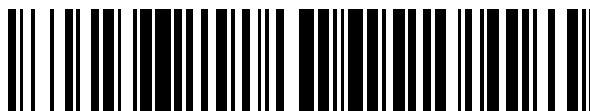


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 770**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/08** (2006.01)

**C07K 14/33** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2008 E 08836703 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2210611**

54 Título: **Uso de la secuencia que codifica el dominio carboxilo terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica como fármaco**

30 Prioridad:

**05.10.2007 ES 200702621**

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

**29.05.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (50.0%)**

**C/ Pedro Cerbuna 12**

**50009 Zaragoza, ES y**

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**(50.0%)**

72 Inventor/es:

**MORENO IGOA, MARÍA;**

**CALVO ROYO, ANA CRISTINA;**

**MUÑOZ GONZALVO, M<sup>a</sup> JESÚS;**

**ZARAGOZA FERNÁNDEZ, M<sup>a</sup> PILAR;**

**AGUILERA ÁVILA, JOSÉ y**

**OSTAS PINZOLAS, ROSARIO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 463 770 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

5 Uso de la secuencia que codifica el dominio carboxilo terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica como fármaco.

Esta invención se refiere al uso de la secuencia que codifica el dominio carboxilo terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica como fármaco, preferentemente en el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), así como al polipéptido codificado por dicha secuencia para el tratamiento de la enfermedad mencionada anteriormente.

10 **Antecedentes de la invención**

15 La Esclerosis Lateral Amiotrófica (enfermedad de Lou Gehrig o de Charcot) es una enfermedad progresiva, incurable y mortal que avanza hasta la degeneración de las motoneuronas a nivel medular, bulbar y de córtex motor. En el caso de España, la enfermedad presenta una incidencia de 2/100.000 y una prevalencia de 1/10.000, lo que indica que aproximadamente 40.000 españoles desarrollarán la enfermedad en algún momento a lo largo de su vida (fuente: Asociación Española de Esclerosis Lateral Amiotrófica -ADELA-).

20 A pesar de ser una enfermedad declarada como tal desde hace mucho tiempo, aún no se conocen con exactitud las causas que la originan y, aunque existen formas genéticas de esta enfermedad, también se conocen casos en los que no parece que tengan un origen hereditario. Por ello, se estima que el 10% de los casos son de origen genético, las formas familiares, de los cuales un 15-20% se corresponden con mutaciones a nivel de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD-1) e incluso también se han observado mutaciones en esta enzima en formas esporádicas de la enfermedad (Brown. R.H. Jr. (1997). Arch. Neurol. 54(10) 1246-1250). Mutaciones en NFH, el gen que codifica la cadena pesada de los neurofilamentos, también se han encontrado de forma excepcional en algún enfermo con Esclerosis Lateral Amiotrófica.

25 Consecuentemente, la investigación de la herencia genética de esta enfermedad presenta gran interés.

30 En los últimos años, la creación de modelos animales de la enfermedad ha sido una de las herramientas más relevantes en los estudios de tratamiento experimental, que han servido para aclarar algunas dudas sobre sus causas, aunque todavía éstas se desconocen en gran medida. Ni los ratones con los genes de la enzima SOD-1 desactivados, ni los animales transgénicos para diferentes mutaciones en la enzima SOD-1 humana han conseguido reproducir un cuadro clínico similar a la enfermedad en humanos. El animal que más se aproxima al desarrollo de la enfermedad es un transgénico que presenta varias copias de la superóxido dismutasa mutada en su posición 93, es el llamado SOD1G93A (Tu, P.H., et al. (1996.) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93(7): 3155-3160) que lo ha proporcionado el laboratorio The Jackson Laboratory.

35 A pesar de los numerosos estudios realizados tanto para conocer su causa como su mecanismo, por el momento no existen tratamientos clásicos efectivos. Actualmente, se encuentran en desarrollo tres líneas de investigación basadas en la aplicación de antagonistas del glutamato, factores neurotróficos y antioxidantes, aunque hasta la fecha ninguna de ellas ha conducido a un tratamiento eficaz.

40 Desde hace unos años se conoce la capacidad de los factores neurotróficos para rescatar a las motoneuronas de la degeneración. Han resultado de gran interés las experiencias de terapia génica realizadas en modelos animales, utilizando vectores adenovíricos que expresan diversos factores neurotróficos (GDNF, CNTF, NI-4, IGF-1), que han ofrecido resultados esperanzadores. Sin embargo, las inyecciones adenovíricas presentan el inconveniente de tener que aplicarse en animales neonatos debido a la gran respuesta inmune que ocasionan. Por tanto, aunque los resultados sean esperanzadores, resulta imprescindible el desarrollo de nuevos vectores menos inmunógenos que posibiliten un tratamiento efectivo de la ELA.

45 En relación a los ensayos clínicos que han sido llevados a cabo hasta la fecha, los iniciados en el año 1996 por el Dr. Schuelp, no obtuvieron resultados satisfactorios (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy>), siendo las posibles causas del fracaso: la naturaleza del factor neurotrófico utilizado en los ensayos (CNTF) y/o su falta de accesibilidad al Sistema Nervioso Central. En 1999, el grupo del Dr. Axel Kahn comprobó en modelos animales que efectivamente la vía de administración de dicho factor neurotrófico es un factor importante para su efecto terapéutico (Haase et al. (1999) Ann. Neurol. 45(3) 296-304). Esta falta de especificidad también ha sido propuesta como causa probable del fracaso en la administración de BDNF en humanos de forma subcutánea.

50 Por otra parte, cuando los factores neurotróficos son administrados de forma sistémica presentan problemas de toxicidad al actuar sobre otros tejidos. A pesar de todos estos inconvenientes, las posibilidades terapéuticas de los factores neurotróficos no han dejado de investigarse debido a sus prometedores resultados en la fase preclínica. Concretamente, el último ensayo clínico que está teniendo lugar en el Medical Center en Rochester (Minnesota) se basa de nuevo en la administración de un factor neurotrófico, IGF-1.

55 El documento WO2004/021992 describe el uso del dominio carboxilo terminal de la cadena pesada no tóxica de la toxina tetánica (HcTeTx) para dirigirse a proteínas diana en el SNC.

Larsen et al, Brain Research, 1120 n° 1, (2006) págs. 1-12, describen el uso del fragmento C-terminal de la toxina tetánica como un vehículo de entrega para administrar proteínas exógenas a las motoneuronas del SNC.

5 Bordet et al, Molecular and Cellular Neurosciences, San Diego, EE.UU., vol. 17, n° 5, (2001) págs. 842-854, describen una proteína de fusión del factor de crecimiento insulínico 1 y el fragmento C de la toxina tetánica, para una mejor administración de IGF-1 al SNC.

10 Chian et al, Society for Neuroscience, 33° Annual Meeting, New Orleans, USA, (2003), Resumen documental n° 413, describen el uso del fragmento C-terminal tetánico como un vehículo de entrega de proteínas exógenas a las motoneuronas del SNC.

### Descripción de la invención

15 Los autores de esta invención han descrito que el dominio carboxilo terminal, no tóxico, de la cadena pesada de la toxina tetánica (HcTeTx), (que hasta la fecha únicamente se había utilizado en el tratamiento de ELA como vehículo para diversos factores neurotróficos, así como de la enzima SOD-1, mediante la creación de proteínas de fusión), es capaz por sí mismo de prolongar la supervivencia de modelos animales de la enfermedad.

20 Por lo tanto, un primer aspecto de la invención proporciona el uso de un polinucleótido aislado que consiste en la secuencia que codifica el dominio carboxi-terminal de la subunidad pesada de la toxina tetánica (HcTeTx), o un fragmento de la secuencia codificadora o una variante polinucleotídica de la misma, como agente terapéutico para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de los síntomas de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), en donde

25 (a) el polipéptido codificado por el fragmento o la variante polinucleotídica conserva un efecto terapéutico sobre la ELA;

(b) la secuencia del polipéptido codificado por dicha variante polinucleotídica tiene una identidad de al menos 85% con la secuencia de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5;

30 (c) el polipéptido codificado por el polinucleótido aislado no forma parte de una proteína de fusión; y

(d) la HcTeTx, el fragmento de HcTeTx o una variante polipeptídica codificada por el polinucleótido aislado tiene una eficacia terapéutica propia.

35 En una realización preferida de la invención, la secuencia que codifica HcTeTx abarca desde el triplete que codifica el aminoácido V (Valina) del extremo amino terminal de HcTeTx, hasta el triplete que codifica el aminoácido D (Aspartato), preferentemente desde el aminoácido V (854) hasta D (1315) de la secuencia con número de orden (NCBI: P04958). En una realización todavía más preferida de este aspecto de la invención, la secuencia que codifica HcTeTx es SEQ ID NO: 1 y el fragmento de HcTeTx es SEQ ID NO: 5. De aquí en adelante, este polinucleótido será denominado el "*polinucleótido de la invención*".

40 En otra realización preferida, el polinucleótido de la invención puede estar mutado (deleción, inserción, inversión, mutación puntual, etc.) en donde dichas mutaciones no afectan a su capacidad para actuar como fármaco, concretamente para el tratamiento de ELA. El mantenimiento del efecto terapéutico del polinucleótido de la invención mutado se puede comprobar mediante la reproducción de cualquiera de los ejemplos I y II. A lo largo de la descripción, estos polinucleótidos mutados serán considerados también como variantes alélicas.

45 En una realización también preferida, el polinucleótido de la invención puede incluir además secuencias promotoras, terminadoras, silenciadoras, que faciliten su integración en cromosomas o en cualquier tipo de estructura organizativa del material genético, etc.

50 En un segundo aspecto, la invención proporciona el uso de un polipéptido aislado que consiste en el dominio carboxi-terminal de la subunidad pesada de la toxina tetánica (HcTeTx), un fragmento de HcTeTx o una variante polipeptídica, como agente terapéutico para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de los síntomas de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) en donde:

55 (a) el fragmento de HcTeTx o la variante polipeptídica conserva un efecto terapéutico sobre la ELA;

(b) la secuencia de la variante polipeptídica tiene una identidad de al menos 85% con la secuencia de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5;

(c) la HcTeTx, el fragmento de HcTeTx o una variante polipeptídica no forman parte de una proteína de fusión; y

60 (e) la HcTeTx, el fragmento de HcTeTx o una variante polipeptídica tiene una eficacia terapéutica propia.

La invención también se refiere al uso de un vector que incluye el polinucleótido de la invención para la elaboración de un fármaco, preferentemente para el tratamiento de ELA, en donde dicho vector se selecciona a partir del grupo que incluye (sin ningún tipo de limitación) plásmidos, fagos, cósmidos, fagémidos, cromosomas artificiales de levaduras (YAC), cromosomas artificiales de bacterias (BAC), cromosomas humanos artificiales (HAC), vectores víricos, tales como adenovirus, retrovirus o cualquier otro tipo de molécula de ADN o ARN con capacidad para

replicarse en el interior de una célula procariota o eucariota. De aquí en adelante, este vector será denominado "vector de la invención".

5 La invención también se refiere al uso de una célula transgénica para la elaboración de un fármaco, preferentemente para el tratamiento de ELA, en donde dicha célula comprende el polinucleótido de la invención o el vector de la invención.

10 La invención se refiere al uso de un polinucleótido aislado que incluye la secuencia que codifica HcTeTx aislada, sus variantes alélicas o fragmentos funcionales de las mismas para la elaboración de un fármaco para el tratamiento de ELA. En una realización preferida de la invención, la secuencia de HcTeTx abarca desde el aminoácido V(854) a D(1315) de la secuencia con número de orden (NCBI: P04958). En una realización todavía más preferida de este aspecto de la invención, la secuencia de HcTeTx es SEQ ID NO: 2 y el fragmento de HcTeTx es SEQ ID NO: 6. De aquí en adelante, este polinucleótido será denominado el "*polinucleótido de la invención*".

15 En otra realización preferida, el polipéptido de la invención está mutado (delección, inserción, inversión, sustituciones puntuales de aminoácidos, etc.), aunque dichas mutaciones no afectan a su capacidad para actuar como fármaco en el tratamiento de ELA. El mantenimiento del efecto terapéutico del polinucleótido mutado de la invención se puede comprobar mediante la reproducción de los ejemplos 1 y 2.

20 Para la administración del fármaco o el compuesto farmacéutico, el polinucleótido, los vectores, las células transgénicas o el polipéptido de la invención se formularán en una forma farmacéutica adecuada para su administración, empleando la vía de administración elegida. Para ello, dicho compuesto farmacéutico incluirá los vehículos y excipientes que son farmacéuticamente aceptables y necesarios para la elaboración de la forma farmacéutica de administración elegida. Información sobre excipientes o vehículos que se pueden utilizar en la  
25 elaboración de dichos compuestos farmacéuticos, así como sobre formas farmacéuticas de administración de los principios activos, en general, se puede encontrar en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

30 Dicho compuesto farmacéutico incluye, al menos, cualquiera de los elementos procedentes del grupo que incluye: el polinucleótido, los vectores, las células transgénicas, o el polipéptido de la invención se debe encontrar en una cantidad terapéuticamente eficaz. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del elemento seleccionado, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características del propio elemento polipéptido y el efecto terapéutico a conseguir, las características del individuo que vaya a ser tratado, la gravedad de la enfermedad que padezca dicho individuo, etc. De aquí en adelante este compuesto farmacéutico será  
35 conocido como "*compuesto farmacéutico o fármaco de la invención*".

40 El compuesto farmacéutico de la invención se puede administrar por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, por vía oral, parenteral, nasal (mucosa), etc., típicamente, por vía parenteral, ventajosamente, mediante su administración intramuscular o subcutánea. Asimismo, dicho compuesto farmacéutico puede estar en cualquier forma de presentación apropiada para su administración, por ejemplo, en forma sólida (comprimidos, cápsulas, gránulos, etc.), líquida (soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.), etc., para su administración por la vía de administración elegida. En una realización preferida, dicho compuesto farmacéutico se formula como una forma farmacéutica de dosificación unitaria apropiada.  
45

En una realización preferida, el compuesto farmacéutico puede estar en una forma farmacéutica para administración por vía oral, bien en forma sólida, preferentemente líquida, más preferentemente lista para su administración por la vía intramuscular. Ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, gránulos, soluciones, suspensiones, etc., y pueden contener excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y se pueden preparar por métodos convencionales. En otra realización preferida, los compuestos farmacéuticos también se pueden adaptar para una administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichos compuestos farmacéuticos incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación se puede encontrar en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones, citado anteriormente. Además, el compuesto farmacéutico puede comprender otros polipéptidos, polinucleótidos, vectores o células que aporten una mayor  
55 eficacia al compuesto.  
60

#### **Definiciones:**

El término "polinucleótido", tal y como se utiliza en esta memoria, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, y pueden ser desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos. Este término se refiere exclusivamente a la

estructura primaria de la molécula. Así, este término incluye ADN bicatenario y monocatenario, así como ARN bicatenario y monocatenario.

5 El término "aislado" a lo largo de la descripción, cuando se emplea en asociación con HcTeTx o su secuencia codificadora, no se refiere únicamente a que éstas se encuentran aisladas del cuerpo humano, sino que además no están formando parte de proteínas o enzimas de fusión que vayan a ejercer una función terapéutica.

10 La expresión "fragmento funcional de HcTeTx, variantes alélicas de la misma o las secuencias que las codifican" se refiere a lo largo de la descripción a un péptido o a un polinucleótido que incluye una porción de HcTeTx, sus variantes alélicas o sus secuencias codificadoras, que conservan su capacidad para actuar como fármaco, más concretamente para el tratamiento de ELA, en donde la conservación de su capacidad terapéutica se puede comprobar mediante la reproducción de los ejemplos 1-3.

15 La expresión "variante alélica" se refiere a lo largo de la descripción a un polipéptido que es sustancialmente homólogo y funcionalmente equivalente al dominio C-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica. Tal como se emplea en esta memoria, un péptido es "sustancialmente homólogo" a dicho dominio cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos de dicho dominio de, al menos, un 60%, 70%, 85% y, más preferentemente de, al menos, un 95%. Preferentemente la secuencia de aminoácidos del mencionado dominio es SEQ ID NO: 2. Esta expresión también se refiere en la descripción a un polinucleótido capaz de codificar un polipéptido sustancialmente homólogo que es funcionalmente equivalente a HcTeTx. De este modo, el polinucleótido podrá tener una homología de al menos un 40%, 50%, 60%, 70%, 85% o 95% con el polinucleótido que codifica HcTeTx, cuya secuencia nucleotídica es preferentemente SEQ ID NO: 1.

20 La expresión "funcionalmente equivalente", tal y como se emplea a lo largo de la descripción, significa que el polipéptido o el polipéptido [sic] mantiene su capacidad para actuar como un fármaco, más concretamente para el tratamiento de ELA, en donde el mantenimiento de su capacidad terapéutica se puede comprobar mediante la reproducción del ejemplo I o II.

25 Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la puesta en práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Breve descripción de las figuras

35 **Figura 1.** Amplificación con PCR para la detección de la expresión de HcTeTx. Diez días después de la inyección intramuscular del plásmido pCMV-HcTeTx (n=2, calles 1 y 2) y del plásmido vacío pCMV (n=2, calles 3 y 4) se extrajo el ARN del músculo y se procedió a la retrotranscripción. El ADNc obtenido se amplificó con PCR para el gen HcTeTx. La calle 5 muestra el testigo positivo (plásmido pCMV-HcTeTx) y en la calle 6 se cargó la diana de la reacción. En la calle M se encuentra el marcador de tamaño de 100 pb.

40 **Figura 2.** Efectos del tratamiento con ADN desnudo que codifica HcTeTx sobre el comienzo de los síntomas en ratones modelo para la enfermedad de ELA SOD1 G93A. La manifestación de los síntomas se retrasó significativamente en el grupo tratado con HcTeTx (n=10) con respecto al grupo testigo (n=10). Las probabilidades acumuladas se calcularon mediante el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier (SPSS 13.0).

45 **Figura 3.** Efectos del tratamiento con ADN desnudo que codifica HcTeTx sobre la supervivencia en ratones modelo para la enfermedad de ELA SOD1G93A. La supervivencia aumentó notablemente en el grupo tratado con HcTeTx (n=10) con respecto al grupo testigo (n=10). Las probabilidades acumuladas se calcularon mediante el análisis de supervivencia de Kaplan- Meier (SPSS 13.0).

50 **Figura 4.** Efectos del tratamiento con ADN desnudo que codifica HcTeTx. La actividad motora se determinó mediante el rodillo giratorio, "rotarod", a una velocidad constante de 14 rpm, con un tiempo máximo de desarrollo de 180 s. Se observó una mejor actividad motora en el grupo tratado con HcTeTx (n=10) respecto al grupo testigo (n=10).

55 **Figura 5.** Efecto de la inyección intramuscular de ADN desnudo que codifica HcTeTx en ratones SOD1-G93A. La fuerza y la función motora de los ratones se sometieron a ensayo por medio del test en jaula colgante de malla, "hanging-wire". Se utilizaron 10 ratones en cada grupo (n=10).

60 **Figura 6.** Efecto de la inyección intramuscular de ADN desnudo que codifica HcTeTx en ratones SOD1-G93A. Medidas de los pesos de los ratones transgénicos tratados con HcTeTx. Se utilizaron 10 ratones en cada grupo (n=10).

65 **Figura 7.** Análisis de la expresión de genes implicados en la ruta de señalización de la apoptosis en la médula espinal de ratones SOD1 G93A sintomáticos de 110 días de edad. Representación de los valores medios de ARN

mensajero de los genes Casp1, Casp3, Bax y Bcl2 y en el testigo (diana) y en los ratones tratados con HcTeTx (gris). Los grupos anteriores de ratones fueron comparados con ratones de tipo silvestre (negro) (n=5 ratones por grupo).

5 **Figura 8.** Análisis de las proteínas implicadas en la ruta de señalización de la apoptosis en la médula espinal de ratones SOD1 G93A sintomáticos de 110 días de edad. Análisis de transferencia Western de pro-Casp3, Casp3 activa, Bax y Bcl2 en proteínas empleadas en la médula espinal de ratones tratados con HcTeTx (rayas grises) y ratones testigo (rayas negras), en comparación con ratones de tipo silvestre (negro) (n=5 ratones por grupo).

10 **Figura 9.** Análisis de transferencia Western de la fosforilación de las proteínas Akt y Erk 1/2. Se analizaron muestras de 5 ratones por grupo. IDV (*Intensity Density Value*). Las cantidades analizadas con la transferencia Western se muestran como el índice respecto a  $\beta$ -tubulina en relación con los valores de los ratones de tipo silvestre. ( $^*P<0,05$ ,  $^{**}P<0,01$ ; las barras de error indican el SEM). Las barras representan los mismos grupos que se han descrito en la leyenda anterior.

15 **Figura 10.** Efectos del tratamiento intraperitoneal con el polipéptido que contiene el dominio C-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica (HcTeTx) sobre la supervivencia en ratones modelo para la enfermedad de ELA SOD1 G93A. La supervivencia aumentó significativamente en el grupo tratado con HcTeTx (n= 3) con respecto al grupo testigo (n=3, línea continua). Las probabilidades acumuladas se calcularon mediante el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier (SPSS 13.0).

20 **Figura 11.** El tratamiento intramuscular de ratones inyectados con HcTeTx afecta a la expresión de genes relacionados con la homeostasis del calcio en la médula espinal de ratones transgénicos SOD1G93A. Se determinaron los niveles de expresión de los genes Ncs1 y Rrad en ratones transgénicos tratados con HcTeTx (gris) o con el plásmido vacío (blanco). Los cambios en los niveles de ARN mensajero en los grupos anteriores de ratones fueron comparados con los ratones de tipo silvestre (negro). ( $^*P<0,05$ ;  $^{**}P<0,01$ ; las barras de error indican el SEM; n=5 ratones por grupo).

#### Descripción detallada de las realizaciones

30 A continuación, la invención se ilustra mediante los ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la eficacia de HcTeTx, así como su secuencia codificadora, para su uso como fármaco, y más preferentemente para el tratamiento de ELA.

#### Ejemplo 1

35 **La administración de HcTeTx vía inyección intramuscular de ADN desnudo retrasa el comienzo de los síntomas y prolonga la supervivencia en ratones SOD1G93A.**

40 La generación de animales transgénicos que sobreexpresan el gen de la superóxido dismutasa-1 (SOD-1) humana con distintas mutaciones ha proporcionado modelos animales para el estudio de la enfermedad de ELA. Estos animales presentan características clínicas y patológicas propias de los enfermos de ELA. Uno de los modelos más estudiados y caracterizados es el ratón transgénico SOD1 G93A, que presenta una mutación por sustitución del aminoácido glicina por alanina en la posición 93 en el gen de la enzima SOD-1. En este modelo animal se han sometido a ensayo con éxito diversos compuestos terapéuticos. Sin embargo no se ha traducido en una terapia efectiva en ensayos clínicos humanos, ya sea por una inadecuada ruta de administración y/o debido a la escasa biodisponibilidad de las moléculas terapéuticas para alcanzar las células diana. Algunas estrategias de terapia génica incluyen el uso del virus adenoasociado (VAA), que es transportado retrógradamente a las motoneuronas después de la inyección intramuscular. Sin embargo existe la posibilidad de que el uso de vectores víricos pueda causar daños añadidos en los enfermos tratados. La utilización del ADN desnudo se presenta como una estrategia alternativa más segura y apropiada para hacer llegar a los enfermos una terapia génica específica.

#### Materiales y métodos

##### 1.1 ADN desnudo que codifica HcTeTx

55 El gen que codifica HcTeTx (dominio C-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica -SEQ ID NO: 2 de 462 aminoácidos-) fue clonado en el plásmido de expresión eucariota pcDNA3.1 (Invitrogen), bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV). Los vectores se produjeron en bacterias *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) químicamente competentes y se purificaron utilizando el kit GenElute maxiprep de Sigma-Aldrich.

##### 1.2 Ratones transgénicos

60 Los ratones transgénicos que sobreexpresan SOD1 humana con la mutación G93A (B6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur) se obtuvieron en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Se utilizaron mutantes hemizigóticos en todos los experimentos (un macho mutante apareado con una hembra no transgénica). Los ratones transgénicos se identificaron por amplificación con PCR del ADN extraído de la cola, tal y como se describe en Gurney et al. (Gurney et al., 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation.

Science, 264 (5166): 1772-5). Los animales se conservaron en la Unidad Mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza. Se les proporcionó agua y comida a voluntad. Todos los experimentos realizados y los cuidados proporcionados a los animales se desarrollaron de acuerdo con las normas de la Universidad de Zaragoza y la guía internacional para el uso de animales de laboratorio.

### 1.3 Inyección intramuscular de ADN desnudo y extracción del músculo

A la edad de 8 semanas se inyectó intramuscularmente a ratones transgénicos SOD1 G93A, 300 µg de pCMV-HcTeTx en el músculo cuádriceps (dos inyecciones de 50 µg por músculo) y en el músculo tríceps (una inyección única de 50 µg por músculo). El grupo de ratones testigo fue inyectado con las mismas cantidades de un plásmido vacío. Diez días después de las inyecciones intramusculares de los plásmidos, se extrajeron los músculos inoculados que se congelaron previamente en nitrógeno líquido y se almacenaron posteriormente a -70°C.

### 1.4 Extracción de ARN, síntesis de ADNc y amplificación con PCR

Los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y seguidamente fueron pulverizados en un mortero frío. El ARN total de los músculos fue extraído de acuerdo con el protocolo de TRIzol Reagent (Invitrogen). Para la síntesis de ADNc se empleó el kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen), partiendo de 1 µg de ARN en un volumen final de 20 µL. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µL, con 150 nM de cada cebador, 150 µM de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de tampón, 0,2 U de Taq pol y 2 µl por reacción de ADNc diluidos 10 veces para la amplificación de un fragmento del gen HcTeTx. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador GeneAmp® Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los parámetros del termociclador fueron los siguientes: incubación a 94°C durante 3 min y 35 ciclos a 94°C durante 30 s, 61°C durante 30 s y 72°C durante 30 s. La presencia de la amplificación del gen HcTeTx se observó en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Las secuencias de los cebadores directo e inverso empleadas fueron SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, respectivamente. El tamaño del amplicón era de 355 pb.

### 1.5 Prueba de la barra giratoria, prueba de la rejilla y de supervivencia

La prueba de la rejilla se utilizó para determinar la fuerza muscular y el comienzo de los síntomas de ELA. Los animales realizaron esta prueba una vez por semana desde la edad de 8 semanas. Cada ratón fue colocado sobre una rejilla que servía de tapa para las jaulas convencionales. La rejilla se giró después 180° y se mantuvo a una distancia de aproximadamente 60 cm de una superficie blanda para evitar lesiones. Se cronometró la latencia de cada ratón hasta caer. Cada uno de los ratones tuvo hasta tres tentativas para sujetarse en la rejilla invertida durante un máximo de 180 s y se registró el período de tiempo más largo.

La prueba de la barra giratoria se empleó para evaluar la coordinación motora, la fuerza y el equilibrio. Los animales fueron colocados sobre la barra giratoria del aparato (ROTA-ROD/RS, LE8200, LSI-LETICA Scientific Instruments). Se registró el tiempo durante el cual un animal podía mantenerse en dicha barra a una velocidad constante de 14 rpm. Cada ratón tuvo tres oportunidades y se registró el período de tiempo más largo durante el cual los animales permanecieron sobre la barra sin caerse, tomando arbitrariamente un tiempo límite de 180 s.

El punto final en la vida de los ratones se consideró cuando los animales se colocaron en posición decúbito supino y no eran capaces de volverse sobre sí mismos.

## Resultados

### 2.1 Detección de la expresión del plásmido en el músculo

Inicialmente se confirmó la capacidad de pCMV-HcTeTx construido artificialmente para expresar el gen codificante en las células musculares de los ratones transgénicos SOD1 G93A. Debido a que no existe expresión endógena del gen HcTeTx en estos ratones, se aplicó a los músculos por inyección la amplificación con PCR de un fragmento de este gen, para la detección de la expresión del ARNm de dicha molécula. Como muestra la Figura 1, no se observó expresión del gen HcTeTx en el grupo testigo inyectado con plásmido vacío. Sin embargo la PCR reveló la presencia de la amplificación del gen HcTeTx en el músculo inoculado con el vector que codificaba el mismo, indicando que el vector alcanzaba con éxito las células musculares y que se realizaba el proceso de transcripción de dicho gen.

### 2.2 HcTeTx retrasa la manifestación de los síntomas, mejora la capacidad motora y prolonga la supervivencia de los ratones transgénicos SOD1 G93A

El tratamiento intramuscular con ADN desnudo que codificaba HcTeTx producía un retraso en el comienzo de los síntomas, mejoraba la actividad motora y posponía el punto final de la enfermedad en el ratón modelo para ELA, que contiene la mutación G93A en el gen SOD1 humano. La manifestación de los síntomas se registró como el primer día en el que los ratones no pudieron mantenerse sujetos en la rejilla invertida durante tres minutos. El comienzo de los síntomas se redujo muy significativamente en aproximadamente 8 días en el grupo de animales inyectados con HcTeTx, en comparación con el grupo testigo (Figura 2 y Tabla 1). Como se observa en la Figura 3 y en la Tabla 1, la máxima supervivencia se detectó en los ratones procedentes del grupo tratado con HcTeTx, que alcanzaron una media de 136 días; 16 días más que el grupo testigo. Entre las semanas 12 y 13 se observó un descenso significativo en el desarrollo de la actividad sobre la barra giratoria del grupo testigo, mientras que en el grupo de animales tratados no se observaron esas deficiencias hasta la semana 16 (Figura 4).

Tabla 1. Tabla en la que se recogen los datos en relación con la manifestación de los síntomas y la supervivencia, tanto en el grupo testigo como en el tratado con HcTeTx, así como el valor P (Log Rank, Mantel-Cox).

	Testigo (n=10)	HcTeTx (n=10)	Valor de P
<b>Comienzo de los síntomas (días)</b>	102,4 ± 2,4	110,9 ± 2,0	0,0295
<b>Mortalidad (días)</b>	120,5 ± 3,9	136,0 ± 3,	0,0093
<b>Diferencia comienzo-mortalidad (días)</b>	18,1	25,1	

El tratamiento también fue evaluado en ratones a partir de las 8 semanas de edad mediante el test en "jaula colgante de malla" (Figura 5). A las 14 semanas de edad, los ratones SOD1G93A mostraron las primeras muestras de debilidad, mientras que el grupo de ratones tratados con HcTeTx se mostraron más resistentes entre las semanas 14-16. Además, los ratones del grupo testigo empezaron a perder peso a partir de 14 semanas de edad, lo que estaba asociado a la enfermedad. Sin embargo, el tratamiento con HcTeTx contrarrestó significativamente la pérdida de peso, mostrando un peso máximo a las 15 semanas (Figura 6).

## Ejemplo 2

### Inhibición de la apoptosis en la médula espinal de los ratones SOD1G93A tratados mediante inyección intramuscular de ADN desnudo que codifica HcTeTx

#### Materiales y métodos

##### 1.1 ADN desnudo que codifica HcTeTx

El gen que codifica HcTeTx (dominio C-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica -SEQ ID NO: 1) se clonó en el plásmido de expresión eucariota pDNAC3.1 (Invitrogen), bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV). Los vectores se produjeron en bacterias *Escherichia coli* (DH5α) químicamente competentes y se purificaron utilizando el kit Genelute maxiprep de Sigma-Aldrich.

##### 1.2 Ratones transgénicos

Los ratones transgénicos que sobreexpresan SOD1 humana con la mutación G93A (B6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur) se obtuvieron a partir de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Se utilizaron mutantes hemizigóticos en todos los experimentos (un macho mutante apareado con una hembra no transgénica). Los ratones transgénicos se identificaron por amplificación con PCR del ADN extraído de la cola, tal y como se describe en Gurney et al. (Gurney et al., 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264 (5166): 1772-5). Los animales se conservaron en la Unidad Mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza. Se les proporcionó agua y comida a voluntad. Todos los experimentos realizados y el cuidado de los animales se desarrollaron de acuerdo con las normas de la Universidad de Zaragoza y la guía internacional para el uso de animales de laboratorio. Se emplearon un total de 12 animales: de tipo silvestre (n=5), ratones SOD1 G93A inyectados con pDNAC3.1 (testigo, n=5) y ratones SOD1G93A tratados con HcTeTx (n=5).

##### 1.3 Inyección intramuscular de ADN desnudo y extracción de la médula espinal

A la edad de 8 semanas se inyectaron intramuscularmente ratones transgénicos SOD1 G93A con 300 µg de pCMV-HcTeTx en el músculo cuádriceps (dos inyecciones de 50 µg por músculo) y en el músculo tríceps (una inyección única de 50 µg por músculo). El grupo de ratones testigo fue inyectado con las mismas cantidades de plásmido vacío.

Las médulas espinales se extrajeron 110 días después de las inyecciones intramusculares de los plásmidos, que se congelaron previamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -70°C. Los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y seguidamente se pulverizaron en un mortero frío. La mitad de la muestra se empleó para la extracción de ARN y la otra mitad se utilizó para la extracción proteica.

##### 1.4 Extracción de ARN a partir de la médula espinal y síntesis de ADNc

El ARN total procedente de las médulas espinales se extrajo de acuerdo con el protocolo de RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen). Para la síntesis de ADNc se empleó el kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen), partiendo de 1 µg de ARN en un volumen final de 20 µL.

##### 1.5 PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µL, con 1X de TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems), 1X la mezcla de cebadores no marcados y sondas TaqMan® MGB (Applied Biosystems) para cada gen en estudio y 1 µL por reacción de ADNc diluido 10 veces. Para la normalización se emplearon 3 genes endógenos (ARNr 18s, GAPDH y β-actina). Las referencias de la mezcla de cebadores y sondas empleadas para amplificar cada uno de los genes en estudio fueron las siguientes: caspasa-3 (Mm00438023\_m1), caspasa-1 (Mm00438023\_m1), NCS-1 (Mm00490552\_m1), Rrad (Mm00451053\_m1), ARNr 18s (Hs99999901), GAPDH (4352932E) y β-actina (4352933E). Todas las reacciones de



PCR se realizaron en un termociclador ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Los parámetros de los ciclos térmicos fueron los siguientes: incubación a 94°C durante 10 min y 40 ciclos a 94°C durante 15 s y 60°C durante 1 s. La expresión relativa de caspasa-3, caspasa-1, NCS-1 y Rrad fue normalizada aplicando la media geométrica de los tres genes endógenos.

#### 1.6 Extracción de la proteína de médula espinal y análisis de transferencia Western

Las muestras de las médulas espinales de ratones de tipo silvestre y de ratones SOD1G93A tratados con HcTeTx se homogeneizaron en nitrógeno líquido con el tampón de extracción que tenía la siguiente composición: NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH=7,5, 1% de desoxicolato, 0,1% de SDS, 1% de Tritón X-100, NaOvA 1 mM, PMSF 1 mM, 10 µg/mL de leupeptina y aprotinina y 1 µg/mL de pepstatina. Se centrifugó a 4°C, durante 10 minutos a 3000 g. Una vez cuantificada la concentración de proteína del material sobrenadante de cada muestra empleando el método de BCA (9643 Sigma), se cargaron 25 µg de proteína en un gel de acrilamida al 10%. Se utilizaron membranas de PVDF para el proceso de transferencia, las cuales se bloquearon con solución TTBS de 5% de leche desnatada (Tris base 20 mM, NaCl 0,15 M, pH=7,5, 0,1% de Tween) durante una hora. Más tarde se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C (anti-p-Akt (sc-7985R, Santa Cruz)). Se utilizó GAPDH (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa) para normalizar el medio obtenido con Akt (anti-GAPDH (sc-25778, Santa Cruz)). Después de incubar con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron con TTBS y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió a revelar mediante quimioluminiscencia (Western Blotting Luminol Reagent, sc-2048 Santa Cruz). Las películas se escanearon y se analizaron empleando el programa informático AlphaEase FC (Bonsai Technologies). El análisis estadístico se llevó a cabo usando el test de ANOVA y el test de Student-Neuman-Keuls.

### Resultados

En este estudio se presentan los resultados de la aplicación de HcTeTx sobre ratones SOD1G93A modelos para la enfermedad de ELA, en los que existe una degeneración de las motoneuronas. El estudio transcripcional a nivel de médula espinal de estos ratones, en la etapa sintomática se muestra en la Figura 7. Se comparó la regulación transcripcional de los genes caspasa-1, caspasa-3, Bax y Bcl2 implicados en apoptosis en la etapa sintomática de inicio tardío (110 días de edad) en la médula espinal de los ratones de tipo silvestre y los ratones SOD1G93A. Los resultados mostraron una inducción significativa de los genes caspasa-1 ( $P<0,05$ ), caspasa-3 ( $P<0,05$ ) y Bcl2 ( $P<0,01$ ), pero no se encontró ninguna diferencia significativa en el perfil del gen Bax ( $P>0,05$ ) en ratones testigos SOD1 G93A cuando se compararon con el tipo silvestre (Figura 7). En el grupo de ratones que recibieron el tratamiento con HcTeTx, los niveles de expresión de caspasa-1 y caspasa-3 se mantuvieron en el tipo silvestre y solo se encontraron diferencias significativas cuando se compararon con el grupo de ratones no tratados ( $P<0,05$  y  $P<0,01$ , respectivamente). Sin embargo, la expresión de los genes Bax y Bcl2 no estaba afectada por el tratamiento de hct ( $P>0,05$ ) en las médulas espinales de estos ratones transgénicos (Figura 7).

Para evaluar los efectos de HcTeTx sobre los mecanismos que revierten la apoptosis que pueden inducir muerte celular en la médula espinal de los ratones SOD1G93A, también se realizó un estudio de proteínas. Los datos revelaron que la activación del gen caspasa-3 ( $P<0,05$ ) disminuyó perceptiblemente en los ratones tratados con HcTeTx en relación con el grupo testigo, alcanzando niveles similares a los ratones de tipo silvestre, mientras que los niveles de la proteína pro-caspasa-3 no se vieron afectados en los animales transgénicos. En contraste con los resultados obtenidos del análisis de la expresión, en la transferencia Western se observó que las proteínas Bax y Bcl2 estaban en menor cantidad en los ratones tratados con HcTeTx (Figura 8).

Un mecanismo de acción de HcTeTx es la fosforilación de Akt (Gil et al., 2003. Biochem J. 373:613-620), una proteína cinasa que es activada por varios factores de crecimiento implicados en el bloqueo de rutas mediadas por fosfatidilinositol 3-cinasa. La cuantificación densitométrica indicó que los animales tratados con HcTeTx tenían más de dos veces los niveles de Akt fosforilada en Ser473, cuando se compararon con los testigos del vector vacío ( $P<0,05$ ), según lo determinado por el análisis de transferencia Western, mediante el empleo de anticuerpos fosfoespecíficos (Figura 9). La carga equimolar de proteínas fue confirmada por detección con anticuerpos anti-tubulina. La fosforilación de ERK1/2 mediante HcTeTx se ha descrito previamente en neuronas corticales cultivadas (Gil et al., 2003. Biochem J. 373:613-620). Para confirmar la implicación de HcTeTx en la ruta de la MAP cinasa, se realizaron análisis de transferencia Western en los extractos de la médula espinal de ratones SOD1G93A tratados y no tratados, de 110 días de edad. Los resultados mostraron una activación creciente de ERK1/2 en los ratones testigos cuando se compararon con el grupo tratado con HcTeTx (Figura 9), pero el nivel de expresión fue similar al de los ratones de tipo silvestre.

### Ejemplo 3

**Incremento de la supervivencia en ratones SOD1G93A modelos para la esclerosis lateral amiotrófica después de la administración vía inyección intraperitoneal de un polipéptido que incluye el dominio C-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica (HcTeTx).**

### Materiales y Métodos

1.1 Extracción del polipéptido que incluye el dominio C-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica (HcTeTx)  
El polipéptido utilizado (denominado HcTeTx) corresponde al dominio C-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica e incluye la secuencia de 451 aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de SEQ ID NO: 2, y se ha obtenido siguiendo el protocolo descrito por Gil et al. (Gil et al., 2003. Biochem. J. 373,613-620).

### 1.2 Ratones transgénicos

Los ratones transgénicos que sobreexpresan SOD1 humana con la mutación G93A (B6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur) se obtuvieron a partir de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Se utilizaron mutantes hemizigóticos en todos los experimentos (un macho mutante apareado con una hembra no transgénica). Los ratones transgénicos se identificaron por amplificación con PCR del ADN extraído de la cola, tal y como se describe en Gurney et al. (Gurney et al., 1994. Science, 264 (5166): 1772-5). Los animales se conservaron en la Unidad Mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza. Se les proporcionó agua y comida a voluntad. Todos los experimentos realizados y el cuidado de los animales se desarrollaron de acuerdo con las normas de la Universidad de Zaragoza y la guía internacional para el uso de animales de laboratorio.

### 1.3 Inyección intraperitoneal del polipéptido en los animales

A la edad de 12 semanas se inyectaron intraperitonealmente los ratones transgénicos SOD1 G93A con 250  $\mu$ l a una concentración de 0,5  $\mu$ M del polipéptido que incluía el dominio C-terminal de la toxina tetánica (HcTeTx). La inyección se repitió semanalmente durante toda la vida.

### 1.4 Medida de la supervivencia en los animales

El punto final en la vida de los ratones se consideró cuando el animal colocado en posición decúbito supino no fue capaz de volverse sobre sí mismo.

## Resultados

### 1.1.- HcTeTx prolongaba la supervivencia de los ratones transgénicos SOD1G93A

Como se puede observar en la Figura 10 y en la Tabla 2, la máxima supervivencia se detectó en los ratones del grupo tratado con HcTeTx, que alcanzaron una media de 135 días; 9 días más que el grupo testigo.

Tabla 2. Se muestran los datos de la supervivencia, tanto en el grupo testigo como en el tratado con HcTeTx, así como el valor P.

	Testigo (n=3)	HcTeTx (n=3)	Valor P
Mortalidad	126 $\pm$ 4	135 $\pm$ 2	0,021

## Ejemplo 4

### **La administración de HcTeTx causa cambios en la expresión de genes relacionados con el calcio en la médula espinal de ratones SOD1G93A.**

Hay evidencias de una homeostasis anormal intracelular del calcio, relacionada con la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Se ha mostrado que la proteína neuronal NCS1 regula la neurosecreción de una manera dependiente de calcio (McFerran et al., 1998. J. Biol. Chem. 273: 22768-22772) y también se ha relacionado con la modulación de las enzimas dependientes de calcio/calmodulina implicadas en la transducción neuronal de la señal (Schaad et al., 1996. PNAS. 93: 9253- 9258). Se sometió a ensayo la expresión de NCS1 en las médulas espinales de ratones SOD1 G93A, 50 días después del tratamiento con HcTeTx. En los experimentos de RT-PCR se encontró que la expresión del gen NCS1 estaba reprimida ( $P < 0,05$ ) en los ratones transgénicos con sintomatología de inicio tardío respecto a los ratones de tipo silvestre de la misma edad. Por otra parte, los ratones que recibieron el tratamiento intramuscular de HcTeTx tenían niveles más altos de NCS1 ( $P < 0,05$ ), acercándose a los del tipo silvestre. Con las mismas muestras, se analizaron los niveles del ARN mensajero en el gen relacionado con Ras y asociado con el gen de la diabetes (Rrad). En este ejemplo, se muestra que los niveles de Rrad se incrementaron casi dos veces en la médula espinal de los ratones transgénicos testigos, cuando se compararon con ratones de tipo silvestre de una edad comparable. Sin embargo, en comparación con los testigos, el tratamiento con HcTeTx en ratones SOD1G93A redujo perceptiblemente la expresión de Rrad ( $P < 0,05$ ), alcanzando valores similares a los obtenidos en los ratones de tipo silvestre (Figura 11).

**Lista de secuencias**

<110> UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA  
 <120> USO DE LA SECUENCIA QUE CODIFICA EL DOMINIO CARBOXI-TERMINAL DE LA CADENA PESADA DE LA TOXINA TETÁNICA COMO MEDICAMENTO.  
 5 <130> ES1510.16  
 <160> 6  
 <170> PatentIn versión 3.4  
 <210> 1  
 10 <211> 1392  
 <212> ADN  
 <213> Clostridium tetani  
 <400> 1

```

atgggttttt caacaccaat tccattttct tattctaaaa atctggattg ttgggttgat      60
aatgaagaag atatagatgt tatattaaaa aagagtacaa ttttaaattt agatattaat      120
aatgatatta tadcagatat atctgggttt aattcatctg taataacata tccagatgct      180
caattggtgc ccggaataaa tggcaaagca atacatttag taaacaatga atcttctgaa      240
gttatagtg ataaagctat ggatattgaa tataatgata tgtttaataa ttttaccggt      300
agcttttggg tgagggttcc taaagtatct gctagtcatt tagaacaata tggcacaat      360
gagtattcaa taattagctc tatgaaaaaa catagtctat caataggatc tggttggagt      420
gtatcactta aaggtaataa cttaatatgg actttaaag attccgcggg agaagttaga      480
caaataactt ttagggattt acctgataaa ttaaatgctt atttagcaaa taaatgggtt      540
ttataacta ttactaatga tagattatct tctgctaatt tgtatataaa tggagtactt      600
atgggaagtg cagaaattac tggtttagga gctattagag aggataataa tataacatta      660
aaactagata gatgtaataa taataatcaa tacgtttcta ttgataaatt taggatattt      720
tgcaaagcat taaatccaaa agagattgaa aaattataca caagttattt atctataacc      780
tttttaagag acttctgggg aaacccttta cgatatgata cagaatatta tttaatacca      840
gtagcttcta gttctaaaga tgttcaattg aaaaatataa cagattatat gtatttgaca      900
aatgcgccat cgtatactaa cggaaaattg aatatatatt atagaagggt atataatgga      960
ctaaaattta ttataaaaag atatacacct aataatgaaa tagattcttt tgttaaatca     1020
ggtgatttta ttaaattata tgtatcatat aacaataatg agcacattgt aggttatccg     1080
aaagatggaa atgcctttaa taatcttgat agaattctaa gagtaggta taatgccccca     1140
ggtatccctc tttataaaaa aatggaagca gtaaaattgc gtgatttaaa aacctattct     1200
gtacaactta aattatatga tgataaaaat gcatctttag gactagtagg taccataat      1260
ggcacaatag gcaacgatcc aatagggat atattaattg caagcaactg gtactttaat      1320
catttaaaag ataaaatttt aggatgtgat tgggtactttg tacctacaga tgagggatgg      1380
15 acaaatgatt aa                                                                1392
    
```

<210> 2  
 <211> 462  
 <212> PRT  
 20 <213> clostridium tetani

<400>

Val Phe Ser Thr Pro Ile Pro Phe Ser Tyr Ser Lys Asn Leu Asp Cys  
 1 5 10 15

Trp Val Asp Asn Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile Leu Lys Lys Ser Thr  
 20 25 30

Ile Leu Asn Leu Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile Ser Asp Ile Ser Gly  
 35 40 45

Phe Asn Ser Ser Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala Gln Leu Val Pro Gly  
 50 55 60

Ile Asn Gly Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn Glu Ser Ser Glu Val  
 65 70 75 80

Ile Val His Lys Ala Met Asp Ile Glu Tyr Asn Asp Met Phe Asn Asn  
 85 90 95

Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His  
 100 105 110

Leu Glu Gln Tyr Gly Thr Asn Glu Tyr Ser Ile Ile Ser Ser Met Lys  
 115 120 125

Lys His Ser Leu Ser Ile Gly Ser Gly Trp Ser Val Ser Leu Lys Gly  
 130 135 140

Asn Asn Leu Ile Trp Thr Leu Lys Asp Ser Ala Gly Glu Val Arg Gln  
 145 150 155 160

Ile Thr Phe Arg Asp Leu Pro Asp Lys Phe Asn Ala Tyr Leu Ala Asn  
 165 170 175

Lys Trp Val Phe Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg Leu Ser Ser Ala Asn  
 180 185 190

Leu Tyr Ile Asn Gly Val Leu Met Gly Ser Ala Glu Ile Thr Gly Leu  
 195 200 205

Gly Ala Ile Arg Glu Asp Asn Asn Ile Thr Leu Lys Leu Asp Arg Cys  
 210 215 220

Asn Asn Asn Asn Gln Tyr Val Ser Ile Asp Lys Phe Arg Ile Phe Cys  
 225 230 235 240

Lys Ala Leu Asn Pro Lys Glu Ile Glu Lys Leu Tyr Thr Ser Tyr Leu  
 245 250 255

Ser Ile Thr Phe Leu Arg Asp Phe Trp Gly Asn Pro Leu Arg Tyr Asp  
 260 265 270

Thr Glu Tyr Tyr Leu Ile Pro Val Ala Ser Ser Ser Lys Asp Val Gln  
 275 280 285

Leu Lys Asn Ile Thr Asp Tyr Met Tyr Leu Thr Asn Ala Pro Ser Tyr  
 290 295 300

Thr Asn Gly Lys Leu Asn Ile Tyr Tyr Arg Arg Leu Tyr Asn Gly Leu  
 305 310 315 320

Lys Phe Ile Ile Lys Arg Tyr Thr Pro Asn Asn Glu Ile Asp Ser Phe  
 325 330 335

Val Lys Ser Gly Asp Phe Ile Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Asn Asn Asn  
 340 345 350

Glu His Ile Val Gly Tyr Pro Lys Asp Gly Asn Ala Phe Asn Asn Leu  
 355 360 365

Asp Arg Ile Leu Arg Val Gly Tyr Asn Ala Pro Gly Ile Pro Leu Tyr  
 370 375 380

Lys Lys Met Glu Ala Val Lys Leu Arg Asp Leu Lys Thr Tyr Ser Val  
 385 390 395 400

Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp Lys Asn Ala Ser Leu Gly Leu Val Gly  
 405 410 415

Thr His Asn Gly Gln Ile Gly Asn Asp Pro Asn Arg Asp Ile Leu Ile  
 420 425 430

Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn His Leu Lys Asp Lys Ile Leu Gly Cys  
 435 440 445

Asp Trp Tyr Phe Val Pro Thr Asp Glu Gly Trp Thr Asn Asp  
 450 455 460

<210> 3  
 <211> 21  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial (cebador)  
 <400> 3  
 agattccgcg ggagaagta g 21  
 <210> 4  
 10 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial (cebador)  
 <400> 4  
 tcgtaaagg tttcccaga a 21  
 15 <210> 5  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> clostridium tetani  
 <220>  
 20 <221> MISC\_FEATURE

ES 2 463 770 T3

<222> (1)..(451)

<223> Fragmento de SEQ ID NO:2

<400>

5

Lys Asn Leu Asp Cys Trp Val Asp Asn Glu Glu Asp Ile Asp Val Ile  
 1 5 10 15

Leu Lys Lys Ser Thr Ile Leu Asn Leu Asp Ile Asn Asn Asp Ile Ile  
 20 25 30

Ser Asp Ile Ser Gly Phe Asn Ser Ser Val Ile Thr Tyr Pro Asp Ala  
 35 40 45

Gln Leu Val Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn  
 50 55 60

Glu Ser Ser Glu Val Ile Val His Lys Ala Met Asp Ile Glu Tyr Asn  
 65 70 75 80

Asp Met Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys  
 85 90 95

Val Ser Ala Ser His Leu Glu Gln Tyr Gly Thr Asn Glu Tyr Ser Ile  
 100 105 110

Ile Ser Ser Met Lys Lys His Ser Leu Ser Ile Gly Ser Gly Trp Ser  
 115 120 125

Val Ser Leu Lys Gly Asn Asn Leu Ile Trp Thr Leu Lys Asp Ser Ala  
 130 135 140

Gly Glu Val Arg Gln Ile Thr Phe Arg Asp Leu Pro Asp Lys Phe Asn  
 145 150 155 160

Ala Tyr Leu Ala Asn Lys Trp Val Phe Ile Thr Ile Thr Asn Asp Arg  
 165 170 175

Leu Ser Ser Ala Asn Leu Tyr Ile Asn Gly Val Leu Met Gly Ser Ala  
 180 185 190

Glu Ile Thr Gly Leu Gly Ala Ile Arg Glu Asp Asn Asn Ile Thr Leu  
 195 200 205

Lys Leu Asp Arg Cys Asn Asn Asn Asn Gln Tyr Val Ser Ile Asp Lys

210	215	220
Phe Arg Ile Phe Cys Lys Ala Leu Asn Pro Lys Glu Ile Glu Lys Leu 225 230 240		
Tyr Thr Ser Tyr Leu Ser Ile Thr Phe Leu Arg Asp Phe Trp Gly Asn 245 250 255		
Pro Leu Arg Tyr Asp Thr Glu Tyr Tyr Leu Ile Pro Val Ala Ser Ser 260 265 270		
Ser Lys Asp Val Gln Leu Lys Asn Ile Thr Asp Tyr Met Tyr Leu Thr 275 280 285		
Asn Ala Pro Ser Tyr Thr Asn Gly Lys Leu Asn Ile Tyr Tyr Arg Arg 290 295 300		
Leu Tyr Asn Gly Leu Lys Phe Ile Ile Lys Arg Tyr Thr Pro Asn Asn 305 310 315 320		
Glu Ile Asp Ser Phe Val Lys Ser Gly Asp Phe Ile Lys Leu Tyr Val 325 330 335		
Ser Tyr Asn Asn Asn Glu His Ile Val Gly Tyr Pro Lys Asp Gly Asn 340 345 350		
Ala Phe Asn Asn Leu Asp Arg Ile Leu Arg Val Gly Tyr Asn Ala Pro 355 360 365		
Gly Ile Pro Leu Tyr Lys Lys Met Glu Ala Val Lys Leu Arg Asp Leu 370 375 380		
Lys Thr Tyr Ser Val Gln Leu Lys Leu Tyr Asp Asp Lys Asn Ala Ser 385 390 395 400		
Leu Gly Leu Val Gly Thr His Asn Gly Gln Ile Gly Asn Asp Pro Asn 405 410 415		
Arg Asp Ile Leu Ile Ala Ser Asn Trp Tyr Phe Asn His Leu Lys Asp 420 425 430		
Lys Ile Leu Gly Cys Asp Trp Tyr Phe Val Pro Thr Asp Glu Gly Trp 435 440 445		
Thr Asn Asp 450		

<210> 6  
 <211> 1359  
 <212> ADN  
 <213> clostridium tetani

5

&lt;400&gt;

atgaaaaatc tggattggtg gggtgataat gaagaagata tagatggtat attaaaaaag	60
agtacaattt taaatttaga tattaataat gatattatat cagatatatc tgggtttaat	120
tcatctgtaa taacatatcc agatgctcaa ttggtgcccg gaataaatgg caaagcaata	180
catttagtaa acaatgaatc ttctgaagtt atagtgcata aagctatgga tattgaatat	240
aatgatatgt ttaataattt taccgtagc ttttggtga gggttcctaa agtatctgct	300
agtcatttag aacaatatgg cacaaatgag tattcaataa ttagctctat gaaaaaacat	360
agtctatcaa taggatctgg ttggagtgta tcacttaaag gtaataactt aatatggact	420
ttaaaagatt ccgcgggaga agttagacaa ataacttta gggatttacc tgataaattt	480
aatgcttatt tagcaataa atgggttttt ataactatta ctaatgatag attatcttct	540
gctaatttgt atataaatgg agtacttatg ggaagtgcag aaattactgg tttaggagct	600
attagagagg ataataatat aacattaaaa ctagatagat gtaataataa taatcaatac	660
gtttctattg ataaatttag gatattttgc aaagcattaa atccaaaaga gattgaaaaa	720
ttatacacia gttatttacc tataaccttt ttaagagact tctggggaaa ccctttacga	780
tatgatacag aatattattt aataccagta gcttctagtt ctaaagatgt tcaattgaaa	840
aatataacag attatatgta ttgacaaat gcgccatcgt atactaacgg aaaattgaat	900
atatattata gaaggttata taatggacta aaatttatta taaaagata tacaccta	960
aatgaaatag attcttttgt taaatcaggt gattttatta aattatatgt atcatataac	1020
aataatgagc acattgtagg ttatccgaaa gatggaaatg cctttaataa tcttgataga	1080
attctaagag taggttataa tgccccaggt atccctcttt ataaaaaat ggaagcagta	1140
aaattgctg atttaaaaac ctattctgta caacttaaat tatatgatga taaaaatgca	1200
tctttaggac tagtaggtac ccataatggt caaataggca acgatccaaa tagggatata	1260
ttaattgcaa gcaactggta cttaaatcat ttaaaagata aaattttagg atgtgattgg	1320
tactttgtac ctacagatga gggatggaca aatgattaa	1359



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un polinucleótido aislado que consiste en la secuencia que codifica el dominio carboxi-terminal de la subunidad pesada de la toxina tetánica (HcTeTx), o un fragmento de la secuencia codificadora o una variante polinucleotídica de la misma, como agente terapéutico en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de los síntomas de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), en donde
- 10 (a) el polipéptido codificado por el fragmento o la variante polinucleotídica conserva un efecto terapéutico sobre la ELA;
- (b) la secuencia del polipéptido codificado por dicha variante polinucleotídica tiene una identidad de al menos 85% con la secuencia de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5;
- (c) el polipéptido codificado por el polinucleótido aislado no forma parte de una proteína de fusión; y
- (d) la HcTeTx, el fragmento de HcTeTx o una variante polipeptídica codificada por el polinucleótido aislado tiene una eficacia terapéutica propia.
- 15 2. Uso según la reivindicación 1, en donde dicha secuencia que codifica el dominio carboxi-terminal de la subunidad pesada de la toxina tetánica (HcTeTx) es SEQ ID NO: 1.
- 20 3. Uso según la reivindicación 1, en donde dicha secuencia codificante es SEQ ID NO: 6.
4. Uso según la reivindicación 1, en donde dicho polinucleótido está destinado a una administración como ADN desnudo.
- 25 5. Uso según la reivindicación 1, en donde dicho polinucleótido está destinado a una administración vía oral, parenteral, intramuscular o nasal
6. Uso según la reivindicación 1, en donde dicho polinucleótido está destinado a una administración en un músculo.
- 30 7. Uso según la reivindicación 6, en donde dicho polinucleótido está destinado a la expresión *in vivo* en dicho músculo.
8. Uso según la reivindicación 1, en donde dicho polinucleótido se inserta en un vector de expresión.
- 35 9. Uso según la reivindicación 8, en donde dicho vector es capaz de expresión *in vivo*.
10. Uso según la reivindicación 9, en donde dicho vector comprende un promotor capaz de expresar el polinucleótido aislado contenido en dicho vector.
- 40 11. Uso según la reivindicación 8, en donde dicho vector es el vector de expresión pcDNA3.1.
12. Uso según la reivindicación 11, en donde dicho promotor es pCMV.
- 45 13. Uso de un polipéptido aislado que consiste en el dominio carboxi-terminal de la subunidad pesada de la toxina tetánica (HcTeTx), un fragmento de HcTeTx o una variante polipeptídica, como agente terapéutico para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de los síntomas de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), en donde:
- 50 (a) el fragmento de HcTeTx o la variante polipeptídica conserva un efecto terapéutico sobre la ELA;
- (b) la secuencia de la variante polipeptídica tiene una identidad de al menos 85% con la secuencia de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5;
- (c) la HcTeTx, el fragmento de HcTeTx o una variante polipeptídica no forman parte de una proteína de fusión; y
- (e) la HcTeTx, el fragmento de HcTeTx o una variante polipeptídica tiene una eficacia terapéutica propia.
- 55 14. Uso según la reivindicación 13, en donde dicho polipéptido aislado es el dominio carboxi-terminal de la subunidad pesada de la toxina tetánica (HcTeTx) (SEQ ID NO: 2).
15. Uso según la reivindicación 13, en donde dicho polipéptido aislado es SEQ ID NO: 5.
- 60 16. Uso según la reivindicación 13, en donde dicho polipéptido está destinado a una administración vía oral, parenteral, intramuscular o nasal.
17. Uso según la reivindicación 13, en donde dicho polipéptido está destinado a una administración intraperitoneal.
- 65

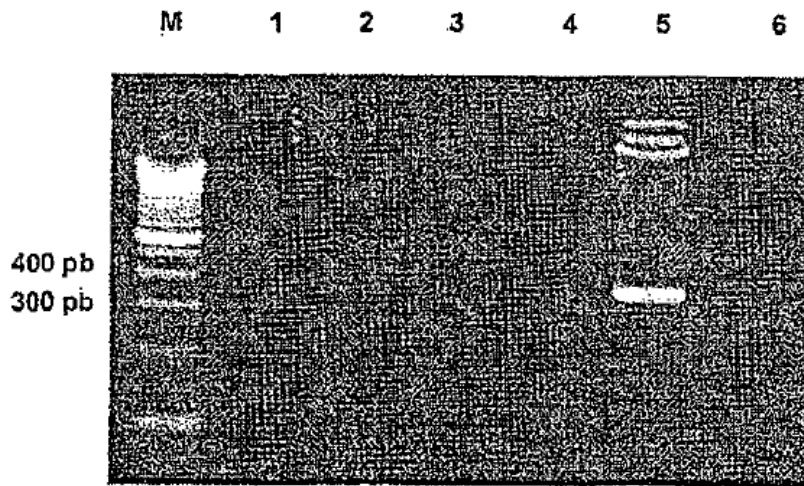


FIG. 1.

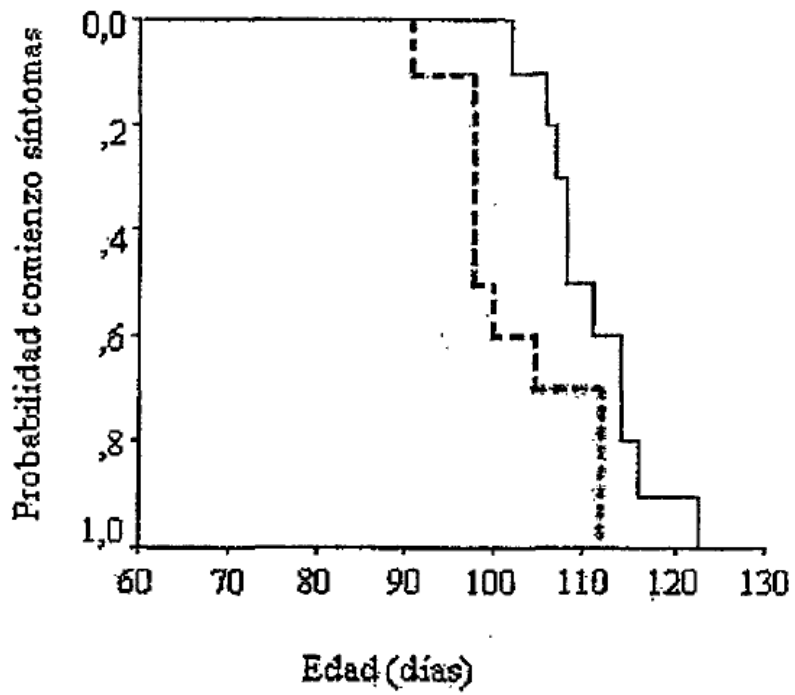


FIG. 2.

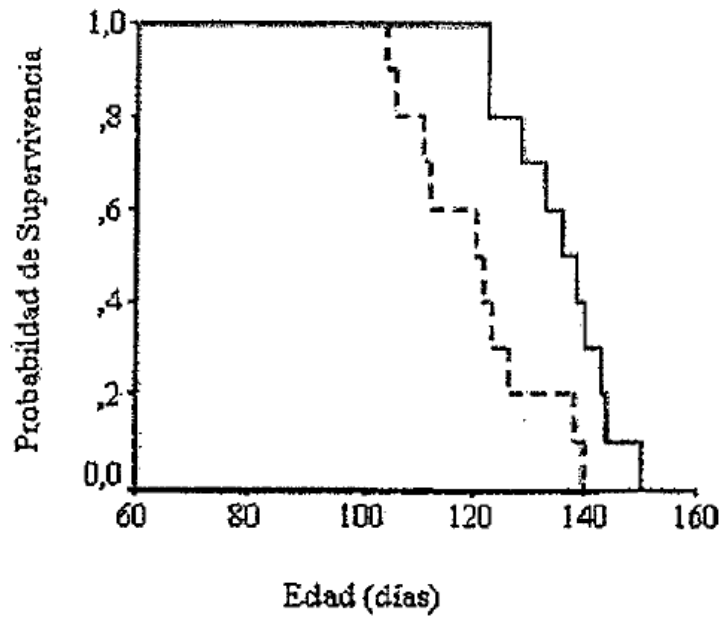


FIG. 3.

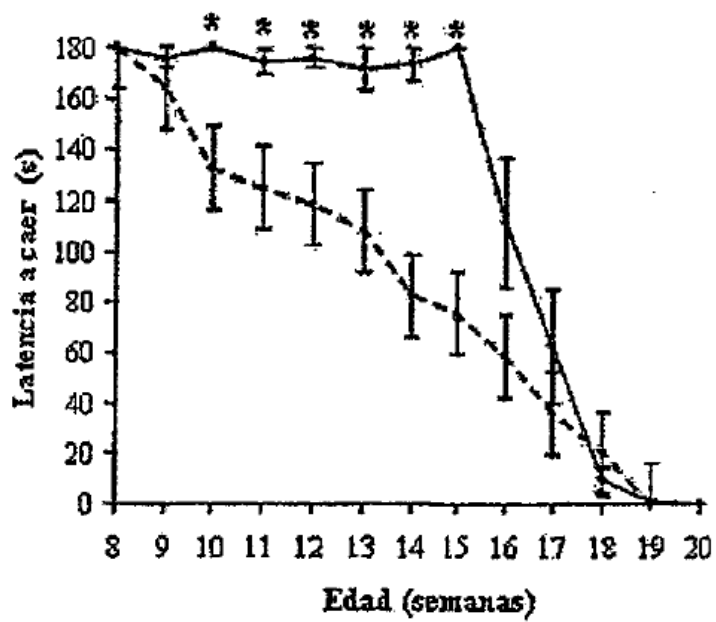


FIG. 4.

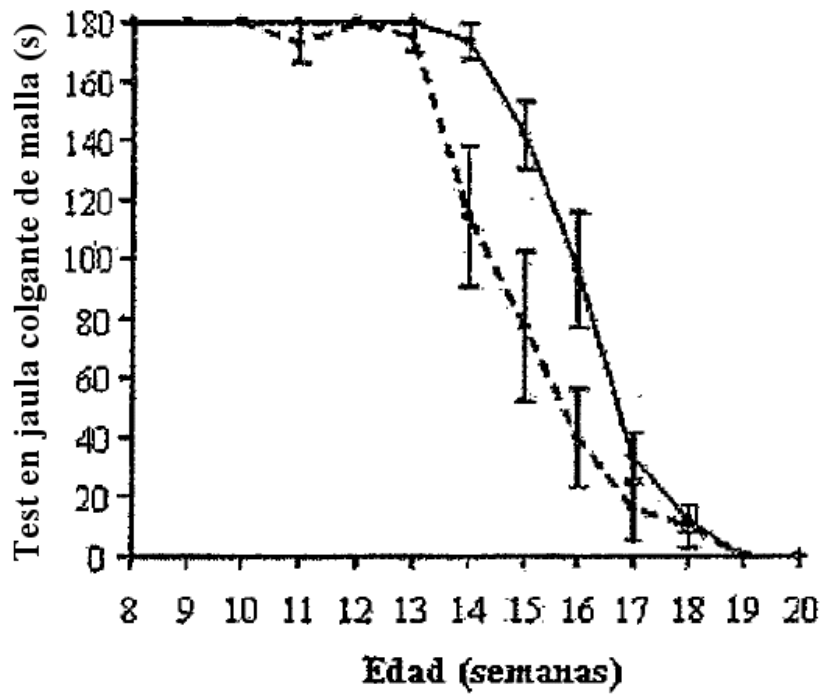


FIG. 5.

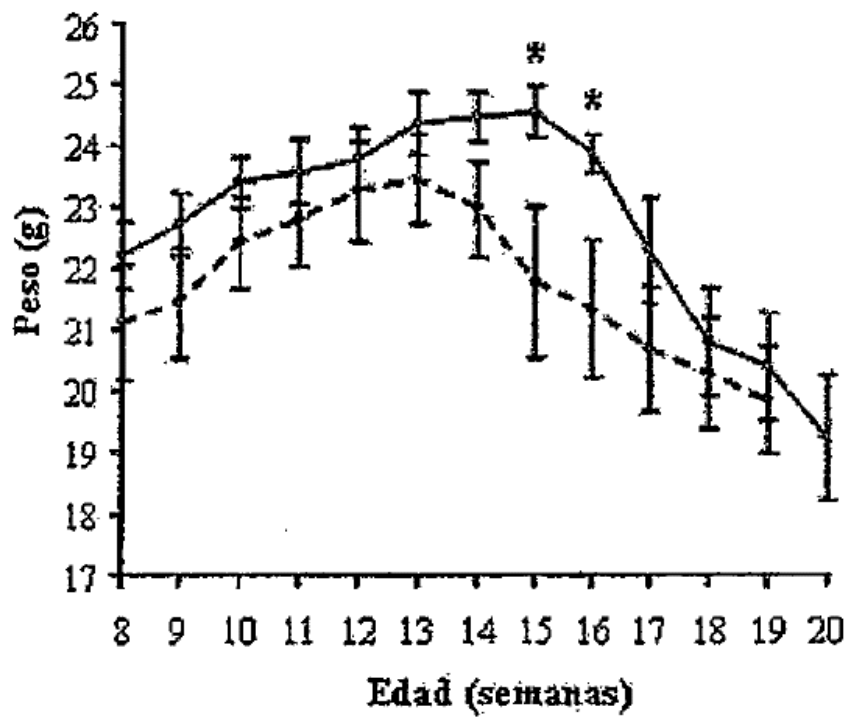


FIG. 6.

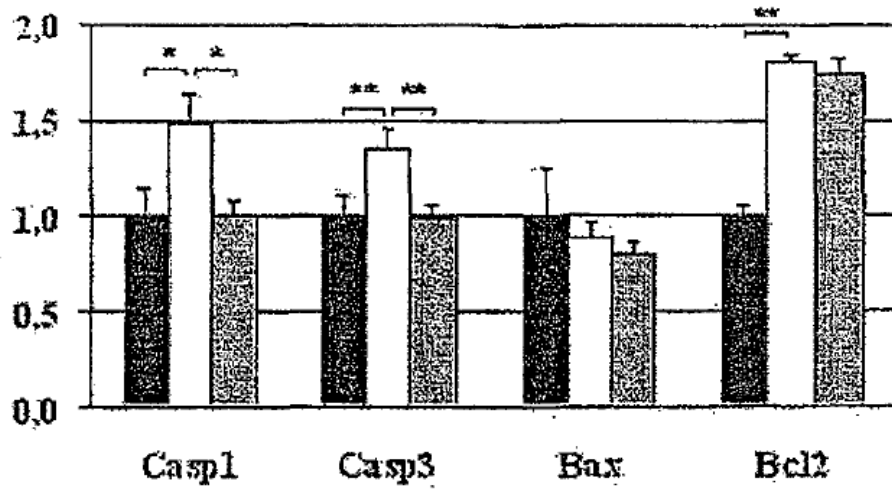


FIG. 7

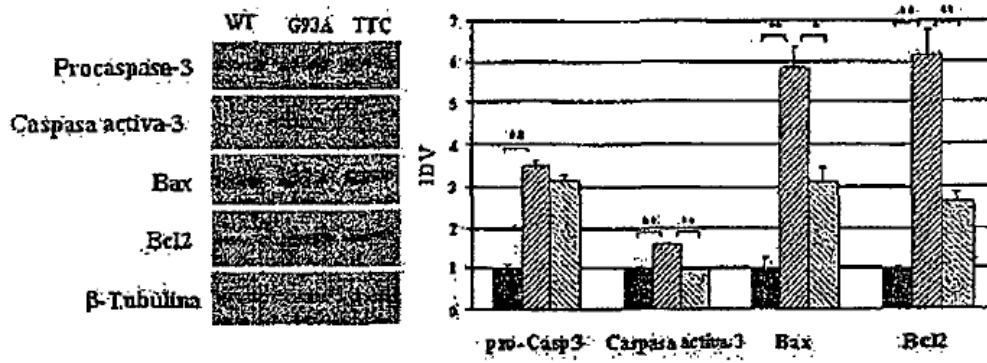


FIG. 8

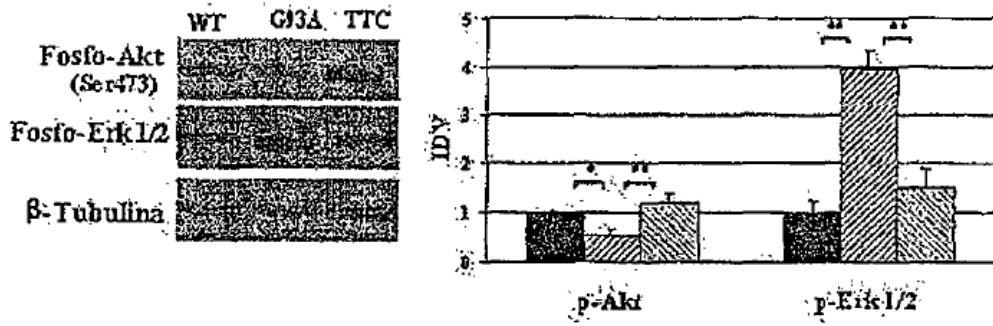


FIG. 9

Funciones de supervivencia

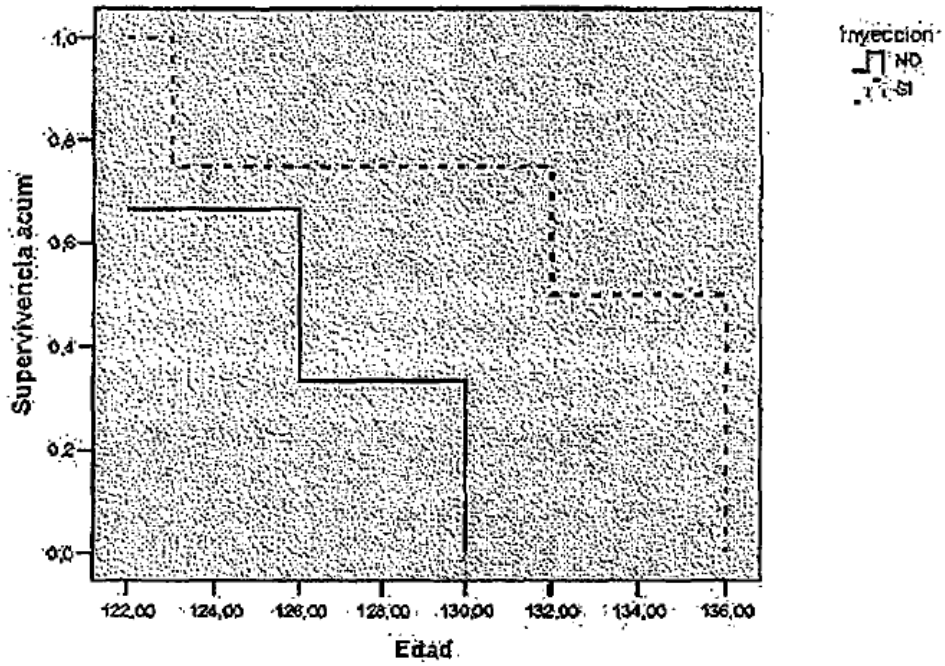


FIG. 10

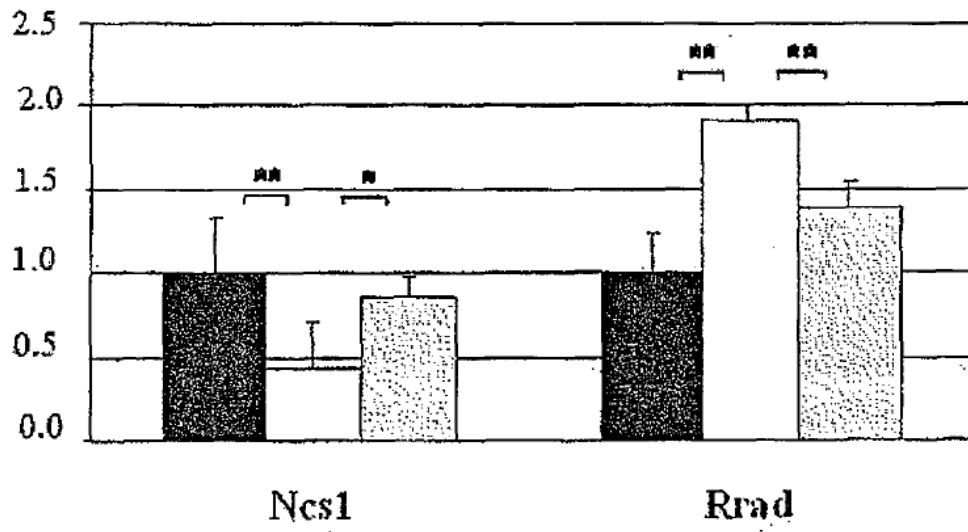


FIG. 11