripcional. Con este propósito se puede obtener una regulación farmacológica de la expresión génica con vectores víricos incluyendo diversos elementos reguladores y promotores de respuesta a fármacos, como se describe, por ejemplo, en Habermaet y col. (1998) *Gene Ther.* 5: 1604 – 16011; y Ye y col. (1995) *Science* 283: 88 – 91.

[0095] En ciertos casos, la concentración o el título del vector en la composición es al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^{12}$ pg/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^9$ ut/ml); o (c) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^{10}$ ui/ml).

[0096] El transgén puede codificar una molécula biológicamente activa cuya expresión en el SNC dé lugar a una corrección al menos parcial de la neuropatología. En algunas realizaciones, el producto transgénico terapéutico es una proteína HIF1-alfa para el uso en un procedimiento que alivia y/o previene los síntomas de la ELA. Véanse Raoul y col. (2005) *Nat. Med.* 11 (4): 423 – 428 y Ralph y col. (2005) *Nat. Med.* 11 (4): 429 – 433.

[0097] Además del HIF1-alfa se pueden usar transgenes para expresar una cantidad terapéutica del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), calbindina D28, parvalbúmina, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2 y CNTF (factor neurotrófico ciliar).

[0098] La presente descripción proporciona procedimientos para modular, corregir o aumentar la función motora en un sujeto con daño de las motoneuronas. Con fines ilustrativos únicamente, el sujeto puede sufrir una o más de entre esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular bulboespinal, atrofia muscular espinal (AME), ataxia

espinocerebelosa, esclerosis lateral primaria (SLP) o lesión traumática de la médula espinal.

[0099] Sin limitarse a ninguna teoría, la patología asociada con daño de las motoneuronas puede incluir degeneración de las motoneuronas, gliosis, anomalías en los neurofilamentos, pérdida de fibras mielinizadas en los tractos corticoespinales y las raíces ventrales. Se reconocen dos tipos de inicio: el inicio bulbar, que afecta a las motoneuronas del tronco cerebral (afecta a los músculos faciales, al habla y a la acción de tragar); y el inicio en las extremidades, que afecta a las motoneuronas de la médula espinal y se refleja en espasticidad, debilidad generalizada, atrofia muscular, parálisis y fallo respiratorio. En la ELA, los sujetos presentan un inicio tanto bulbar como en las extremidades. En la ELP, los sujetos presentan un inicio bulbar.

[0100] La capacidad para organizar y ejecutar actos motores complejos depende de las señales procedentes de las áreas motoras de la corteza cerebral, es decir, la corteza motora. Los comandos de la corteza motora descienden por dos tractos. Las fibras corticobulbares controlan los núcleos motores en el tronco cerebral que mueven los músculos faciales, y las fibras corticoespinales controlan las motoneuronas espinales que inervan los músculos troncales y de las extremidades. La corteza cerebral también influye de forma indirecta en la actividad motora espinal actuando sobre las rutas descendentes del tronco cerebral.

[0101] La corteza motora primaria yace a lo largo del giro precentral en el área de Brodmann (4). Los axones de las neuronas corticales que se proyectan hacia la médula espinal discurren juntos por el tracto corticoespinal, un haz de fibras macizo que contiene aproximadamente un millón de axones. Aproximadamente un tercio de ellos tiene su origen en el giro precentral del lóbulo frontal. Otro tercio proviene del área 6. El resto se origina en las áreas 3, 2 y 1 en la corteza sensorial somática y regula la transmisión de estímulos aferentes a través del cuerno dorsal.

[0102] Las fibras corticoespinales discurren, junto con las fibras corticobulbares, a través del brazo posterior de la cápsula interna para alcanzar la porción ventral del mesencéfalo. En el puente troncoencefálico se separan en pequeños haces de fibras que discurren entre los núcleos pontinos. Se reagrupan en el bulbo raquídeo para formar la pirámide bulbar. Aproximadamente tres cuartas partes de las fibras corticoespinales cruzan la línea media en la decusación piramidal en la juntura del bulbo raquídeo y la médula espinal. Las fibras cruzadas descienden por la parte dorsal de las columnas laterales (columna dorsolateral) de la médula espinal, formando el tracto corticoespinal lateral. Las fibras no cruzadas descienden por las columnas ventrales en forma del tracto corticoespinal ventral.

[0103] Las divisiones lateral y ventral del tracto corticoespinal terminan en aproximadamente las mismas regiones de la sustancia gris de la médula espinal en forma de los sistemas lateral y medial del tronco cerebral. El tracto corticoespinal lateral se proyecta principalmente hacia los núcleos motores en la parte lateral del cuerno ventral y hacia las interneuronas en la zona intermedia. El tracto corticoespinal ventral se proyecta bilateralmente hacia la columna celular ventromedial y hacia las porciones contiguas de la zona intermedia que contienen las motoneuronas que inervan los músculos axiales.

[0104] En un aspecto de la presente memoria, los procedimientos descritos incluyen administrar al SNC de un sujeto afectado un vector vírico neurotrófico que lleva un transgén que codifica un producto terapéutico y que permite la expresión del transgén dentro del SNC en proximidad del sitio de administración, en una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéutico cuando la proteína expresada es transportada por el SNC mediante el líquido cerebroespinal. Además, el vector puede comprender un polinucleótido que codifica una molécula biológicamente activa eficaz para tratar el trastorno del SNC. Tales moléculas biológicamente activas pueden comprender péptidos, que incluyen pero no se limitan a versiones nativas, fusionadas o mutadas de proteínas de longitud completa, versiones nativas, fusionadas o mutadas de fragmentos proteicos, polipéptidos sintéticos.

[0105] La administración se puede efectuar por inyección directa de una solución con un alto título de vector en la médula espinal de un sujeto o paciente.

[0106] En algunas realizaciones de la presente memoria, los procedimientos comprenden la administración de un vector neurotrófico de alto título que lleva un transgén terapéutico de manera que el producto transgénico se exprese a una concentración terapéutica en un primer sitio dentro de la médula espinal. El título vírico de la composición puede ascender a al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^{12}$ pg/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^9$ ut/ml); o (c) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ó 50 ($\times 10^{10}$ ui/ml).

[0107] En ratones experimentales, el volumen total de la solución de VAA inyectada se encuentra, por ejemplo, entre 1 y 20 μ l. Para otros mamíferos, incluidos los seres humanos, los volúmenes y las velocidades de liberación se escalan de forma apropiada. El tratamiento puede consistir en una única inyección por sitio diana, o se puede repetir en uno o más sitios. Se pueden usar múltiples sitios de inyección. Además de un primer sitio de administración, la composición que contiene el vector vírico que lleva el transgén se puede administrar en otro sitio, que puede ser contralateral o ipsilateral con respecto al primer sitio de administración. Las inyecciones pueden ser únicas o múltiples, unilaterales o bilaterales.

[0108] Las preparaciones de VAA de alto título se pueden elaborar usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo como se describe en la patente de Estados Unidos nº 5,658,776 y Viral Vectors for Gene Therapy:

Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003.

[0109] Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

5 EJEMPLOS

[0110] **Ejemplo 1.** *Liberación de un transgén en la médula espinal mediante el vector vírico VAAr*

[0111] Hasta la fecha se han realizado relativamente pocos estudios que siguieran sistemáticamente los patrones de distribución de diferentes serotipos del VAAr en el sistema nervioso. Uno de los más informativos sugirió que el VAA2/1r y el VAA2/5r tendían a mostrar una mayor transducción que el VAA2/2r. Además, se ha observado un transporte retrógrado del VAA1r y VAA5r [20]. Por lo tanto, los autores realizaron experimentos iniciales para determinar la captación y liberación relativas de una serie de serotipos del VAA usando dos rutas de liberación en células de la médula espinal y prestando especial atención a las motoneuronas. En estos experimentos iniciales se comparó la inyección intraparenquimatosa del VAA que codificaba la GFP (proteína verde fluorescente) en la médula espinal con la inyección intramuscular del VAA que codificaba la GFP. Se evaluaron seis vectores de VAA pseudotipados diferentes que incluían los serotipos 2/1, 2/2, 2/5, 2/6, 2/7 y 2/8.

[0112] *Inyecciones en la médula espinal.* Los ratones se anestesiaron por inhalación de isoflurano y se inmovilizaron usando un dispositivo estereotáxico. Los grupos de ratones se inyectaron con un vector VAA CBA-GFP; un grupo con cada uno de los serotipos siguientes: VAA2/1, VAA2/2, VAA2/5, VAA2/6, VAA2/7 y VAA2/8. Cada ratón recibió un total de 2,5 e 10 partículas resistentes a DNAsa (DRP). La dosis se inyectó mediante inyección intraparenquimatosa en las siguientes áreas de la médula espinal: la región C6 (dentro de la región cervical), la región T8/T9 y la región T13 (dentro de la región torácica) y la región L3/L4 (dentro de la región lumbar). Se inyectaron cuatro microlitros de virus por sitio a una velocidad de 1 microlitro / minuto.

[0113] *Inyecciones intramusculares.* Los grupos de ratones se inyectaron con un vector VAA CBA-GFP; un grupo con cada uno de los serotipos siguientes: VAA2/1, VAA2/2, VAA2/5, VAA2/6, VAA2/7 y VAA2/8. Cada ratón recibió cuatro inyecciones del VAA: dos inyecciones en el músculo cuádriceps y dos inyecciones en el músculo gastrocnemio. Cada ratón recibió una dosis total de 2,5 e 10 partículas resistentes a DNAsa (DRP).

[0114] Se disecaron el cerebro entero, la médula espinal y los músculos. Se extrajo el ADN mediante el kit Qiagen Dneasy™. Se realizó un análisis con el ensayo BGH (hormona de crecimiento bovina) Taqman™ en el cerebro, la médula espinal y los músculos, usando cebadores y sondas contra la secuencia de la BGH en el vector VAA CBA-GFP para determinar el número de copias genómicas del vector en cada tejido. Se determinó el número de copias de la BGH en relación con el ADN total. Asimismo se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico de las médulas espinales disecadas para detectar cada una de las siguientes: 1) la GFP para medir la expresión transgénica, 2) la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) para marcar las células gliales y 3) SM132 y NeuN para marcar las células neuronales.

[0115] La figura 1 muestra el número de genomas del vector VAA liberado en la médula espinal mediante inyecciones espinales o inyecciones intramusculares. Se encontraron más genomas vectoriales en las médulas espinales de los ratones tratados con inyecciones espinales de VAA2/7 y 2/8.

[0116] La figura 2 muestra el número de genomas vectoriales liberados en el cerebro después de la inyección en la médula espinal o intramuscular de los vectores VAA. En el cerebro había muy pocos vectores VAA. No se apreciaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento. Los datos demuestran que hubo poca diseminación del vector en el cerebro después de la inyección directa de cualquier serotipo del VAA en la médula espinal. Esto puede ser una ventaja de seguridad y sugiere que el vector permanece en el área de la médula espinal después de la inyección en la médula espinal.

[0117] La figura 3 muestra el número de genomas vectoriales liberados en el músculo después de la inyección intramuscular de los vectores VAA.

[0118] Los datos demuestran que la inyección directa de los vectores VAA en la médula espinal media una transferencia génica a la médula espinal mayor que la inyección intramuscular de los vectores VAA. Esto queda demostrado por el mayor número de genomas del vector VAA medido en la médula espinal de los ratones inyectados en la médula espinal que en la de los inyectados en el músculo con vectores VAA idénticos. Además, los datos demuestran que los serotipos que median la mayor transferencia génica en la médula espinal fueron el VAA2/7 y el VAA2/8 en este experimento.

[0119] Los resultados inmunohistoquímicos demuestran que la inyección de los vectores VAA que codifican la GFP en la médula espinal produce una expresión significativa de la GFP. La expresión de la GFP se colocó en células que expresan los marcadores neuronales SM132 y NeuN. No se observó una colocación de la GFP con la GFAP, un marcador astrogial. Los resultados inmunohistoquímicos fueron similares para todos los serotipos ensayados. Después de la inyección intramuscular no se observaron células GFP-positivas, o solo unas pocas (en

su mayoría no neuronales), en la médula espinal tras las inyecciones intramusculares.

[0120] Ejemplo 2. Evaluación de VAA-HIF-1alfaNFκB en el cerebro de ratón

- 5 **[0121]** Inyección de VAA-HIF1-alfaNFκB en el cerebro de ratón: Se inyectaron vectores VAA que codificaban la HIF-1alfaNFκB en el área talámica del cerebro de ratones. Se evaluaron dos serotipos: 1) VAA2/1-HIF-1alfaNFκB y 2) VAA2-HIF-1alfaNFκB. Cada ratón recibió 9 e 9 partículas resistentes a DNAsa (DRP). Como control sirvieron ratones no tratados. Cuatro semanas después de la inyección se sacrificaron los ratones y se extrajeron sus cerebros. Se realizó una hibridación *in situ* en secciones del cerebro para visualizar el ARNm del HIF-1alfa.
- 10 Asimismo se efectuó una RT-PCR con ADNc extraído de los cerebros para evaluar la expresión génica del VEGF. La expresión génica del VEGF se normalizó respecto a la expresión génica de GUSB.

- [0122]** El ARNm de HIF-1alfa se observó mediante hibridación *in situ* en los cerebros de los ratones tratados tanto con VAA2/1-HIF-1alfaNFκB como con VAA2-HIF-1alfaNFκB; En los cerebros control no se observó ningún mensajero. Se observó una señal más intensa de ARNm de HIF-1alfa en los ratones tratados con VAA2/1-HIF-1alfaNFκB. El análisis de la expresión génica mediante RT-PCR demostró un aumento de la expresión génica del VEGF en los ratones tratados con VAA2/1-HIF-1alfaNFκB en relación con los animales control. No se observó un aumento medible de la expresión génica del VEGF en los ratones tratados con VAA2-HIF-1alfaNFκB.

- 20 **[0123]** En un segundo experimento, se inyectó en ratones el VAA2/1-HIF-1alfaNFκB bilateralmente en el área cerebelosa del cerebro de ratón. Cada ratón recibió 2 e 10 partículas resistentes a DNAsa (DRP). Como controles sirvieron ratones no tratados. Tres semanas después de la inyección se sacrificaron los ratones y se extrajeron sus cerebros. Se realizó una hibridación *in situ* en secciones del cerebro para visualizar el ARNm de la HIF-1alfa. Asimismo se efectuó una RT-PCR con ADNc extraído de los cerebros para evaluar la expresión génica de VEGF, EPO e IGF1. Los niveles de expresión se normalizaron respecto a la expresión génica de GUSB.

- [0124]** El ARNm de la HIF-1alfa se observó mediante hibridación *in situ* en todo el cerebelo. La expresión era intensa y se presentaba en diferentes capas de células neuronales. No se observó ARNm de la HIF-1alfa en el tronco cerebral. El ARNm de la HIF-1alfa no se observó en los cerebros de los ratones control. Como se muestra en la figura 4, los niveles de ARNm de VEGF, EPO e IGF-1 estaban regulados por aumento en el cerebro después de la transducción con un vector VAA que codificaba el HIF-1alfa. En los ratones control no se observó ninguna regulación por aumento de estos genes. Esto demuestra que la HIF-1alfa posee la capacidad de modular los niveles de expresión génica de genes diana en el cerebro después de la transducción con un vector VAA.

35 **[0125] Ejemplo 3. Liberación de HIF-1alfa mediada por VAAr en la médula espinal de ratones con ELA**

- [0126]** Modelo terapéuticamente relevante de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa mortal que se caracteriza por una pérdida selectiva de motoneuronas en la corteza, el tronco cerebral y la médula espinal. La progresión de la enfermedad puede producir
- 40 atrofia de los músculos de las extremidades, axiales y respiratorios. La muerte celular de las motoneuronas viene acompañada de gliosis reactiva, anomalías de los neurofilamentos y una pérdida significativa de las fibras mielinizadas grandes en los tractos corticoespinales y las raíces ventrales. Aunque la etiología de la ELA no se entiende muy bien, la acumulación de evidencias indica que la ELA esporádica (ELAE) y la familiar (ELAF) comparten muchos rasgos patológicos similares, lo que permite esperar que el estudio de una de las formas
- 45 conduzca a un tratamiento común. La ELAF supone aproximadamente un 10 % de los casos diagnosticados, del cual un 20 % está asociado a mutaciones hereditarias dominantes en la Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1). Los ratones transgénicos que expresan la proteína SOD1 humana mutante (por ejemplo, ratones SOD1^{G93A}) recapitulan muchos rasgos patológicos de la ELA y constituyen un modelo animal disponible para estudiar la ELA. En la ELAE se ha implicado como causa subyacente un sinnúmero de mecanismos patológicos, que incluyen excitotoxicidad
- 50 inducida por glutamato, exposición a toxinas, disfunción del proteasoma, daño mitocondrial, desorganización de los neurofilamentos y pérdida de soporte neurotrófico.

- [0127]** Los autores comprobarán la hipótesis de que la liberación de HIF-1alfa mediada por VAAr en la médula espinal puede fomentar la supervivencia de las motoneuronas y mejorar la progresión de la enfermedad en
- 55 ratones SOD1^{G93A} con ELA. La liberación con un vector VAA recombinante permite la expresión transgénica a relativamente largo plazo (los ratones con ELA pueden requerir la expresión transgénica durante muchos meses). Más aún, dependiendo del serotipo, el VAA infecta tanto células neuronales como no neuronales, un posible beneficio si, como sospechan los autores, las células no neuronales participan en la muerte de las motoneuronas [21].

- 60 **[0128] Diseño experimental.** Los autores usaron inyecciones intraespinales para administrar el VAA2/8-HIF-1alfaNFκB con el fin de determinar el efecto de esta estrategia en la supervivencia de las motoneuronas y el inicio de la enfermedad, así como en la supervivencia de los ratones SOD1^{G93A} con ELA.

[0129] Infeción de la médula espinal de ratones con ELA por VAAr. Para cada grupo de tratamiento vírico se inyectaron ratones SOD1^{G93A} o SOD1 naturales (5/grupo) y ratones no manipulados genéticamente (5/grupo) de 60 días de edad o de 90 días de edad con 1 e 11 DRP de VAA2/8-HIF-1alfaNFκB. Como controles negativos se inyectaron ratones SOD1 de 60 días de edad o de 90 días de edad con la misma dosis de vector vacío. (Como control positivo adicional, los ratones SOD1 (5/grupo) de 60 días de edad o de 90 días de edad se pueden inyectar con la misma dosis del vector VAA2/8-HIF-1 (IGF-1 humano). Un control negativo adicional también pueden ser ratones no manipulados genéticamente.) El virus se inyectó en las vértebras C6, T8/T9, T13, L3/L4 de la médula espinal, 4 µl por sitio, liberado a 1 µl/min, con una dosis total de 2,5 e 10 DRP. Se usan ensayos TaqMan para detectar genomas víricos y mensajeros para HIF-1alfa y VEGF en la médula espinal. Se llevó a cabo una hibridación *in situ* de las médulas espinales para visualizar la expresión de la HIF-1alfa en las médulas espinales de los ratones tratados con VAA2/8-HIF-1alfaNFκB y de los controles negativos.

[0130] Tamaño de la muestra y consideraciones estadísticas. Se trataron veinte ratones TgSOD1^{G93A} con VAA2/8-HIF-1alfa para observar el inicio y la supervivencia. Otros 30 ratones de cada tipo se pudieron sacrificar para los análisis histológico y bioquímico a los 110 d y al final. En base a estudios previos, los autores asumen que (i) los ratones con el transgén SOD1^{G93A} viven 130 ± 13 días; (ii) el poder estadístico del estudio para detectar la diferencia intergrupar real es del 90 %; (iii) alfa es de dos colas a 0,05; y (iv) los autores desean detectar una diferencia del 10 % o mayor en la supervivencia media de los ratones tratados. Con estas suposiciones, los autores necesitan un mínimo de 14 ratones por haplotipo ensayado. Por lo tanto, los autores eligieron observar al menos 20 animales en cada grupo respecto al inicio, la progresión de la enfermedad y la supervivencia, por si murieran ratones por razones no relacionadas con su enfermedad de las motoneuronas. En el análisis de supervivencia final se evaluaron 20 ratones tratados con VAA2/8-HIF-1alfa y se evaluaron 18 ratones control. Otros 30 ratones por grupo se pudieron sacrificar para los análisis histológico y bioquímico a intervalos de tiempo predeterminados (5 al mes x 6 meses). El tiempo transcurrido hasta el inicio de la enfermedad y la supervivencia se compararon usando gráficos de Kaplan-Meier y la prueba estadística de log-rank. Se usa un modelo de riesgos proporcionales de Cox para controlar los efectos del sexo.

[0131] Determinación del efecto de VAAr-HIF-1alfa en el fenotipo de la ELA. El inicio de la enfermedad viene definido por la aparición de temblores en las piernas estiradas cuando el ratón se levanta por la cola. El fallecimiento se define como el punto en el que el ratón ya no puede enderezarse en un plazo de 30 segundos.

[0132] Valoración del efecto de VAAr-HIF-1alfa en la supervivencia de las motoneuronas. Los autores usarán un análisis de las raíces ventrales para monitorizar el número de motoneuronas en 5 ratones TgSOD1^{G93A} tratados con VAAr-HIF-1alfa en el momento que aparecen los síntomas (110 días) y en el estado terminal.

[0133] Resultados. Se observó un aumento estadísticamente significativo ($p = 0,033$) en la supervivencia de los ratones con ELA después de la administración intraespinal de VAA2/8-HIF-1alfaNFκB (supervivencia de 133 días en los animales control frente a una supervivencia de 139 días en los animales experimentales). Las diferentes cohortes de animales respondieron de forma diferente al tratamiento; un 25 % de los animales tratados mostraron un aumento en la supervivencia de 18 a 23 días, mientras que un 25 % de los animales mostraron un aumento en la supervivencia de 8 a 13 días. El análisis por hibridación *in situ* para HIF-1alfaNFκB en las médulas espinales de los ratones con ELA tratados con VAA2/8-HIF-1alfaNFκB sugiere que la transducción se observa principalmente en la región lumbar de la médula espinal. El análisis sugiere, además, que solo se administró a los animales un 25 % de la dosis deseada de 1 e 11 DRP.

TABLA 1

Tabla resumen de la supervivencia para la columna 1						
Variable censurada: columna 3						
Variable agrupada: columna 1.2						
	nº obs.	nº episodios	nº censurados	% censurados	nº desaparecidos	nº inválidos
CONTROL	18	13	5	27,778	0	0
EXP.	20	20	0	0,000	0	0
Total	38	33	5	13,158	0	0

TABLA 2

Estadísticas de supervivencia según Kaplan-Meier para la columna 1		
Variable censurada: columna 3		
Variable agrupada: columna 1.2		
	Estimado	Error típico
CONTROL: 25 %	129,000	4,992
CONTROL: 50 %	134,000	2,996
CONTROL: 75 %	139,000	1,519

CONTROL: Media	133,000	2,169
EXP. 25 %	131,000	4,782
EXP. 50 %	139,000	2,966
EXP. 75 %	144,000	3,873
EXP. Media	138,100	2,334

[0134] Ejemplo 4. Construcción del híbrido / quimera

[0135] Se puede construir un factor de transcripción híbrido (pcDNA3/HIF.VP-16.Afl2) compuesto por los dominios de unión a ADN y de dimerización de la HIF-1 α y el dominio de transactivación de la VP16 del virus del herpes simple para producir una activación constitutiva fuerte de los genes que normalmente están involucrados en la adaptación fisiológica a la hipoxia, como se ha señalado anteriormente.

[0136] El gen de la HIF-1 α de longitud completa (aa 1-826) se aisló por PCR (kit Advantage cDNA PCR, Clontech, Palo Alto, California) de una biblioteca de ADNc de células HeLa (Clontech) usando los cebadores indicados (SEQ ID NO: 4: ggggtacctt ctcttccg cgtgtggagg gagccagc; SEQ ID NO: 5: gctctagagt gagccaccag tgtccaaaaa aaggatg) y se insertó entre los sitios KpnI y XbaI del vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, California). En este plásmido, la expresión génica es controlada por el potenciador / promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV). El híbrido HIF-1 α /VP-16 se construyó truncando la HIF-1 α en el aa 390 (un sitio Afl2) y uniendo después el dominio de transactivación de la VP-16 del VHS en la dirección 3'. Un fragmento de la VP16 (aa 413 – 490) con extremos Afl2 y XbaI se amplificó por PCR usando la polimerasa Vent (New England Biolabs, Beverly, MA) y los cebadores indicados (SEQ ID NO: 6: cgtagcgtta agccggaatt cccggggatc tgg; SEQ ID NO: 7: cgctctagac taccaccgt actcgtcaat tc), y este fragmento se clonó en los sitios apropiados de la construcción pcDNA3/HIF-1 α . Se generó una construcción relacionada (pcDNA3/HIF/VP-16/R1) truncando la HIF-1 α en el aa 530 por digestión parcial con EcoR1. La integridad de todas las secuencias generadas por PCR se verificó por secuenciación del ADN usando un secuenciador de ADN Applied Biosystems 377. Todas las manipulaciones para la clonación se llevaron a cabo según procedimientos convencionales (Sambrook, J., y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^a ed. (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)). Las enzimas de restricción y las enzimas modificadoras de ADN se adquirieron de New England Biolabs o Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Md.) y se usaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los ADN plasmídicos se purificaron con kits adquiridos de Qiagen (Chatsworth, California).

[0137] Salvo que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, cultivo celular, condiciones de tratamiento, etc. usados en la memoria descriptiva, incluidas las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, salvo que se indique lo contrario, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden depender en gran medida de las propiedades deseadas que se pretendan obtener mediante la presente invención. Salvo que se indique lo contrario, debe entenderse que la expresión "al menos" que precede a una serie de elementos se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de establecer, usando nada más que experimentos rutinarios, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en la presente memoria.

Referencias

[0138]

1. Rosen, D.R., y col., Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 1993. 362: pág. 59 – 62.
2. Andersen, P.M., y col., Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes. *Amyotrophic Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2003. 4 (2): pág. 62 – 73.
3. Cleveland, D.W. y J.D. Rothstein, From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci*, 2001. 2 (11): pág. 806 – 19.
4. Gurney, M.E., y col., Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 1994. 264: pág. 1772 – 1775.
5. Gurney, M.E., y col., Benefit of vitamin E, riluzole and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis [véanse los comentarios]. *Ann Neurol*, 1996. 39 (2): pág. 147 – 57.
6. Drachman, D.B., y col., Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol*, 2002. 52 (6): pág. 771 – 8.
7. Kieran, D., y col., Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nat Med*, 2004. 10 (4): pág. 402 – 5.
8. Dobrowolny, G., y col., Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. *J Cell Biol*, 2005. 168 (2): pág. 193 – 9.
9. Kaspar, B.K., y col., Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science*, 2003. 301 (5634): pág. 839 – 42.

10. Iwasaki, Y., y col., Protective effect of interleukin-3 and erythropoietin on motor neuron death after neonatal axotomy. *Neurol Res*, 2002. 24 (7): pág. 643 – 6.
11. Brockington, A., y col., Vascular endothelial growth factor and the nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2004. 30 (5): pág. 427 – 46.
- 5 12. Storkebaum, E., D. Lambrechts y P. Carmeliet, VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays*, 2004. 26 (9): pág. 943 – 54.
13. Lambrechts, D., y col., VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet*, 2003. 34 (4): pág. 383 – 94.
14. Oosthuysen, B., y col., Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet*, 2001. 28 (2): pág. 131 – 8.
- 10 15. Azzouz, M., y col., VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature*, 2004. 429 (6990): pág. 413 – 7.
16. Zheng, C., y col., Vascular endothelial growth factor prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol*, 2004. 56 (4): pág. 564 – 7.
- 15 17. Storkebaum, E., y col., Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci*, 2005. 8 (1): pág. 85 – 92.
18. Yamakawa, M., y col., Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circ Res*, 2003. 93 (7): pág. 664 – 73.
19. Vincent, K.A., y col., Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1alpha/VP16 hybrid transcription factor. *Circulation*, 2000. 102 (18): pág. 2255 – 61.
- 20 20. Burger, C., y col., Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther*, 2004. 10 (2): pág. 302 – 17.
21. Clement, A.M., y col., Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science*, 2003. 302 (5642): pág. 113 – 7.
- 25

LISTADO DE SECUENCIAS

[0139]

- 30 < 110 > O'Riordan, Catherine Wadsworth, Samuel
- < 120 > Terapia génica para la esclerosis lateral amiotrófica y otros trastornos de la médula espinal
- 35 < 130 > 003482.00049
- < 150 > 60/827977
- < 151 > 03/10/2006
- 40 < 160 > 7
- < 170 > FastSeq para Windows versión 4.0
- < 210 > 1
- 45 < 211 > 1431
- < 212 > ADN
- < 213 > Homo sapiens
- < 400 > 1
- 50

ES 2 391 789 T3

```

atggagggcg cccggcggcgc gaacgacaag aaaaagataa gttctgaacg tcgaaaagaa 60
aagtctcgag atgcagccag atctcggcga agtaaagaat ctgaagtttt ttatgagctt 120
gctcatcagt tgccacttcc acataatgtg agttcgcac ttgataaggc ctctgtgatg 180
aggcttacca tcagctattt gcgtgtgagg aaacttctgg atgctggtga tttggatatt 240
gaagatgaca tgaaagcaca gatgaattgc ttttatttga aagccttggga tggttttggt 300
atggttctca cagatgatgg tgacatgatt tacatttctg ataatgtgaa caaatacatg 360
ggattaactc agtttgaact aactggacac agtgtgtttg attttactca tccatgtgac 420
catgaggaaa tgagagaaat gcttacacac agaaatggcc ttgtgaaaaa gggtaaagaa 480
caaaacacac agcgaagctt ttttctcaga atgaagtgtg ccctaactag ccgaggaaga 540
actatgaaca taaagtctgc aacatggaag gtattgcact gcacaggcca cattcacgta 600
tatgatacca acagtaacca acctcagtgt gggataaga aaccacctat gacctgcttg 660
gtgctgattt gtgaacccat tcctcaccca tcaaatattg aaattccttt agatagcaag 720
actttcctca gtcgacacag cctggatatg aaattttctt attgtgatga aagaattacc 780
gaattgatgg gatatgagcc agaagaactt ttaggccgct caatttatga atattatcat 840
gctttggact ctgatcatct gacccaaact catcatgata tgtttactaa aggacaagtc 900
accacaggac agtacaggat gcttgccaaa agaggtggat atgtctgggt tgaaactcaa 960
gcaactgtca catataacac caagaattct caaccacagt gcattgtatg tgtgaattac 1020
gttgtagtg gtattattca gcacgacttg attttctccc ttcaacaac agaatgtgtc 1080
cttaaaccgg ttgaatcttc agatatgaaa atgactcagc tattcaccaa agttgaatca 1140
gaagatacaa gtagcctctt tgacaaactt aagccggaat tcccggggat ctgggcccc 1200
ccgaccgatg tcagcctggg ggacgagctc cacttagacg gcgaggacgt ggcgatggcg 1260
catgccgacg cgetagacga tttcgatctg gacatgttgg gggacgggga tccccgggg 1320
ccgggattta cccccacga ctccgcccc tacggcgctc tggatatggc cgacttcgag 1380
tttgagcaga tgtttaccga tgcccttgga attgacgagt acgggtgggta g 1431

```

- < 210 > 2
- < 211 > 1173
- 5 < 212 > ADN
- < 213 > Homo sapiens

< 400 > 2

```

atggagggcg cccggcggcgc gaacgacaag aaaaagataa gttctgaacg tcgaaaagaa 60
aagtctcgag atgcagccag atctcggcga agtaaagaat ctgaagtttt ttatgagctt 120
gctcatcagt tgccacttcc acataatgtg agttcgcac ttgataaggc ctctgtgatg 180
aggcttacca tcagctattt gcgtgtgagg aaacttctgg atgctggtga tttggatatt 240
gaagatgaca tgaaagcaca gatgaattgc ttttatttga aagccttggga tggttttggt 300
atggttctca cagatgatgg tgacatgatt tacatttctg ataatgtgaa caaatacatg 360
ggattaactc agtttgaact aactggacac agtgtgtttg attttactca tccatgtgac 420
catgaggaaa tgagagaaat gcttacacac agaaatggcc ttgtgaaaaa gggtaaagaa 480

```

```

caaaacacac agcgaagctt ttttctcaga atgaagtgtg ccctaactag ccgaggaaga 540
actatgaaca taaagtctgc aacatggaag gtattgcact gcacaggcca cattcacgta 600
tatgatacca acagtaacca acctcagtgt gggataaga aaccacctat gacctgcttg 660
gtgctgattt gtgaacccat tcctcaccca tcaaatattg aaattccttt agatagcaag 720
actttcctca gtcgacacag cctggatatg aaattttctt attgtgatga aagaattacc 780
gaattgatgg gatatgagcc agaagaactt ttaggccgct caatttatga atattatcat 840
gctttggact ctgatcatct gacccaaact catcatgata tgtttactaa aggacaagtc 900
accacaggac agtacaggat gcttgccaaa agaggtggat atgtctgggt tgaaactcaa 960
gcaactgtca catataacac caagaattct caaccacagt gcattgtatg tgtgaattac 1020
gttgtagtg gtattattca gcacgacttg attttctccc ttcaacaac agaatgtgtc 1080
cttaaaccgg ttgaatcttc agatatgaaa atgactcagc tattcaccaa agttgaatca 1140
gaagatacaa gtagcctctt tgacaaactt aag 1173

```

- 10 < 210 > 3
- < 211 > 475
- < 212 > ADN
- 15 < 213 > Homo sapiens

< 400 > 3

ES 2 391 789 T3

```

ccggaattcc cggggatctg ggcccccccg accgatgtca gcctggggga cgagctccac 60
ttagacggcg aggacgtggc gatggcgcat gccgacgcgc tagacgattt cgatctggac 120
atgttggggg acggggatlc cccggggccg ggatttacc cccacgactc cgccccctac 180
ggcgctctgg atatggccga cttcgagttt gagcagaccg gaattcccgg ggatctgggc 240
ccccccgacc gatgtcagcc tgggggacga gctccactta gacggcgagg acgtggcgat 300
ggcgcatgcc gacgcgctag acgatttcga tctggacatg ttgggggacg gggattcccc 360
ggggccggga tttaccccc acgactccgc cccctacggc gctctggata tggccgactt 420
cgagtttgag cagatgttta ccgatgccct tgggaattgac gagtacggtg ggtag      475

```

< 210 > 4
 < 211 > 38
 5 < 212 > ADN
 < 213 > Homo sapiens

< 400 > 4

10 ggggtacctt ctctctccg cgtgtggagg gagccagc 38

< 210 > 5
 < 211 > 37
 < 212 > ADN
 15 < 213 > Homo sapiens

< 400 > 5

gctctagagt gagccaccag tgtccaaaaa aaggatg 37

20 < 210 > 6
 < 211 > 33
 < 212 > ADN
 < 213 > Homo sapiens

25 < 400 > 6

cgtagcctta agccggaatt cccggggatc tgg 33

30 < 210 > 7
 < 211 > 32
 < 212 > ADN
 < 213 > Homo sapiens

35 < 400 > 7

cgctctagac taccaccgt actcgtcaat tc 32

REIVINDICACIONES

1. Vector vírico adeno-asociado del pseudotipo 2/7 ó 2/8 que codifica la HIF-1-alfa, para el uso en un procedimiento de tratamiento de un mamífero con un trastorno de las motoneuronas.
5
2. Vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pseudotipo del vector vírico adeno-asociado es 2/7.
3. Vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pseudotipo del vector vírico adeno-asociado es 2/8.
10
4. Vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el vector se ha de inyectar en la médula espinal del mamífero.
- 15 5. Vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el vector se ha de liberar en una pluralidad de lugares de la médula espinal.
6. Vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el vector codifica una proteína de fusión formada por la HIF-1-alfa y la VP16 del VHS.
20
7. Vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el vector codifica una proteína de fusión formada por la HIF-1-alfa y el NF- κ B.
8. Vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la proteína de fusión es codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1.
25
9. Vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el mamífero presenta un estado patológico seleccionado del grupo formado por atrofia muscular bulboespinal , ataxia espinocerebelosa, atrofia muscular espinal y lesión traumática de la médula espinal.
30
10. Vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el mamífero tiene esclerosis lateral amiotrófica.
11. Vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el mamífero se selecciona del grupo formado por un roedor, un murino, un ser humano y un simio.
35
12. Vector vírico adeno-asociado para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el mamífero es un ser humano.
40

Fig. 1 Genomas vectoriales en la médula espinal

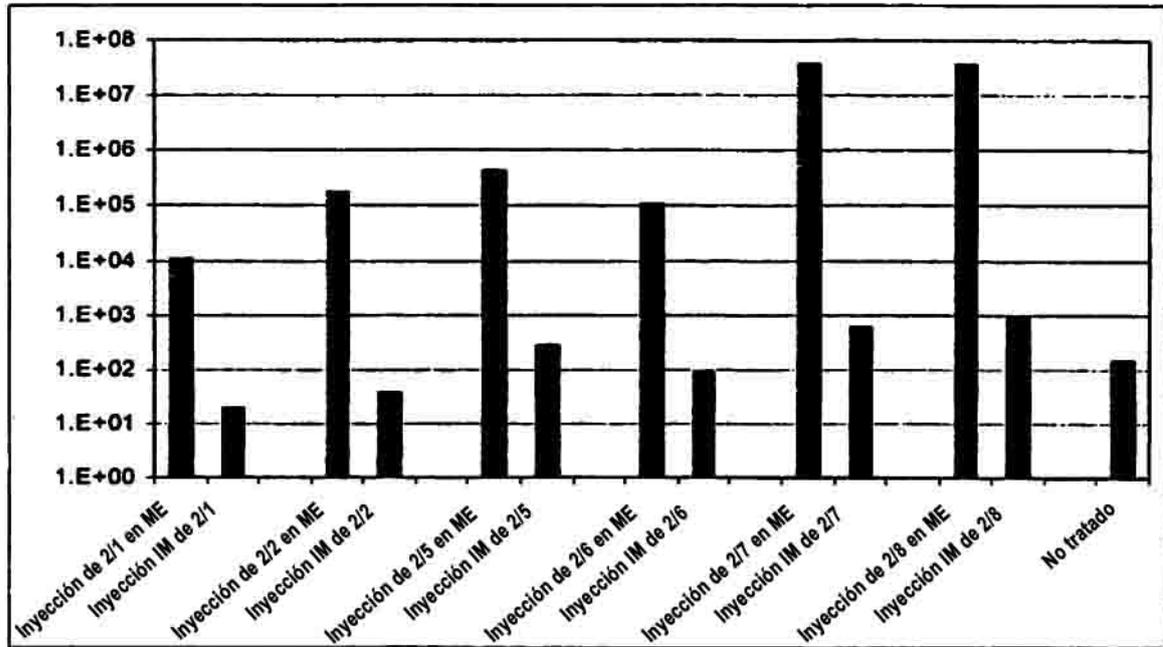


Fig. 2 Genomas vectoriales en el cerebro

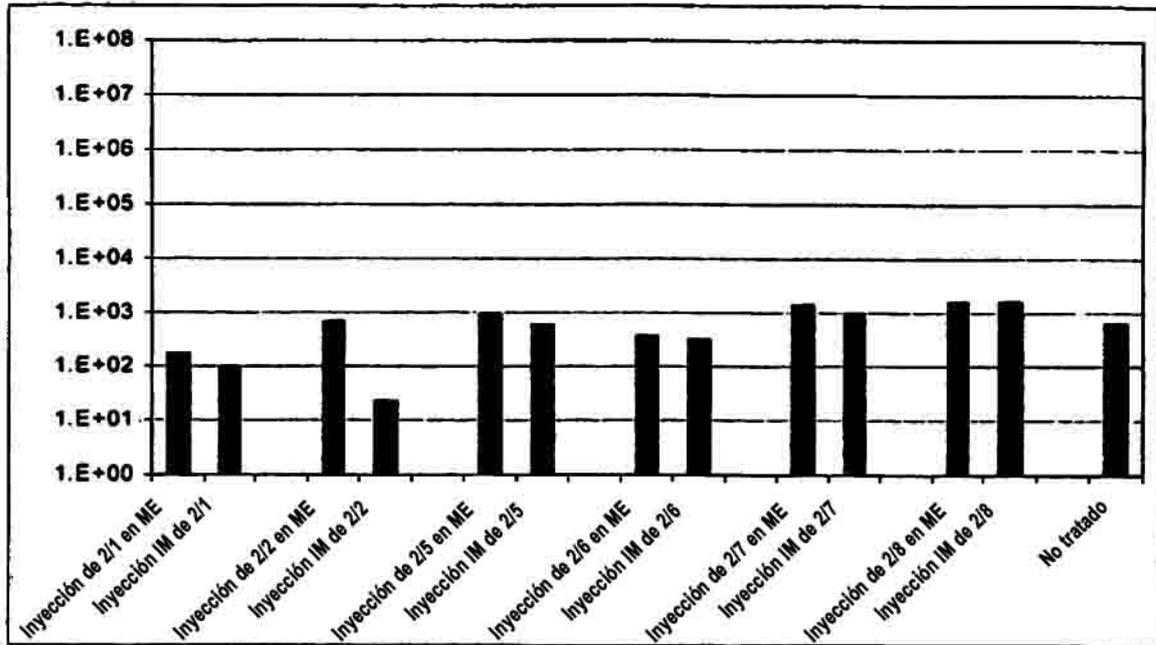
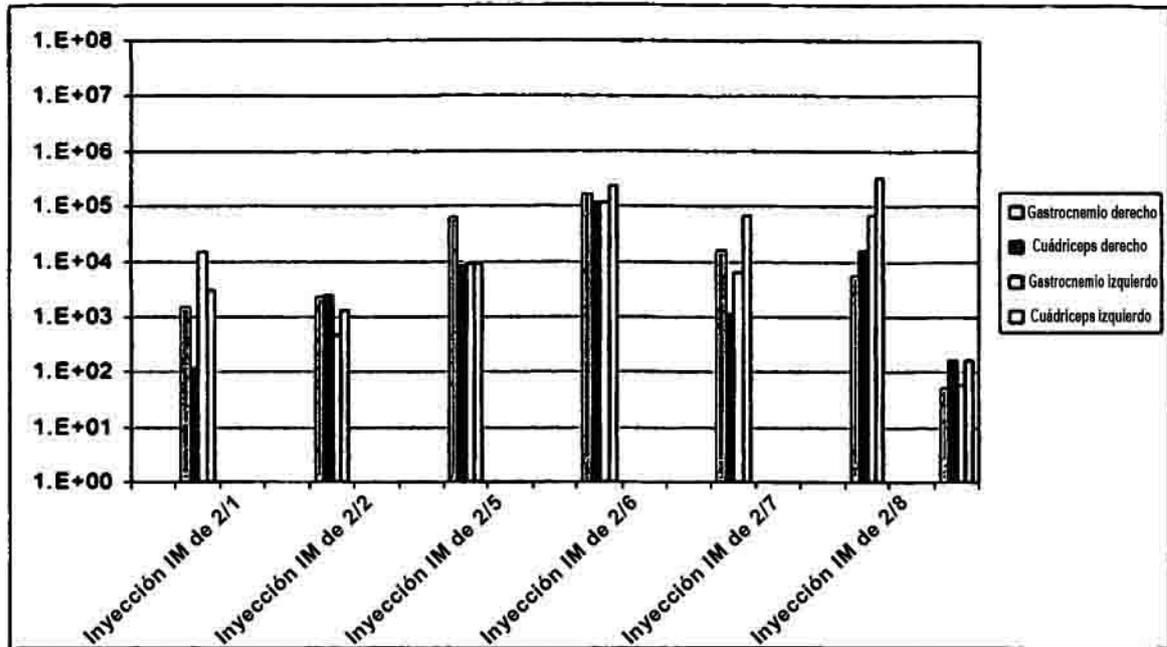


Fig. 3 Genomas vectoriales en los músculos



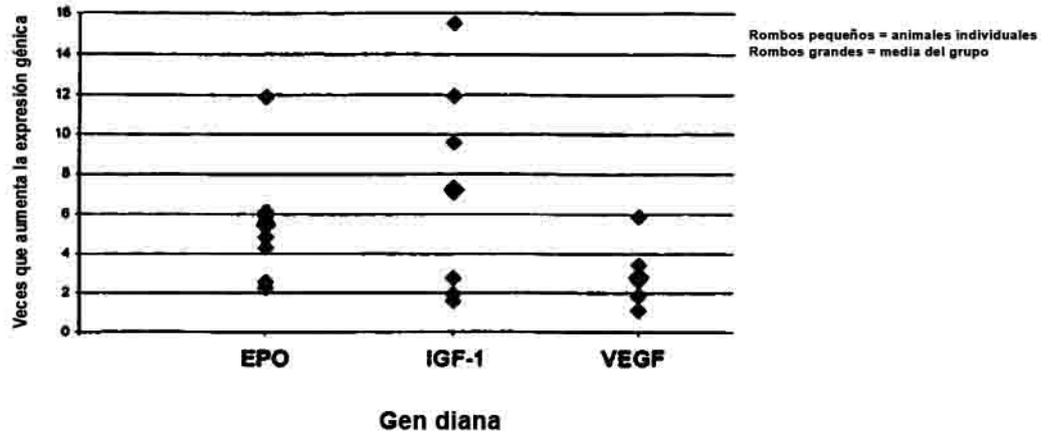
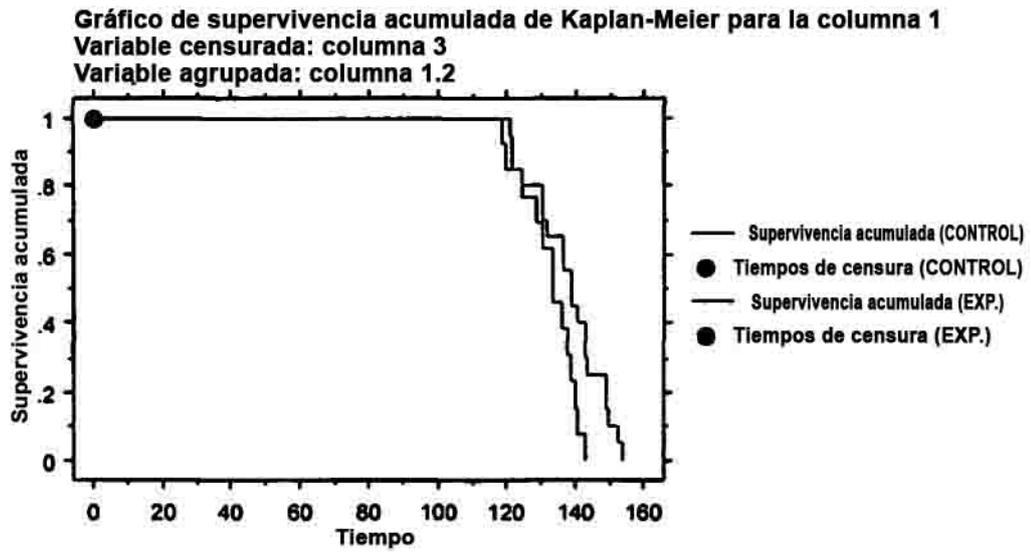


Fig. 4



Prueba de log-rank (Mantel-Cox) para la columna 1

Variable censurada: columna 3
Variable agrupada: columna 1.2

Chi-cuadrado	DF	Valor de P
4,543	1	,0331

Fig. 5

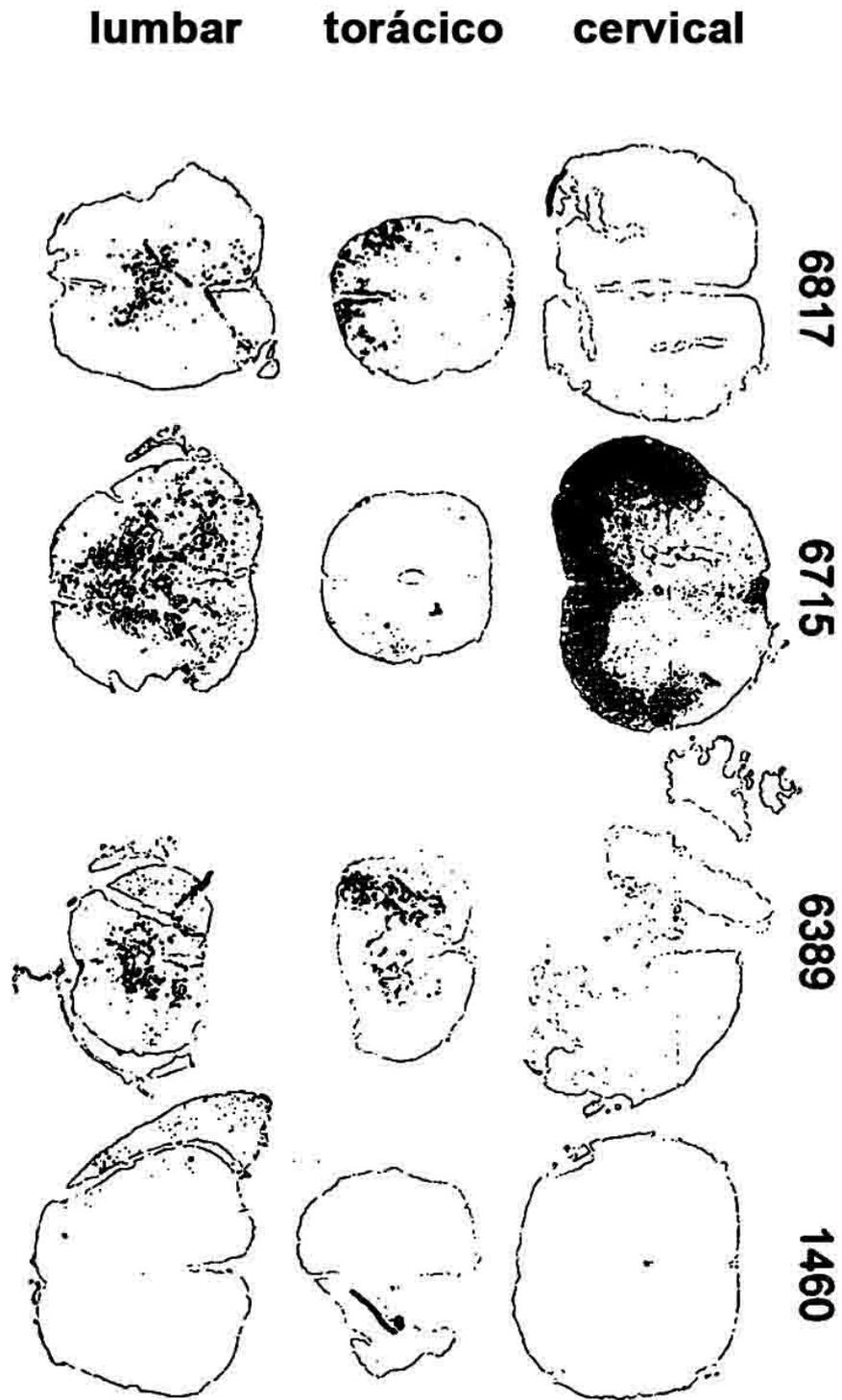


Fig. 6