

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 885**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2007 PCT/US2007/013391**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2007 WO07146046**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2007 E 07795835 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2029742**

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

30 Prioridad:

07.06.2006 US 811419 P

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

12.01.2017

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
500 KENDALL STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**DODGE, JAMES;
SHIHABUDDIN, LAMYA y
O'RIORDAN, CATHERINE R.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 596 885 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 esclerosis lateral amiotrófica y otros trastornos de la médula espinal

5 La presente descripción se refiere a composiciones y métodos para tratar trastornos que afectan a la función motora del sujeto y, en particular, la función motora afectada por enfermedad o lesión al cerebro y/o médula espinal.

10 La terapia génica es una modalidad de tratamiento emergente para trastornos que afectan al sistema nervioso central (SNC). La terapia génica del SNC se ha visto facilitada por el desarrollo de vectores víricos capaces de infectar de forma eficaz las neuronas posmitóticas. El sistema nervioso central está compuesto por la médula espinal y el cerebro. La médula espinal conduce información sensorial desde el sistema nervioso periférico al cerebro y conduce información motora desde el cerebro a diversos efectores. Para una revisión de los vectores víricos para suministro génico al sistema nervioso central, véase Davidson *et al.* (2003) *Nature Rev.* 4:353-364.

15 Las vectores de virus adenoasociado (AAV) se consideran útiles para terapia génica del SNC porque tienen un perfil favorable de toxicidad e inmunogenicidad, son capaces de transducir células neuronales, y son capaces de mediar expresión a largo plazo en el SNC (Kaplitt *et al.* (1994) *Nat. Genet.* 8:148-154; Bartlett *et al.* (1998) *Hum. Gene Ther.* 9:1181-1186; y Passini *et al.* (2002) *J. Neurosci.* 22:6437-6446).

20 Una propiedad útil de los vectores AAV recae en la capacidad de algunos vectores AAV de experimentar transporte retrógrado y/o anterógrado en células neuronales. Las neuronas en una región cerebral están interconectadas por axones a regiones cerebrales distales proporcionando de ese modo un sistema de transporte para el suministro de vectores. Por ejemplo, puede administrarse un vector AAV a o cerca de los terminales axónicos de las neuronas. Las neuronas internalizan el vector AAV y lo transportan de un modo retrógrado a lo largo del axón hasta el cuerpo celular. Propiedades similares de los adenovirus HSV, y el virus de la pseudorrabia han demostrado suministrar genes a estructuras distales dentro del cerebro (Soudas *et al.* (2001) *FASEB J.* 15:2283-2285; Breakefield *et al.* (1991) *New Biol.* 3:203-218; y deFalco *et al.* (2001) *Science*, 291:2608-2613).

30 Varios grupos han informado de que la transducción del cerebro por AAV serotipo 2 (AAV2) está limitada al sitio de inyección intracraneal (Kaplitt *et al.* (1994) *Nat. Genet.* 8:148-154; Passini *et al.* (2002) *J. Neurosci.* 22:6437-6446; y Chamberlin *et al.* (1998) *Brain Res.* 793:169-175). Informes recientes sugieren que el transporte axonal retrógrado de vectores víricos neurotróficos también puede suceder en circuitos seleccionados del cerebro de ratas normales (Kaspar *et al.* (2002) *Mol. Ther.* 5:50-56 (AAV vector); Kasper *et al.* (2003) *Science* 301:839-842 (vector lentivírico) y Azzouz *et al.* (2004) *Nature* 429:413-417 (vector lentivírico)). Roaul *et al.* (2005) *Nat. Med.* 11(4):423-428 y Ralph *et al.* (2005) *Nat. Med.* 11(4):429-433 informan de que la inyección intramuscular de lentivirus que expresan ARN interferente de la superoxidodismutasa (SOD1) de Cu/Zn humana de silenciamiento retardaba la aparición de la enfermedad de esclerosis lateral amiotrófica (ALS) en un modelo de roedor terapéuticamente relevante de ALS.

40 Células transducidas por vectores AAV expresan un producto transgénico terapéutico, tal como una enzima o un factor neurotrófico, para mediar efectos beneficiosos de formar intracelular. Estas células también pueden secretar el producto transgénico terapéutico, que puede recogerse posteriormente por células distales donde puede mediar, sus efectos beneficiosos. Este proceso se ha descrito como corrección cruzada (Neufeld *et al.* (1970) *Science* 169:141-146).

45 Sin embargo, aún existe una necesidad de composiciones y métodos para tratar disfunciones de la médula espinal que provocan la pérdida de función motora en pacientes humanos. Esta invención satisface esta necesidad y proporciona también ventajas relacionadas.

50 La presente invención proporciona métodos y composiciones para suministrar un transgén a la médula espinal y/o la región del tronco cerebral de un sujeto por administración intraventricular de un vector vírico neurotrófico recombinante que contiene un transgén IGF-1. El suministro vírico puede ser en condiciones que favorecen la expresión del transgén en células endodermarias.

55 Esta descripción proporciona métodos y composiciones para suministrar un transgén a la médula espinal y/o la región del tronco cerebral de un sujeto por administración intraventricular de un vector vírico neurotrófico recombinante que comprende un transgén seleccionado del grupo que consiste en factor de crecimiento de insulina-1 (IGF-1), calbindina D28K, parvalbúmina, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2, CNTF (factor neurotrófico ciliar), sonic hedgehog (shh), eritropoyetina (EPO), lisilo oxidasa (LOX), progranulina, prolactina, grelina, neuroserpina, angiogenina, y lactógeno placentario. El suministro vírico puede ser en condiciones que favorecen la expresión del transgén en células endodermarias.

60 Esta descripción proporciona métodos y composiciones para suministrar un transgén a la médula espinal y/o la región del tronco cerebral de un sujeto por administración intraventricular (también conocida como intracerebroventricular o ICV) de un vector vírico neurotrófico recombinante que comprende al menos dos transgenes seleccionados del grupo que consiste en factor de crecimiento de insulina-1 (IGF-1), calbindina D28K, parvalbúmina, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2, CNTF (factor neurotrófico ciliar), sonic hedgehog (shh),

eritropoyetina (EPO), lisilo oxidasa (LOX), progranulina, prolactina, grelina, neuroserpina, angiogenina, y lactógeno placentario. En una realización, un vector vírico adenoasociado recombinante comprende IGF-1 y VEGF. El suministro vírico puede ser en condiciones que favorecen la expresión del transgén en células endoteliales. Las Tablas 1-3 proporcionan combinaciones potenciales de pares transgénicos útiles en la presente invención.

En un aspecto adicional, la descripción proporciona composiciones y un método para mejorar los síntomas de un trastorno de neuronas motoras en un sujeto administrando un vector vírico neurotrófico recombinante que contiene el transgén terapéutico al cerebro del sujeto y en condiciones que favorecen la expresión del transgén en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son ejemplares y explicativas solamente y no son restrictivas de la invención reivindicada.

La **Figura 1** muestra curvas de supervivencia de Kaplan-Meier que comparan la administración intraventricular de AAV4 que codifica beta-galactosidasa con AAV4 que codifica IGF-1. Se observó una diferencia significativa en la supervivencia. Los receptores eran ratones SOD.

La **Figura 2** muestra una comparación de la resistencia de las extremidades anteriores entre ratones SOD que recibieron administración intraventricular de AAV4 que codifica beta-galactosidasa (Lac Z) frente a AAV4 que codifica IGF-1. Los receptores IGF-1 perdieron resistencia de forma más gradual y más lentamente.

La **Figura 3** muestra una comparación de la resistencia de las extremidades posteriores entre ratones SOD que recibieron administración intraventricular de AAV4 que codifica beta-galactosidasa (Lac Z) frente a AAV4 que codifica IGF-1. Los receptores de IGF-1 perdieron resistencia de forma más gradual y posteriormente.

La **Figura 4** muestra una comparación de rotarod (retardo en caer) entre ratones SOD que recibieron la administración intraventricular de AAV4 que codifica beta-galactosidasa (Lac Z) frente a AAV4 que codifica IGF-1. Los receptores de IGF-1 disminuyeron de forma más gradual y posteriormente.

La **Figura 5** muestra una comparación de la pérdida de masa corporal entre ratones SOD que recibieron administración intraventricular de AAV4 que codifica beta-galactosidasa (Lac Z) frente a AAV4 que codifica IGF-1. Los receptores de IGF-1 pierden masa corporal de forma más gradual y posteriormente.

La **Figura 6** muestra una comparación de tinción GFAP en el tronco cerebral de ratones SOD que recibieron administración intraventricular de AAV4 que codifica beta-galactosidasa (Bgal) frente a AAV4 que codifica IGF-1. Como se evidenció por la reducida tinción GFAP en los ratones tratados con AAV4-IGF-1, el suministro intraventricular de AAV4-IGF-1 condujo a una reducción en la astrogliosis dentro del tronco cerebral.

La **Figura 7** muestra una comparación de la tinción GFAP en la médula espinal ventral de ratones SOD que recibieron administración intraventricular de AAV4 que codifica beta-galactosidasa (Bgal) frente a AAV4 que codifica IGF-1. Como se evidenció por la reducida tinción GFAP en los ratones tratados con AAV4-IGF-1, el suministro intraventricular de AAV4-IGF-1 condujo a una reducción en la astrogliosis en la médula espinal ventral.

La **Figura 8** muestra una comparación de los niveles de nitrotirosina en ratones SOD que recibieron administración intraventricular de AAV4 que codifica beta-galactosidasa (Bgal) frente a AAV4 que codifica IGF-1. Como se evidenció por la tinción reducida en los ratones tratados con AAV4-IGF-1 el suministro intraventricular de AAV4-IGF-1 condujo a una reducción en los niveles de nitrotirosina en toda la médula espinal, por ejemplo, las regiones cervical, torácica, lumbar y sacra.

La **Figura 9** muestra la expresión de proteína fluorescente verde (GFP) en ratones tratados con AAV4-GFP. GFP se distribuye en la capa celular endotelial del sistema ventricular después del suministro intraventricular de AAV4-GFP.

La **Figura 10** muestra la expresión de proteína fluorescente verde (GFP) en ratones tratados con AAV4-GFP. GFP se distribuye en la capa celular endotelial del canal central de la médula espinal después de suministro intraventricular de AAV4-GFP.

La **Figura 11A** muestra los resultados de RT-PCR realizada sobre tejidos de ratones SOD que se trataron por inyección intraventricular de AAV4-IGF-1. Se midió de B-actina como un control interno. El vector se detectó en toda la corteza, tronco cerebral y médula espinal después de suministro intraventricular. La **Figura 11B** muestra los resultados de RT-PCR realizada en tejidos de ratones SOD que se trataron por inyección intraventricular de AAV4-VEGF. Se midió la B-actina como control interno. Se detectó el vector en toda la corteza, tronco cerebral y médula espinal después de suministro intraventricular de AAV4-VEGF.

La **Figura 12** muestra curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones SOD-1 que recibieron administración intraventricular de AAV4 que codifica proteína fluorescente verde (GFP) o AAV4 que codifica VEGF165. Se observó

un aumento significativo en la supervivencia media en ratones que recibieron AAV4-VEGF.

La **Figura 13** muestra una comparación de rotarod (retardo en caer) entre ratones SOD que recibieron administración intraventricular de AAV4 que codifica GFP frente a AAV4 que codifica VEGF165. Los receptores de VEGF165 disminuyeron de forma más gradual y posteriormente. La Figura 13 también muestra una comparación de la resistencia de las extremidades posteriores entre ratones SOD que recibieron administración intraventricular de AAV4 que codifica GFP frente a AAV4 que codifica VEGF165. Los receptores de VEGF165 perdieron resistencia de forma más gradual y posteriormente.

Las Tablas 1-3 proporcionan varios pares génicos potenciales para su uso en la presente descripción donde la realización utiliza más de un gen.

La presente invención es como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Para que a presente invención pueda entenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Se exponen definiciones adicionales durante toda la descripción detallada.

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están dentro de las habilidades de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2ª edición (1989); *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (F. M. Ausubel, *et al.* 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)).

Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares "uno" "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.

Como se usa en este documento, la expresión "que comprende" pretende indicar que las composiciones y métodos incluyen los elementos recitados, pero sin excluir otros. "Que consiste esencialmente en" cuando se usa para definir composiciones y métodos, indicará que excluye otros elementos de cualquier importancia esencial para la combinación. Por tanto, una composición que consiste esencialmente de los elementos definidos en este documento no excluiría contaminantes traza a partir del método de aislamiento y purificación y vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes y similares. "Que consiste en" indicará que excluye más que los elementos traza de otros ingredientes y etapas sustanciales del método para administrar las composiciones de esta invención. Las realizaciones definidas por cada uno de esos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

Todas las indicaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluyendo intervalos, son aproximaciones que están variadas (+) o (-) por incrementos de 0,1. Debe entenderse, aunque no siempre se indique de forma explícita, que todas las indicaciones numéricas están precedidas por el término "aproximadamente". También debe entenderse, aunque no siempre se indique de forma explícita, que los reactivos descritos en este documento son simplemente ejemplares y que son conocidos equivalentes de los mismos en la técnica.

El término "transgén" se refiere a un polinucleótido que se introduce en una célula y es capaz de transcribirse en ARN y, opcionalmente traducirse y/o expresarse en condiciones apropiadas. En un aspecto, confiere una propiedad deseada a una célula en que se introdujo, o conduce de otro modo a un resultado terapéutico o de diagnóstico deseado.

Las expresiones "partículas genómicas (gp)" o "equivalentes genómicos" o "copias genómicas" (gc) como se usan en referencia a un título de virus, se refieren a la cantidad de viriones que contienen el genoma de ADN de AAV recombinante, independientemente de la infectividad o funcionalidad. La cantidad de partículas genómicas en una preparación de vector particular puede medirse por procedimientos tales como los descritos en los ejemplos en este documento o, por ejemplo, en Clark *et al.* (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk *et al.* (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278.

Las expresiones "unidad de infección (iu)", "partícula infecciosa" o "unidad de replicación", como se usan en referencia a un título de virus, se refieren a la cantidad de partículas infecciosas y competentes en la replicación de vector AAV recombinante medidas por el ensayo de centro infeccioso, también conocido como ensayo de centro de replicación, como se describe, por ejemplo, en McLaughlin *et al.* (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973.

La expresión "unidad de transducción (tu)", como se usa en referencia a un título de virus, se refiere a la cantidad de partículas infecciosas de vector AAV recombinante que provocan la producción de un producto transgénico funcional medido en ensayos funcionales tales como los descritos en los Ejemplos de este documento, o por ejemplo, en Xiao

et al. (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124; o en Fisher *et al.* (1996) *J. Virol.*, 70:520-532 (ensayo LFU).

Las expresiones "terapéutico", "cantidad terapéuticamente eficaz" y sus afines se refieren a esa cantidad de un ARN, ADN o producto de expresión de ADN y/o ARN que provoca la prevención o retardo del inicio o mejora de los síntomas en un sujeto o la obtención de un resultado biológico deseado, tal como la corrección de la neuropatología, por ejemplo, patología celular asociada con una enfermedad neuronal motora tal como ALS. La expresión "corrección terapéutica" se refiere a ese grado de corrección que provoca la prevención o retardo del inicio o mejora de los síntomas en un sujeto. La cantidad eficaz puede determinarse por métodos empíricos conocidos.

Una "composición" también pretender abarcar una combinación de agente activo y otro vehículo, por ejemplo, compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o marcador detectable) o activo, tal como un adyuvante, diluyente, aglutinante, estabilizante, tampones, sales, disolventes lipófilos, conservante, adyuvante o similares. Los vehículos también incluyen excipientes y aditivos farmacéuticos, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos y carbohidratos (por ejemplo, azúcares, incluyendo monosacáridos, di, tri, tetra y oligosacáridos; azúcares derivatizados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcar), que pueden estar presentes individualmente o en combinación, que comprenden en solitario o en combinación del 1-99,99% en peso o volumen. Excipientes proteicos ejemplares incluyen albúmina sérica tal como albúmina sérica humana (HSA), albúmina humana recombinante (rHSA), gelatina, caseína y similares. Componentes representativos de aminoácido/anticuerpo, que también pueden funcionar en una capacidad tamponante, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo y similares. Los excipientes de carbohidrato también están pretendidos dentro del alcance de esta invención, cuyos ejemplos incluyen, aunque sin limitación, 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.

El termino vehículo incluye adicionalmente un tampón o un agente de ajuste del pH; típicamente, el tampón es una sal preparada a partir de un ácido o base orgánico. Tampones representativos incluyen sales de ácido orgánico tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; Tris, clorhidrato de trometamina o tampones fosfato. Vehículos adicionales incluyen excipientes/aditivos poliméricos tales como polivinilpirrolidonas, ficoll (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil-.cuadratura-.ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes aromatizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, 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).

Como se usa en este documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" abarca cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y diversos tipos de agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes y cualquiera de los vehículos indicados anteriormente con la condición adicional de que sean aceptables para su uso *in vivo*. Para ejemplos de vehículos, estabilizantes y adyuvantes, véase Martin REMINGTON'S PHARM. SCI., 15ª Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) y Williams y Williams, (1995), y en la "PHYSICIAN'S DESK REFERENCE", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998). Los vehículos también pueden comprender líquido cefalorraquídeo artificial (LCFa).

Un "sujeto", "individuo" o "paciente" se usa de forma intercambiable en este documento, que se refiere a un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, aunque sin limitación, murinos, ratas, simios, seres humanos, animales de granja, animales deportivos y mascotas.

Un "control" es un sujeto o muestra alternativa, usado en un experimento con fines de comparación. Un control puede ser "positivo" o "negativo". Por ejemplo, cuando el propósito del experimento es determinar una correlación de un nivel de expresión alterado de un gen con un tipo particular de patología (véase, ALS, por ejemplo, infra), generalmente es preferible usar un control positivo (un sujeto o una muestra de un sujeto, que porta dicha alteración y que 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 síntoma clínico de esa enfermedad).

"Expresado de forma diferencial" aplicado a un gen, se refiere a la producción diferencial del ARNm transcrito a partir del gen o el producto proteico codificado por el gen. Un gen expresado de forma diferencial puede estar sobreexpresado o subexpresado en comparación con el nivel de expresión de una célula normal o de control. En un aspecto, se refiere a un diferencial que es al menos 1,5 veces o al menos 2,5 veces, o como alternativa al menos 5 veces, o como alternativa al menos 10 veces mayor o inferior que el nivel de expresión detectado en una muestra de control. La expresión "expresado de forma diferencial" también se refiere a secuencias de nucleótidos en una célula o tejido que se expresan cuando están silenciosas en una célula de control o no se expresan cuando se expresan en una célula de control.

Como se usa en este documento, el término "modular" significa variar la cantidad o intensidad de un efecto o resultado, por ejemplo, potenciar, aumentar, disminuir o reducir.

5 Como se usa en este documento, el término "mejorar" es sinónimo de "aliviar" y significa reducir o mitigar. Por ejemplo, uno puede mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno haciéndolos más soportables.

10 Para la identificación de estructuras en el cerebro humano, véase, por ejemplo, *The Human Brain: Surface, Three-Dimensional Sectional Anatomy With MRI, and Blood Supply*, 2ª ed., eds. Deuteron *et al.*, Springer Vela, 1999; *Atlas of the Human Brain*, eds. Mai *et al.*, Academic Press; 1997; y *Co-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging*, eds. Tamarack *et al.*, Thyme Medical Pub., 1988. Para la identificación de estructuras en el cerebro de ratón, véase, por ejemplo, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2ª ed., Academic Press, 2000.

15 El suministro intracerebroventricular o intraventricular de un vector vírico recombinante puede realizarse en cualquiera o más de los ventrículos cerebrales, que están rellenos con líquido cefalorraquídeo (LCF). El LCF es un fluido transparente que llena los ventrículos, está presente en el espacio subaracnoideo, y rodea el cerebro y la médula espinal. El LCF se produce por los plexos coroideos y mediante el lagrimeo o transmisión de fluido tisular por el cerebro a los ventrículos. El plexo coroideo es una estructura que reviste el suelo del ventrículo lateral y el techo del tercer y cuarto ventrículo. Ciertos estudios han indicado que estas estructuras son capaces de producir 400-600 ccs de fluido por día coherente con una cantidad para rellenar los espacios del sistema nervioso central cuatro veces al día. En adultos, el volumen de este fluido se ha calculado que es de 125 a 150 ml (4-5 onzas). El LCF está en formación, circulación y absorción continua. Ciertos estudios han indicado que pueden producirse aproximadamente 430 a 450 ml (casi 2 copas) de LCF cada día. Ciertos cálculos estiman que la producción iguala aproximadamente 0,35 ml por minuto en adultos y 0,15 por minuto en bebés. Los plexos coroideos de los ventrículos laterales producen la mayoría del LCF. Fluye a través de la foramina de Monro al tercer ventrículo donde se añade por producción a partir del tercer ventrículo y continúa a través del acueducto de Silvio hasta el cuarto ventrículo. El cuarto ventrículo añade más LCF; el fluido entonces viaja al espacio subaracnoideo a través de la foramina de Magendie y Luschka. Después circula por toda la base del cerebro, alrededor de la médula espinal y de forma ascendente sobre los hemisferios cerebrales. El LCF se vacía en la sangre mediante las vellosidades aracnoideas y los senos vasculares intracraneales.

35 En aspectos donde la transferencia génica está mediada por un vector vírico de ADN, tal como un adenovirus (Ad) o virus adenoasociado (AAV), una construcción de vector se refiere al polinucleótido que comprende el genoma vírico o parte del mismo, y un transgén. Los adenovirus (Ad) son un grupo homogéneo relativamente bien caracterizado de virus, incluyendo más de 50 serotipos. Véase, por ejemplo, la solicitud PCT Internacional n.º WO 95/27071. Los Ad son fáciles de cultivar y no requieren integración en el genoma de la célula hospedadora. Se han construido vectores derivados de Ad recombinante, particularmente aquellos que reducen el potencial de recombinación y generación de virus de tipo silvestre. Véanse, las solicitudes PCT Internacionales n.º WO 95/00655 y WO 95/11984. AAV de tipo silvestre tiene alta infectividad y especificidad de integración en el genoma de célula hospedadora. Véase, Hermonat y Muzyczka (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470 y Lebkowski, et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:3988-3996.

45 En un aspecto, la descripción proporciona un método para suministrar un transgén al cerebro de un sujeto por administración intraventricular de un vector vírico neurotrófico recombinante que contiene el transgén de IGF-1. El suministro es en condiciones que favorecen la expresión del transgén en células endimarias.

50 En otro aspecto, la descripción proporciona un método de suministro de un producto transgénico terapéutico a una célula diana del SNC, que es una neurona o célula de la glía, en un mamífero afectado con un trastorno neuronal motor, por ejemplo, ALS o lesión traumática de la médula espinal, donde el transgén puede ser IGF-1. El transgén puede administrarse mediante un virus neurotrófico. El virus puede administrarse mediante los ventrículos. Las células endimarias pueden transducirse para expresar el transgén y secretar el producto proteico codificado.

55 En un caso alternativo, la descripción proporciona un método para tratar un trastorno de neuronas motoras en un sujeto por administración intraventricular de un vector vírico neurotrófico recombinante que contiene un transgén terapéutico al cerebro del sujeto, donde el transgén se expresa en una cantidad terapéuticamente eficaz en el sujeto.

La descripción también proporciona un método para mejorar los síntomas de un trastorno de neuronas motoras en un sujeto por administración intraventricular de un vector vírico neurotrófico recombinante que contiene un transgén terapéutico al cerebro, donde dicho transgén se expresa en una cantidad terapéuticamente eficaz en el sujeto.

60 Los vectores víricos neurotróficos adecuados para la práctica de esta descripción incluyen, aunque sin limitación, los vectores de virus adenoasociado (AAV), vectores de virus del herpes simple (patente de Estados Unidos n.º 5.672.344) y vectores lentivíricos.

65 En la práctica de la invención, puede usarse AAV de cualquier serotipo. El serotipo del vector vírico usado en ciertas realizaciones de la invención se selecciona del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 y AAV8 (véase, por ejemplo, Gao et al. (2002) *PNAS*, 99:11854-11859; y *Viral Vectors for Gene Therapy*:

Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003). Puede usarse otro serotipo además de los enumerados en este documento. Además, también pueden utilizarse vectores AAV pseudotipados en los métodos descritos en este documento. Los vectores AAV pseudotipados son aquellos que contienen el genoma de un serotipo AAV en la cápsida de un segundo serotipo AAV; por ejemplo, un vector AAV que contiene la cápsida AAV2 y el genoma AAV1 o un vector AAV que contiene la cápsida AAV5 y el genoma AAV2 (Auricchio et al., (2001) Hum. Mol. Genet., 10(26):3075-81).

Los vectores AAV se obtiene de parvovirus de ADN monocatenario (mc) que son no patogénicos para los mamíferos (revisado en Muzyska (1992) Curr. Top. Microb. Immunol., 158:97-129). En resumen, los vectores basados en AAV recombinante tienen los genes víricos *rep* y *cap* que representan el 96% del genoma vírico retirado, conduciendo a dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de 145 pares de bases (pb) flanqueantes, que se usan para iniciar la replicación del ADN vírico, el empaquetado y la integración. En ausencia de virus auxiliar, AAV de tipo silvestre se integra en el genoma de la célula hospedadora humana con especificidad de sitio preferente en el cromosoma 19q 13.3 o puede mantenerse de forma episómica. Una única partícula AAV puede acomodar hasta 5 kb de ADNmc, conduciendo por lo tanto a aproximadamente 4,5 kb para un transgén y elementos reguladores, que es típicamente suficiente. Sin embargo, los sistemas de corte y empalme en trans como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 6.544.785, casi pueden duplicar este límite.

En una realización ilustrativa, AAV es AAV4. Se ha estudiado extensivamente el virus adenoasociado de muchos serotipos, especialmente AAV2, y se ha caracterizado como vectores de terapia génica. Los expertos en la materia estarán familiarizados con la preparación de vectores de terapia génica basados en AAV funcionales. Pueden encontrarse numerosas referencias a diversos métodos de producción, purificación y preparación de AAV para su administración a sujetos humanos en el extenso contenido temático de la bibliografía publicada (véase, por ejemplo, Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003). Adicionalmente, la terapia génica basada en AAV dirigida a células del SNC se ha descrito en las patentes de Estados Unidos n.º 6.180.613 y 6.503.888. Los vectores AAV ejemplares adicionales son vectores de serotipo AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/7 y AAV2/8 recombinantes que codifican proteína humana.

En ciertas realizaciones de la invención, el vector comprende un transgén unido de forma funcional a un promotor. El transgén codifica una molécula biológicamente activa, cuya expresión en el SNC provoca la corrección al menos parcial de la neuropatología y/o la estabilización de la progresión de la enfermedad. El transgén de acuerdo con la presente descripción puede ser el factor de crecimiento de insulina-1 (IGF-1), calbindina D28, parvalbúmina, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2, CNTF (factor neurotrófico Ciliar), sonic hedgehog (shh), eritropoyetina (EPO), lisilo oxidasa (LOX), progranulina, prolactina, grelina, neuroserpina, angiogenina, y lactógeno placentario. El transgén para su uso en la presente invención es SMN-1.

En ciertas realizaciones de la invención, el vector comprende más de un transgén, donde cada transgén está unido de forma funcional a un promotor para posibilitar la expresión de más de un transgén a partir de un único vector AAV. En realizaciones adicionales, los transgenes pueden estar unidos de forma funcional al mismo promotor. Cada transgén codifica una molécula biológicamente activa, cuya expresión en el SNC provoca la corrección al menos parcial de la neuropatología. Adicionalmente, en casos donde se suministra más de un transgén, los transgenes pueden suministrarse mediante más de un vector AAV, donde cada vector AAV comprende un transgén unido de forma funcional a un promotor. Dichos transgenes adicionales pueden seleccionarse del grupo que consiste en: factor de crecimiento de insulina-1 (IGF-1), calbindina D28, parvalbúmina, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-2, CNTF (factor neurotrófico Ciliar), sonic hedgehog (shh), eritropoyetina (EPO), lisilo oxidasa (LOX), progranulina, prolactina, grelina, neuroserpina, y lactógeno placentario. Por ejemplo, los transgenes pueden comprender VEGF, tal como VEGF165, e IGF-1.

El gen del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-1) tiene una estructura compleja, que es bien conocida en la técnica. Tiene al menos dos productos de ARNm con corte y empalme alternativo que surgen del transcrito génico. Hay un péptido de 153 aminoácidos, conocido por varios nombres incluyendo IGF-1A o IGF-1Ea, y un péptido de 195 aminoácidos, conocido por varios nombres incluyendo IGF-1B o IGF-1Eb. La forma Eb también puede conocerse como Ec en seres humanos. La forma madura de IGF-1 es un polipéptido de 70 aminoácidos. Tanto IGF-1Ea como IGF-1Eb contienen el péptido maduro de 70 aminoácidos, pero difieren en la secuencia y longitud de sus extensiones carboxilo terminales. Las secuencias peptídicas de IGF-1Ea e IGF-1Eb están representadas por la SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Los ADNc genómicos y funcionales de IGF-1 humana, así como información adicional respecto al gen de IGF-1 y sus productos, están disponibles en el n.º de acceso Unigene NM_00618. La proteína IGF-1 puede tener la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3 o variantes alélicas de la misma. Las variantes alélicas pueden diferir en un único resto de aminoácido o una cantidad pequeña de resto de aminoácidos, típicamente menos de 5, menos de 4, menos de 3 restos. La secuencia proteica de IGF-1 puede modificarse para que contenga el dominio de transducción TAT (YGRKKRRQRRR) como se muestra en la SEQ ID NO: 4.

Aunque sus funciones no son completamente conocidas, la calbindina D28K (también mencionada como calbindina D28) y la parvalbúmina son proteínas de unión a calcio que según la teoría están implicadas en el tamponamiento de calcio. Sin limitarse a teoría alguna, existen evidencias que sugieren que la homeostasis del calcio está alterada en sujetos con ALS. Existen evidencias que sugieren que bajos niveles de calbindina D28K y/o parvalbúmina

pueden aumentar la vulnerabilidad de las neuronas motoras en ALS reduciendo su capacidad de manejar una carga aumentada de calcio. Esta reducción puede conducir a lesión celular y eventual muerte de neuronas motoras. Evidencias adicionales sugieren que neuronas ricas en proteínas de unión a calcio, tales como calbindina D28K y parvalbúmina, son resistentes a degeneración.

5 HIF-1 es una proteína heterodimérica compuesta por dos subunidades: (i) una subunidad beta (β) expresada de forma constitutiva también conocida como translocador nuclear de hidrocarburo arilo (ARNT) (que está compartida por otros factores de transcripción relacionados (por ejemplo, el receptor de dioxina/hidrocarburo arilo (DR/AhR)); y
 10 (ii) una subunidad alfa (α) (véase, por ejemplo, el documento WO 96/39426, solicitud Internacional n.º PCT/US96/10251 que describe la reciente purificación por afinidad y clonación molecular de HIF-1 α) cuya acumulación está regulada por un mecanismo post-traducciona de modo que niveles altos de la subunidad alfa pueden detectarse solamente durante condiciones hipóxicas. Ambas subunidades son miembros de la familia de factores de transcripción de hélice-bucle-hélice básica (bHLH)-PAS. Estos dominios regulan la unión y dimerización del ADN. El dominio de transactivación reside en el extremo C-terminal de la proteína. La región básica consiste en aproximadamente 15 aminoácidos predominantemente básicos responsables de la unión directa del ADN. Esta
 15 región es adyacente a dos hélices α anfipáticas, separadas por un bucle de longitud variable, que forma la superficie de contacto de dimerización principal entre miembros de la familia (Moore, A.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:10436-41 (2000)). El dominio PAS, que se nombró después de las tres primeras proteínas en que se identificó (Per, ARNT y Sim), abarca 200-300 aminoácidos que contienen dos regiones en gran medida hidrófobas poco conservadas de aproximadamente 50 aminoácidos, denominadas PAS A y PAS B. La subunidad HIF-1 α es inestable durante condiciones normóxicas, la sobreexpresión de esta subunidad en células cultivadas en niveles normales de oxígeno es capaz de inducir la expresión de genes inducidos normalmente por hipoxia. Una estrategia alternativa sería modificar la subunidad HIF-1 α de modo que ya no se desestabilice por condiciones normóxicas y, por lo tanto, sería más potente en un intervalo de condiciones de oxígeno. El remplazo de la región C-terminal (o de transactivación) de la proteína de factor inducible por hipoxia con un fuerte dominio de transactivación de una proteína activadora de la transcripción tal como, por ejemplo, VP16 del virus del herpes simple (HSV), NF κ B o factores de transcripción de levadura GAL4 y GCN4, está diseñado para estabilizar la proteína en condiciones normóxicas y proporcionar activación transcripcional fuerte y constitutiva. Para estabilizar la proteína del factor inducible por hipoxia en condiciones normóxicas y para proporcionar activación transcripcional fuerte y constitutiva, se construyó una proteína de fusión híbrida/quimérica que consistía en los dominios de unión y dimerización de ADN de HIF-1 α y el dominio de transactivación de la proteína VP16 del virus del herpes simple (HSV). La administración de este híbrido/quimera a las células de un sujeto mediante terapia génica induce la expresión de genes normalmente regulados positivamente en respuesta a hipoxia (por ejemplo, VEGF y similares). Una HIF-1 α híbrida constitutivamente estable ha demostrado ser eficaz para tratar a pacientes isquémicos (patentes de Estados Unidos 6.432.927 y 7.053.062, ambas cuales se incorporan por referencia en este documento en su totalidad).

Los miembros de la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) están entre los moduladores más potentes de la biología vascular. Regulan la vasculogénesis, la angiogénesis y el mantenimiento vascular. VEGF165 es uno de estos miembros de la familia de VEGF que pueden usarse en la presente descripción.

40 La base molecular de la atrofia muscular espinal (SMA), un trastorno neuromuscular recesivo autosómico, es la pérdida homocigótica del gen de neuronas motoras de supervivencia 1 (SMN1). Una copia casi idéntica del gen SMN1, llamado SMN2, modula la gravedad de la enfermedad. La diferencia funcional entre ambos genes es una mutación traduccionalmente silenciosa que, sin embargo, altera un potenciador de corte y empalme exónico que causa el salto del exón 7 en la mayoría de los transcritos de SMN2. Solamente el 10% de los transcritos de SMN2 codifican proteína de longitud completa funcional idéntica a SMN1. La proteína SMN1 desempeña un papel bien establecido en el ensamblaje del espliceosoma y también puede mediar el tráfico de ARNm en el axón y el extremo nervioso de las neuronas.

50 El CNTF (factor neurotrófico ciliar) es una neurocitoquina expresada por células de la glía en nervios periféricos y el sistema nervioso central. El CNTF está reconocido generalmente por su función en el soporte y supervivencia de tipos celulares no neuronales y neuronales. Véase, por ejemplo, Vergara, C y Ramirez, B; Brain Res, Brain Res. Rev. 2004; 47:161-73.

55 Sonic hedgehog (Shh) controla importantes procesos del desarrollo, incluyendo supervivencia de células neuronales y de la glía.

La eritropoyetina (EPO) es un regulador principal de células progenitoras eritroides. Sin embargo, se expresa de forma funcional en el sistema nervioso y se ha informado que tiene efectos neuroprotectores. Véase, por ejemplo, Bartesaghi, S., 2005. Neurotoxicology, 26:923-8.

60 La lisilo oxidasa (LOX) oxida la cadena lateral del peptidilo lisina convirtiendo de ese modo ciertos restos de lisina en alfa-aminoadipico-delta-semialdehído. Este es un cambio post-traducciona que, por ejemplo, posibilita la unión cruzada covalente de las cadenas componentes de colágeno y elastina. Estabiliza los depósitos fibrosos de estas proteínas en la matriz extracelular. LOX también puede oxidar la lisina dentro de una diversidad de proteínas catiónicas, lo que sugiere que sus funciones son más amplias que la estabilización o la matriz extracelular. LOX se

sintetiza como una preproteína; surge de la célula como proLOX y se procesa proteolíticamente en la enzima activa. Véase, por ejemplo, Lucero, HA y Kagan, HM, *Cell Mol. Life Sci.* 2006; 63(19-20):2304-16.

La progranulina (PGRN) es una proteína pleiotrópica que ha obtenido la atención de la comunidad neurocientífica con los recientes descubrimientos de mutaciones en el gen que causan degeneración del lóbulo frontotemporal. PGRN en el sistema nervioso central se expresa por la microglía y las neuronas y desempeña un papel en el desarrollo cerebral. PGRN también está implicada en múltiples procesos de "modelado tisular" incluyendo el desarrollo, reparación de heridas y tumorigénesis. PGRN se convierte en granulina (GRN) por enzimas elastasa. Aunque la progranulina tiene propiedades tróficas, las GRN son más parecidas a mediadores inflamatorios. Estudios de expresión génica a partir de modelos animales de enfermedad del SNC muestran un aumento diferencial en PGRN en combinación con activación e inflamación de la microglía. Se sugiere que el aumento en la expresión de PGRN está muy relacionado con la activación y neuroinflamación de la microglía. Además, la expresión de PGRN está aumentada en microglía activada y en muchas enfermedades neurodegenerativas incluyendo enfermedad de neuronas motoras y enfermedad de Alzheimer. Los estudios han identificado mutaciones en PGRN como una causa de enfermedad neurodegenerativa e indican la importancia de la función de PGRN para la supervivencia neuronal.

Prolactina y lactógeno placentario: los oligodendrocitos, las células mielinizantes del SNC, siguen generándose por células precursoras de oligodendrocitos (OPC) en toda la edad adulta (Gensert y Goldman, 1997; Levison et al., 1999; Menn et al., 2006; Peters y Sethares, 2004) y son necesarias para la reparación intrínseca del daño a la mielina en el SNC adulto (Polito y Reynolds, 2005). Los eventos fisiológicos que modulan la proliferación de OPC y la generación de nuevos oligodendrocitos mielinizantes en el SNC adulto son conocidos en gran medida.

Recientemente se ha informado de que pacientes con esclerosis múltiple, una enfermedad desmielinizante, tienen una tasa de recidiva reducida durante el 3^{er} trimestre de embarazo, lo que sugiere que las hormonas influyen en la generación de oligodendrocitos (Confavreux et al., 1998; Voskuhl, 2003). La remisión en pacientes MS está correlacionada con una disminución en la cantidad y tamaño de lesiones de la materia blanca activa (van Walderveen et al 1994). De forma interesante, la preñez en ratones provoca un aumento en la generación de nuevos oligodendrocitos y la cantidad de axones mielinizados dentro del SNC materno (Gregg et al., 2007). La prolactina, una hormona que se estabiliza durante la fase final del embarazo, ha demostrado regular la proliferación de OPC durante el embarazo y promover la reparación de la materia blanca en ratones hembra vírgenes (Gregg et al., 2007).

Existe una razón para creer que el lactógeno placentario humano (hPL), una hormona que también tiene su máximo durante el 3^{er} trimestre de embarazo (Selenkow et al., 1969), puede tener una influencia similar sobre la generación de oligodendrocitos. hPL tiene varias actividades biológicas que son cualitativamente similares a la hormona humana del crecimiento (hGH) y la prolactina (Lesniak et al., 1977) y parece ser un regulador principal de la producción de IGF-1 (Handwerger et al., 1992; Zimkeller, 2000; Handwerger et al., 2000). Tanto hGH como IGF-1 han demostrado ser estimuladores de la mielinización en el SNC adulto (Carson et al., 1993; Peltwon et al., 1977). Por lo tanto, el tratamiento de enfermedades del SNC que implican desmielinización tales como MS, ALS, apoplejía y lesión de la médula espinal pueden beneficiarse de terapias basadas en PRL o hPL, por inyección intraventricular de un vector vírico que expresa rhPRL o hPL.

La grelina es una hormona gástrica que se reconoció en 1999 como mediador de la liberación de la hormona del crecimiento. Véase, por ejemplo, Wu, JT et al., 2004; *Ann. Surg.* 239:464.

La neuroserpina es un miembro de la familia de inhibidores de serpina proteasa. En ciertas condiciones del sistema nervioso central, la neuroserpina puede desempeñar un papel neuroprotector potencialmente a través del bloqueo de los efectos de tPA. Véase, por ejemplo, Galliciotti, G y Sonderegger, P, 2006, *Front Biosci* 11: 33; Simonin, Y et al., 2006, *J Neurosci*; 26:10614; Miranda, E y Lomas, DA, 2006, *Cell Mol Life Sci* 63:709.

La angiogenina es un miembro de la superfamilia de ARNasa. Es un constituyente normal de la circulación, pero también está implicada como un factor de riesgo en trastornos de neuronas motoras.

Sin limitarse a teoría alguna, IGF-1 es una proteína terapéutica para el tratamiento de ALS debido a sus muchas acciones a diferentes niveles de neuraxis (véase Dore et al., *Trends Neurosci*, 1997, 20:326-331). En el cerebro: se cree que reduce la apoptosis tanto neuronal como de la glía, protege a las neuronas contra la toxicidad inducida por hierro, colchicina, desestabilizantes del calcio, peróxidos y citoquinas. También se cree que modula la liberación de los neurotransmisores acetilcolina y glutamato. También se cree que induce la expresión de neurofilamentos, tubulina y la proteína básica de mielina. En la médula espinal: se cree que IGF-1 modula la actividad ChAT y atenúa la pérdida del fenotipo colinérgico, potencia el brote de neuronas motoras, aumenta la mielinización, inhibe la desmielinización, estimula la proliferación y diferenciación de neuronas motoras a partir de células precursoras y promueve la división, maduración y crecimiento de células de Schwann. En el músculo: se cree que IGF-1 induce la formación de grupos de receptores de acetilcolina en la unión neuromuscular y aumenta la función neuromuscular y la fuerza muscular.

El nivel de expresión transgénica en células eucariotas está determinado, en gran medida, por el promotor transcripcional dentro del casete de expresión transgénica. Se usan promotores que muestran actividad a largo

plazo y son específicos de tejido e incluso de célula en algunas realizaciones. Ejemplos no limitantes de promotores incluyen, aunque sin limitación, el promotor de citomegalovirus (CMV) (Kaplitt et al. (1994) Nat. Genet. 8:148-154), el promotor de CMV/ β 3-globina humana (Mandel et al. (1998) J. Neurosci. 18:4271-4284), el promotor de GFAP (Xu et al. (2001) Gene Ther. 8:1323-1332), el promotor de la enolasa específica de neuronas (NSE) de 1,8 kb (Klein et al. (1998) Exp. Neurol. 150:183-194), el promotor de la beta actina del pollo (CBA) (Miyazaki (1989) Gene 79:269-277), el promotor de la β -glucuronidasa (GUSB) (Shipley et al. (1991) Genetics 10:1009-1018) y promotores de ubiquitina tales como los aislados de la ubiquitina humana A, ubiquitina human B y ubiquitina human C como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.667.174. Para prolongar la expresión, adicionalmente pueden unirse de forma funcional otros elementos reguladores al transgén, tal como, por ejemplo, el elemento pos-regulador del virus de la hepatitis de Woodchuck (WPRE) (Donello et al. (1998) J. Virol. 72:5085-5092) o el sitio de poliadenilación de la hormona bovina del crecimiento (BGH).

Para algunas aplicaciones de terapia génica del SNC, puede ser necesario controlar la actividad transcripcional. Para este fin, puede obtenerse la regulación farmacológica de la expresión génica con vectores víricos incluyendo diversos elementos reguladores y promotores sensibles a fármacos como se describe, por ejemplo, en Haberman et al. (1998) Gene Ther. 5:1604-16011; y Ye et al. (1995) Science 283:88-91.

En ciertas realizaciones, la concentración o el título del vector en la composición es de al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, o 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, o 50 ($\times 10^9$ tu/ml); o (c) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, o 50 ($\times 10^{10}$ iu/ml).

En un aspecto de la descripción, el transgén codifica una molécula biológicamente activa, cuya expresión en el SNC provoca la corrección al menos parcial de la neuropatología y/o la estabilización de la progresión de la enfermedad. En algunos casos, el producto transgénico terapéutico es una proteína IGF-1 que alivia y/o previene los síntomas de ALS. Véase, Roaul et al. (2005) Nat. Med. 11(4):423-428 y Ralph et al. (2005) Nat. Med. 11(4):429-433. En otros aspectos de la descripción, se codifican dos transgenes, por ejemplo, IGF-1 y VEGF, cuya expresión en el SNC provoca la corrección al menos parcial de la neuropatología, tal como el alivio y/o la prevención y/o estabilización y/o ralentización de la progresión de los síntomas de ALS.

En un aspecto cuando se realizan estos métodos, el transgén expresa una cantidad terapéutica de factor de crecimiento de insulina-1 (IGF-1), calbindina D28, parvalbúmina, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2, CNTF (factor neurotrófico ciliar), sonic hedgehog (shh), eritropoyetina (EPO), lisilo oxidasa (LOX), progranulina, prolactina, grelina, neuroserpina, angiogenina y lactógeno placentario.

Para suministrar la solución u otra composición que contenga el vector vírico específicamente a una región particular del sistema nervioso central, tal como a un ventrículo particular, por ejemplo, a los ventrículos laterales o al cuarto ventrículo del cerebro, se puede administrar por microinyección estereotáxica. Por ejemplo, en el día de la cirugía, los pacientes tendrán el armazón base estereotáxico fijado en su sitio (atornillado en el cráneo). Se harán imágenes del cerebro con el armazón base estereotáxico (MRI-compatible con marcas fiduciarias) usando MRI de alta resolución. Las imágenes MRI después se transferirán a un ordenador que ejecuta el software estereotáxico. Se usará una serie de imágenes coronales, sagitales y axiales para determinar el sitio diana de la inyección del vector y la trayectoria. El software traduce directamente la trayectoria en coordenadas tridimensionales apropiadas para el armazón estereotáxico. Se taladrarán agujeros de trepanación por encima del sitio de entrada y el aparato estereotáxico localizado con la aguja implantada a la profundidad dada. Después se inyectará la solución de vector en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Pueden usarse vías adicionales de administración, por ejemplo, aplicación cortical superficial bajo visualización directa u otra aplicación no estereotáxica.

Un modo para suministrar el vector vírico es usar una bomba. Dichas bombas están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Alzet (Cupertino, CA) o Medtronic (Minneapolis, MN). La bomba puede ser implantable. Otro modo conveniente de administrar el vector es usar una cánula o un catéter.

La presente descripción proporciona métodos para modular, corregir o aumentar la función motora en un sujeto afectado con daño neuronal motor. Con fines de ilustración solamente, el sujeto puede padecer uno o más de esclerosis lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular bulboespinal, atrofia muscular espinal, ataxia cerebelosa espinal, esclerosis lateral primaria (PLS) o lesión traumática de médula espinal.

Sin limitarse a teoría alguna, la patología asociada con el daño a neuronas motoras puede incluir degeneración de neuronas motoras, gliosis, anormalidades de neurofilamentos, pérdida de fibras mielinizadas en los tractos corticoespinales y las raíces ventrales. Se reconocen dos tipos de inicio: inicio bulbar, que afecta a las neuronas motoras del tronco cerebral (afecta a los músculos faciales, el habla y la deglución); e inicio en las extremidades, que afecta a neuronas motoras de la médula espinal, está reflejado por espasticidad, debilidad generalizada, atrofia muscular, parálisis e insuficiencia respiratoria. En ALS, los sujetos han tenido inicio tanto bulbar como en las extremidades. En PLS, los sujetos han tenido inicio bulbar.

La capacidad de organizar y ejecutar actos motores complejos depende de señales desde las áreas motoras en la corteza cerebral, es decir, la corteza motora. Las órdenes motoras corticales descendentes en dos tractos. Las fibras

corticobulbares controlan los núcleos motores en el tronco cerebral que mueve los músculos faciales y las fibras corticoespinales controlan las neuronas motoras espinales que inervan el tronco y los músculos de las extremidades. La corteza cerebral también influye indirectamente en la actividad motora espinal actuando sobre las rotas descendentes del tronco cerebral.

5 La corteza motora primaria descansa a lo largo del giro precentral en el área de Broadmann (4). Los axones de las neuronas corticales que se proyectan hasta la médula espinal discurren juntos en el tracto corticoespinal, un haz masivo de fibras que contiene aproximadamente 1 millón de axones. Aproximadamente un tercio de estos se originan en el giro precentral del lóbulo frontal. Otro tercio se origina a partir del área 6. El resto se origina en las áreas 3, 2, y 1 en la corteza sensorial somática y regula la transmisión de la entrada aferente a través de la asta dorsal.

15 Las fibras corticoespinales discurren junto con las fibras corticobulbares a través del miembro posterior de la cápsula interna hasta alcanzar la parte ventral del mesencéfalo. Se separan en el puente de Varolio en pequeños haces de fibras que atraviesan entre los núcleos pontinos. Se reagrupan en bulbo raquídeo para formar la pirámide medular. Aproximadamente tres cuartos de las fibras corticoespinales cruzan la línea media en el quiasma piramidal en la unión del bulbo raquídeo y la médula espinal. Las fibras cruzadas descienden en la parte dorsal de las columnas laterales (columna dorsolateral) de la médula espinal, formando el tracto corticoespinal lateral. Las fibras no cruzadas descienden en las columnas ventrales como el tractor corticoespinal ventral.

20 Las divisiones lateral y ventral del tracto corticoespinal terminan en aproximadamente las mismas regiones de materia gris espinal que los sistemas lateral y medial del tronco cerebral. El tracto corticoespinal lateral se proyecta principalmente hasta los núcleos motores en la parte lateral de la asta ventral y hasta interneuronas en la zona intermedio. El tracto corticoespinal ventral se proyecta de forma bilateral hasta la columna celular ventromedial y hasta unirse a partes de la zona intermedia que contienen las neuronas motoras que inervan los músculos axiales.

30 Si se desea, la estructura del cerebro humano puede correlacionarse con estructuras similares en el cerebro de otro mamífero. Por ejemplo, la mayoría de mamíferos, incluyendo los seres humanos y los roedores, muestran una organización topográfica similar de las proyecciones del área entorrinal-hipocampo, proyectándose las neuronas en la parte lateral de la corteza entorrinal tanto lateral como medial hasta la parte dorsal o polo septal del hipocampo, mientras que la proyección hasta el hipocampo ventral se origina principalmente a partir de neuronas en las partes mediales de la corteza entorrinal (Principles of Neural Science, 4ª ed., eds Kandel et al., McGraw-Hill, 1991; The Rat Nervous System, 2ª ed., ed. Paxinos, Academic Press, 1995). Además, las células de la capa II de la corteza entorrinal se proyectan hasta el giro dentado, y terminan en los dos tercios externos de la capa molecular del giro dentado. Los axones desde las células de la capa III se proyectan de forma bilateral hasta las áreas CA1 y CA3 del cuerno de Amón del hipocampo, terminando en la capa molecular del estrato lacunoso.

40 En un aspecto, los métodos descritos incluyen administrar, al SNC de un sujeto afectado, un vector vírico neurotrófico que porta un transgén que codifica un producto terapéutico y permitir que el transgén se exprese dentro del SNC cerca del sitio de administración a un nivel suficiente para ejercer un efecto terapéutico según se transporta la proteína expresada mediante LCR por todo el SNC. Además, el vector puede comprender un polinucleótido que codifica una molécula biológicamente activa eficaz para tratar el trastorno del SNC. Dichas moléculas biológicamente activas pueden comprender péptidos incluyendo, aunque sin limitación, versiones nativas o mutadas de proteínas de longitud completa, versiones nativas o mutadas de fragmentos proteicos, polipéptidos sintéticos.

45 En una realización ilustrativa, la administración se consigue por inyección directa de una solución de vector de título alto en uno o más de los espacios ventriculares del cerebro, tal como el ventrículo lateral de un sujeto o paciente. Por ejemplo, la administración es por inyección directa en bolo en uno o más ventrículos del cerebro tales como el ventrículo lateral y el cuarto ventrículo.

50 En algunos casos, los métodos comprenden la administración de un vector neurotrófico de título alto que porta un transgén terapéutico de modo que el producto transgénico se expresa a un nivel terapéutico en un primer sitio dentro del SNC distal al sitio final de acción del producto expresado. En algunas realizaciones, el título de virus de la composición es de al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 50 ($\times 10^{12}$ gp/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 50 ($\times 10^9$ tu/ml); o (c) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 50 ($\times 10^{10}$ iu/ml).

60 En ratones experimentales, el volumen total de solución de AAV inyectada es, por ejemplo, entre 1 a 20 μ l. Para otros mamíferos, incluyendo el cerebro humano, los volúmenes y tasas de suministro se cambian de escala apropiadamente. Por ejemplo, se ha demostrado que volúmenes de 150 μ l pueden inyectarse de forma segura en el cerebro de primates (Janson et al. (2002) Hum. Gene Ther. 13:1391-1412). El tratamiento puede consistir en una única inyección por sitio diana, o puede repetirse en uno o más ventrículos. Los ventrículos adecuados incluyen los ventrículos laterales, el tercer ventrículo y el cuarto ventrículo. Pueden usarse múltiples sitios de inyección. Por ejemplo, en algunas realizaciones, además del primer sitio de administración, se administra una composición que contiene un vector vírico que porta un transgén a otro sitio que puede ser contralateral o ipsilateral al primer sitio de administración. Las inyecciones pueden ser únicas o múltiples, unilaterales o bilaterales.

Pueden producirse preparaciones de AAV de título alto usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.658.776 y *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*, ed. Machida, Humana Press, 2003.

- 5 Los siguientes ejemplos ilustran la presente descripción. Un experto en la materia reconocerá las numerosas modificaciones y variaciones que pueden realizarse sin alterar el espíritu o alcance de la presente descripción. Los ejemplos no limitan de ningún modo la invención.

Titulación de vectores recombinantes

10 Los títulos del vector AAV se miden de acuerdo con el número de copias del genoma (partículas genómicas por mililitro). Las concentraciones de partículas genómicas se basan en PCR Taqman® del ADN del vector como se ha informado previamente (Clark et al. (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278).

15 Los vectores que portan un gen marcador ensayable, tal como el gen de la β -galactosidasa (Lac Z) o de la proteína fluorescente verde (GFP) pueden titularse usando un ensayo de infectividad. Las células susceptibles (por ejemplo, células HeLa o COS) se transducen con el AAV y se realiza un ensayo para determinar la expresión génica, tal como tinción de células transducidas con el vector de la β -galactosidasa con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) o microscopía de fluorescencia para células transducidas con GFP. Por ejemplo, el ensayo se realiza del siguiente modo: se siembran 4×10^4 células HeLa en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos usando medio normal de cultivo. Después de la fijación, es decir, aproximadamente 24 horas después, las células se infectan con Ad tipo 5 a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 y se transducen con diluciones en serie del vector empaquetado y se incuban a 37°C. De uno a tres días después, antes de observarse los extensivos efectos citopáticos, se realiza el ensayo apropiado sobre las células (por ejemplo, tinción X-gal o microscopía de fluorescencia). Si se usa un gen indicador tal como β -galactosidasa, las células se fijan en paraformaldehído al 2%, glutaraldehído al 0,5% y se tiñen para la actividad β -galactosidasa usando X-gal. Se recuentan las diluciones de vector que dan células bien separadas. Cada célula positiva representa 1 unidad de transducción (tu) de vector.

- 30 Modelo terapéuticamente relevante de esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS) es una enfermedad neurodegenerativa mortal que se caracteriza por una pérdida selectiva de neuronas motoras en la corteza, el tronco cerebral y la médula espinal. La progresión de la enfermedad puede conducir a atrofia de los músculos de las extremidades, axiales y respiratorios. La muerte celular de las neuronas motoras está acompañada por gliosis reactiva, anomalías de neurofilamentos y una pérdida significativa de fibras grandes mielinizadas en los tractos corticoespinales y las raíces ventrales^{1,6}. Aunque la etiología de ALS está poco comprendida, las evidencias que se acumulan indican que la ALS esporádica (SALS) y familiar (FALS) comparten muchas características patológicas similares; por tanto, hay esperanza de que el estudio de cualquiera de las formas conduzca a un tratamiento común⁷. FALS representa aproximadamente el 10% de los casos diagnosticados, de los cuales el 20% están asociados con mutaciones de herencia dominante en la superóxido dismutasa de Cu/Zn (SOD1)⁸. Los ratones transgénicos que expresan la proteína SOD1 humana mutante (por ejemplo, ratones SOD1^{G93A}) recapitulan muchas características patológicas de ALS y son un modelo animal disponible para estudiar ALS⁹. Para SALS, se ha implicado una miríada de mecanismos patológicos como causa subyacente, incluyendo la excitotoxicidad inducida por glutamato, la exposición a toxinas, la disfunción del proteasoma, el daño mitocondrial, la desorganización de neurofilamentos y la pérdida de soporte neurotrófico^{10,11}.

Hasta la fecha, no existe terapia eficaz para el tratamiento de ALS. Se han investigado extensivamente factores neurotróficos tales como el factor de crecimiento de insulina-1 (IGF-1) por su utilidad potencial en el tratamiento de ALS. El suministro intracraneal de vectores víricos a regiones del SNC que están interconectadas con el tronco cerebral y las neuronas motoras espinales mediante el LCR proporciona un medio de administración de agentes terapéuticos potenciales, tales como IGF-1, a áreas que por lo demás serían difíciles de abordar a través de medios de la técnica anterior.

Sin limitarse a teoría alguna, IGF-1 es una proteína terapéutica para el tratamiento de ALS debido a sus muchas acciones a diferentes niveles de neuraxis (véase, Dore et al., *Trends Neurosci.*, 1997, 20:326-331). En el cerebro: se cree que reduce la apoptosis tanto neuronal como de la glía, protege a las neuronas contra la toxicidad inducida por hierro, colchicina, desestabilizantes del calcio, peróxidos y citoquinas. También se cree que modula la liberación de los neurotransmisores acetilcolina y glutamato. También se cree que induce la expresión de neurofilamentos, tubulina y la proteína básica de mielina. En la médula espinal: se cree que IGF-1 modula la actividad ChAT y atenúa la pérdida del fenotipo colinérgico, potencia el brote de neuronas motoras, aumenta la mielinización, inhibe la desmielinización, estimula la proliferación y diferenciación de neuronas motoras a partir de células precursoras y promueve la división, maduración y crecimiento de células de Schwann. En el músculo: se cree que IGF-1 induce la formación de grupos de receptores de acetilcolina en la unión neuromuscular y aumenta la función neuromuscular y la fuerza muscular. En los siguientes experimentos, se utilizó la forma IGF-1Ea de la proteína.

65 Ejemplo 1: Suministro intracerebroventricular de AAV4-IGF-1

Se realizaron experimentos para determinar si el suministro intraventricular de AAV4-IGF-1 conducía a (1) prolongación significativa de vida; (2) rendimiento mejorado en rotarod y tareas de fuerza de agarre; y (3) neuropatología reducida (es decir, alivio en la gliosis y supervivencia mejorada de las neuronas motoras) en el tronco cerebral y la médula espinal.

Se trataron ratones SOD1 sintomáticos (es decir, de 90 días de edad) con AAV4-IGF-1 o vector de control AAV4-Bgal (Bgal también se menciona como Lac Z). Para cada ratón, los vectores se inyectaron tanto en el ventrículo lateral (A-P: - 3 del bregma, M-L: -1,0 del bregma, D-V: -2,0 de la dura, barra de corte: 0,0) como en el 4° ventrículo (A-P: -5,90 del bregma, M-L: 0,0 del bregma, D-V: -2,9 de la dura, barra de corte: 0,0) usando un armazón estereotáxico. Los vectores se suministraron con una jeringa Hamilton de 10 µl a una tasa de 0,5 µl/minuto para un total de $1,80 \times 10^{10}$ copias genómicas por ventrículo. El volumen final de inyección para cada vector fue de 10 µl/ventrículo. A la edad de 110 días o en la fase final, se sacrificaron 4 ratones de cada grupo de tratamiento para el análisis histológico (es decir, tinción GFAP (proteína ácida fibrilar de la glía) y recuentos MN en el tronco cerebral y la médula espinal). Los puntos finales que se han evaluado incluyen análisis de supervivencia, rotarod, ensayos de fuerza de agarre de las extremidades posteriores y extremidades anteriores, y masa corporal.

El ensayo de la función motora usando un dispositivo rotarod y el medir de fuerza de agarre (Columbus Instruments, Columbus, OH) puede comenzar a los 70 días de edad. Cada sesión semanal puede consistir de tres ensayos en el rotarod de aceleración elevada empezando a 5 rpm/min. El tiempo que cada ratón permanece sobre el rodillo puede registrarse automáticamente. El ensayo del medidor de fuerza de agarre puede realizarse permitiendo que los animales agarren una plataforma, seguido de empuje del animal hasta que libere la plataforma: la medición de la fuerza se registra en cuatro ensayos diferentes. La aparición de debilidad relacionada con la enfermedad se define cuando una extremidad posterior presentaba debilidad muscular y arrastraba la extremidad sobre el rotarod, evaluado por dos observadores independientes. Para determinar la mortalidad de un modo fiable y humano, se usa un punto final artificial definido por la incapacidad de los ratones de erguirse por sí mismos 30 segundos después de colocarse sobre sus laterales.

El suministro intracerebroventricular de AAV4-IGF-1 produjo una prolongación significativa de la vida en ratones SOD1 en comparación con ratones que recibieron AAV4-Bgal como vector de control. Los ratones que recibieron AAV4-IGF-1 obtuvieron un tiempo medio de supervivencia de 141,5 días en comparación con un tiempo medio de supervivencia de 121 días en ratones tratados con AAV4-Bgal (Figura 1). Los ratones SOD1 tratados con AAV4-IGF-1 obtuvieron resultados funcionales mejorados medidos por ensayo Rotarod, fuerza de agarre de las extremidades anteriores y fuerza de agarre de las extremidades posteriores en comparación con ratones tratados con control. Los resultados se muestran en las Figuras 1-5.

La evaluación histológica de GFAP, que es un marcador de gliosis y una característica distintiva patológica de ALS, demostró que la astrogliosis se reducía significativamente en ratones tratados con AAV4-IGF-1 en comparación con ratones de control tratados con AAV4-Bgal. Esta reducción se observó tanto en la región del tronco cerebral del SNC (por ejemplo, núcleo trigémino, núcleo facial, núcleo hipogloso; Figura 6) como en la médula espinal ventral (por ejemplo, cervical, torácica, lumbar, sacra; Figura 7).

La evaluación histológica de los niveles de nitrotirosina, que es un marcador de peroxinitrito y un marcador patológico asociado con ALS, demostró que los niveles de nitrotirosina se reducían significativamente en ratones tratados con AAV4-IGF-1 en comparación con ratones de control tratados con AAV4-Bgal. Esta reducción en los niveles de nitrotirosina se observó en toda la médula espinal, por ejemplo, las regiones cervical, torácica, lumbar y sacra (Figura 8).

Ejemplo 2: Suministro intracerebroventricular de AAV4-IGF-1 y AAV4-GFP

Se trataron ratones SOD1 sintomáticos (es decir, de 88-90 días de edad) con vector AAV4-IGF-1 o AAV4-GFP mediante inyección intracerebroventricular del vector tanto en el ventrículo lateral como en el 4° ventrículo. Los ratones recibieron una dosis de 2×10^{10} gc/ventrículo. Se utilizó proteína fluorescente verde como proteína de control, que posibilitaba la visualización de la expresión mediada por la inyección de los vectores AAV.

Los puntos finales evaluados incluyeron la supervivencia, el ensayo rotarod, la fuerza de agarre (extremidades posteriores y extremidades anteriores), los recuentos de células neuronales motoras, la distribución de proteína GFP, los niveles de proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), los niveles de nitrotirosina y RT-PCR para medir la distribución vírica dentro del SNC. A la edad de 110 días o en la fase final, se sacrificaron ratones de cada grupo de tratamiento para análisis adicional. Los niveles de proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) se evaluaron de forma histológica. GFAP es un marcador de gliosis, que es una característica distintiva patológica de ALS. Los niveles de nitrotirosina se evaluaron de forma histológica; la nitrotirosina es un marcador de peroxinitrito.

El suministro intracerebroventricular de AAV4-IGF-1 produjo una prolongación significativa de la vida en ratones SOD1 en comparación con ratones que recibieron AAV4-GFP como vector de control. Los ratones SOD1 tratados con AAV4-IGF-1 obtuvieron resultados funcionales mejorados medidos por ensayo Rotarod, fuerza de agarre de las

extremidades anteriores y fuerza de agarre de las extremidades posteriores en comparación con ratones tratados con control.

5 La visualización de la expresión de proteína fluorescente verde (GFP) en ratones que se habían tratado con AAV4-GFP indicó que GFP se distribuía en toda la capa celular endotelial del sistema ventricular. Por ejemplo, GFP se visualizaba en los ventrículos laterales anteriores, los ventrículos laterales, el tercer ventrículo y el cuarto ventrículo (Figura 9). GFP también se visualizaba en el plexo coroideo del sistema ventricular y la capa celular endotelial del canal central de la médula espinal (incluyendo las regiones cervical, torácica y lumbar) (Figura 10).

10 La RT-PCR para el vector AAV4-IGF-1 demostró que el vector estaba presente en la corteza, el tronco cerebral y la médula espinal después de suministro intraventricular (Figura 11A).

Ejemplo 3: Suministro intracerebroventricular de AAV4-VEGF y AAV4-GFP

15 Se trataron ratones SOD1 sintomáticos (es decir, de 88-90 días de edad) con vector AAV4-VEGF-165 o AAV4-GFP mediante inyección intracerebroventricular del vector tanto en el ventrículo lateral como en el 4º ventrículo. Los ratones recibieron una dosis de 2 e10 gc/ventrículo. Se utilizó proteína fluorescente verde como proteína de control, que posibilitaba la visualización de la expresión mediada por la inyección de los vectores AAV.

20 Los puntos finales evaluados incluyeron la supervivencia, ensayo rotarod, fuerza de agarre (extremidades posteriores y extremidades anteriores), y RT-PCR para medir la distribución vírica dentro del SNC.

25 El suministro intracerebroventricular de AAV4-VEGF produjo una prolongación significativa de la vida en ratones SOD1 en comparación con ratones que recibieron AAV4-GFP como vector de control. Los tiempos medios de supervivencia para ratones que recibieron AAV4-VEGF fueron de 140 días mientras que los tiempos medios de supervivencia para ratones que recibieron AAV4-GFP fueron de 120 días (Figura 12).

30 Los ratones SOD1 tratados con AAV4-VEGF obtuvieron resultados funcionales mejorados medidos por ensayo Rotarod (Figura 13), fuerza de agarre de las extremidades anteriores y fuerza de agarre de las extremidades posteriores (Figura 13) en comparación con ratones tratados con control.

El suministro intraventricular de AAV4-VEGF no influyó en la masa corporal en ratones SOD1.

35 La RT-PCR para el vector AAV4-IGF-1 demostró que el vector estaba presente en la corteza, el tronco cerebral y la médula espinal después de suministro intraventricular (Figura 11B).

40 La memoria descriptiva se comprende más minuciosamente a la luz de los contenidos de las referencias citadas dentro de la memoria descriptiva. Las realizaciones dentro de la memoria descriptiva proporcionan una ilustración de las realizaciones de la invención y no debe entenderse que limitan el alcance de la invención. Los expertos en la materia reconocen fácilmente que están abarcadas muchas otras realizaciones por la invención.

45 Salvo que se indique de otro modo, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, cultivo celular, condiciones de tratamiento, y así sucesivamente, usados en la memoria descriptiva deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, salvo que se indique de otro modo, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener. Salvo que se indique de otro modo, debe entenderse que el término "al menos", que precede una serie de elementos, se refiere a todos los elementos en la serie. Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de averiguar usando nada más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en este documento.

50

Tabla 1: Pares génicos potenciales para su uso en un vector vírico recombinante

Gen	IGF-1	calbindina D28	parvalbúmina	HIF1-alfa	SIRT-2	CNTF
IGF-1		X	X	X	X	X
calbindina D28	X		X	X	X	X
parvalbúmina	X	X		X	X	X
HIF1-alfa	X	X	X		X	X
SIRT-2	X	X	X	X		X
VEGF	X	X	X	X	X	X
SMN-1	X	X	X	X	X	X
SMN-2	X	X	X	X	X	X
CNTF	X	X	X	X	X	
shh	X	X	X	X	X	X
EPO	X	X	X	X	X	X
LOX	X	X	X	X	X	X
progranulina	X	X	X	X	X	X

prolactina	X	X	X	X	X	X
lactógeno placentario	X	X	X	X	X	X
grelina	X	X	X	X	X	X
angiogenina	X	X	X	X	X	X
neuroserpina	X	X	X	X	X	X

Tabla 2: Pares génicos potenciales para su uso en un vector vírico recombinante

Gen	progranulina	prolactina	lactógeno placentario	grelina	angiogenina
IGF-1	X	X	X	X	X
calbindina D28	X	X	X	X	X
parvalbúmina	X	X	X	X	X
HIF1-alfa	X	X	X	X	X
SIRT-2	X	X	X	X	X
VEGF	X	X	X	X	X
SMN-1	X	X	X	X	X
SMN-2	X	X	X	X	X
CNTF	X	X	X	X	X
shh	X	X	X	X	X
EPO	X	X	X	X	X
LOX	X	X	X	X	X
progranulina		X	X	X	X
prolactina	X		X	X	X
lactógeno placentario.	X	X		X	X
grelina	X	X	X		X
angiogenina	X	X	X	X	
neuroserpina	X	X	X	X	X

Tabla 3: Pares génicos potenciales para su uso en un vector vírico recombinante

Gen	shh	EPO	LOX	VEGF	SMN-1	SMN-2	neuroserpina
IGF-1	X	X	X	X	X	X	X
calbindina D28	X	X	X	X	X	X	X
parvalbúmina	X	X	X	X	X	X	X
HIF1-alfa	X	X	X	X	X	X	X
SIRT-2	X	X	X	X	X	X	X
VEGF	X	X	X		X	X	X
SMN-1	X	X	X	X		X	X
SMN-2	X	X	X	X	X		X
CNTF	X	X	X	X	X	X	X
shh		X	X	X	X	X	X
EPO	X		X	X	X	X	X
LOX	X	X		X	X	X	X
progranulina	X	X	X	X	X	X	X
prolactina	X	X	X	X	X	X	X
lactógeno placentario	X	X	X	X	X	X	X
grelina	X	X	X	X	X	X	X
angiogenina	X	X	X	X	X	X	X
neuroserpina	X	X	X	X	X	X	

5

Referencias

1. Leigh, P.N. y Swash, M. Cytoskeletal pathology in motor neuron diseases. *Adv Neurol* **56**, 115-24 (1991).
2. Carpenter, S. Proximal axonal enlargement in motor neuron disease *Neurology* **18** 841-51 (1968).
3. Gonatas, N.K. et al. Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* **140**, 731-7 (1992).
4. Hirano, A. et al. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **43**, 471-80 (1984).
5. Leigh, P.N. et al. Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity. *Brain* **114 (Pt 2)**, 775-88 (1991).
6. Delisle, M.B. y Carpenter, S. Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **63**, 241-50 (1984).
7. Hirano, A. Neuropathology of ALS: an overview. *Neurology* **47**, S63-6 (1996).
8. Rosen, D.R. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62 (1993).

20

9. Gurney, M.E. et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**, 1772-5 (1994).
10. Rowland, L.P. y Shneider, N.A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* **344**, 1688-700 (2001).
11. Bruijn, L.I., Miller, T.M. y Cleveland, D.W. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* **27**, 723-49 (2004).
12. Cleveland, D.W. y Rothstein, J.D. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* **2**, 806-19 (2001).
13. Lindsay, R.M. Neurotrophic growth factors and neurodegenerative diseases: therapeutic potential of the neurotrophins and ciliary neurotrophic factor. *Neurobiol Aging* **15**, 249-51 (1994).
14. Kaspar, B.K., Llado, J., Sherkat, N., Rothstein, J.D. y Gage, F.H. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* **301**, 839-42 (2003).
15. Clement, A.M. et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* **302**, 113-7 (2003).
16. Matsushita, M. Projections from the lowest lumbar and sacral-caudal segments to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* **404**, 21-32 (1999).
17. Matsushita, M. y Gao, X. Projections from the thoracic cord to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* **386**, 409-21 (1997).
18. Matsushita, M. y Xiong, G. Projections from the cervical enlargement to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* **377**, 251-61 (1997).
19. Matsushita, M. y Yaginuma, H. Afferents to the cerebellar nuclei from the cervical enlargement in the rat, as demonstrated with the Phaseolus vulgaris leucoagglutinin method. *Neurosci Lett* **113**, 253-9 (1990).
20. Matsushita, M. y Yaginuma, H. Projections from the central cervical nucleus to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *J Comp Neurol* **353**, 234-46 (1995).
21. Voogd, J. The cerebellar nuclei and their efferent pathways. en *The rat nervous system* (ed. Paxinos, G.) 208-215 (Elsevier Academic Press, San Diego, 2004).
22. Dodge, J.C. et al. Gene transfer of human acid sphingomyelinase corrects neuropathology and motor deficits in a mouse model of Niemann-Pick type A disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17822-7 (2005).
23. Corse, A.M. et al. Preclinical testing of neuroprotective neurotrophic factors in a model of chronic motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis* **6**, 335-46 (1999).
24. Seeburger, J.L. y Springer, J.E. Experimental rationale for the therapeutic use of neurotrophins in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* **124**, 64-72 (1993).
25. Kasarskis, E.J. et al. A controlled trial of recombinant metionil human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). *Neurology* **52**, 1427-33 (1999).
26. Miller, R.G. et al. A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann Neurol* **39**, 256-60 (1996).
27. Borasio, G.D. et al. A placebo-controlled trial of insulin-like growth factor-I in amyotrophic lateral sclerosis. European ALS/IGF-I Study Group. *Neurology* **51**, 583-6 (1998).
28. Lai, E.C. et al. Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on progression of ALS. A placebo-controlled study. The North America ALS/IGF-I Study Group. *Neurology* **49**, 1621-30 (1997).
29. Gorio, A., Lesma, E., Madaschi, L. y Di Giulio, A.M. Co-administration of IGF-I and glycosaminoglycans greatly delays motor neurone disease and affects IGF-I expression in the wobbler mouse: a long-term study. *J Neurochem* **81**, 194-202 (2002).
30. Hantai, D. et al. Beneficial effects of insulin-like growth factor-I on wobbler mouse motoneuron disease. *J Neurol Sci* **129 Supl.**, 122-6 (1995).
31. Zheng, C., Nennesmo, I., Fadeel, B. y Henter, J.I. Vascular endothelial growth factor prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol* **56**, 564-7 (2004).
32. Nagano, I. et al. Therapeutic benefit of intrathecal injection of insulin-like growth factor-1 in a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci* **235**, 61-8 (2005).
33. Azzouz, M. et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* **429**, 413-7 (2004).
34. Federici, T. y Boulis, N.M. Gene-based treatment of motor neuron diseases. *Muscle Nerve* **33**, 302-23 (2006).
35. Boillee, S. y Cleveland, D.W. Gene therapy for ALS delivers. *Trends Neurosci* **27**, 235-8 (2004).
36. Chirmule, N. et al. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* **6**, 1574-83 (1999).
37. High, K.A. Clinical gene transfer studies for hemophilia B. *Semin Thromb Hemost* **30**, 257-67 (2004).
38. Maheshri, N., Koerber, J.T., Kaspar, B.K. y Schaffer, D.V. Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors. *Nat Biotechnol* **24**, 198-204 (2006).
39. Braunstein GD, Rasor JL, Engvall E, Wade ME. Interrelationships of human chorionic gonadotropin, human placental lactogen, and pregnancy-specific beta 1-glycoprotein throughout normal human gestation. *Am J Obstet Gynecol*. 1980 Dec 15; **138**(8): 1205-13.
40. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P, Moreau T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *N Engl J Med*. 1998 Jul 30; **339**(5): 285-91.
41. Carson M. J., Behringer R. R., Brinster R. L. y McMorris F. A. (1993) Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron* **10**, 729-740.
42. Gensert JM, Goldman JE (1997) Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS. *Neuron* **19**:197-203.

43. Gregg C, Shikar V, Larsen P, Mak G, Chojnacki A, Yong VW, Weiss S. White matter plasticity and enhanced remyelination in the maternal CNS. *J Neurosci*. 2007 Feb 21; 27(8):1812-23.
44. Handwerker S, Freemark M. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2000 Apr; 13(4):343-56.
- 5 45. Lesniak MA, Gorden P, Roth J. Reactivity of non-primate growth hormones and prolactins with human growth hormone receptors on cultured human lymphocytes. *Clin Endocrinol Metab*. 1977 May; 44(5): 838-49.
46. Levison SW, Young GM, Goldman JE (1999) Cycling cells in the adult rat neocortex preferentially generate oligodendroglia. *J Neurosci Res* 57:435-446.
- 10 47. Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A (2006) Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26:7907-7918.
48. Pelton EW, Grindeland RE, Young E, Bass NH. Effects of immunologically induced growth hormone deficiency on myelinogenesis in developing rat cerebrum. *Neurology*. 1977 Mar; 27(3):282-8.
49. Peters A, Sethares C (2004) Oligodendrocytes, their progenitors and other neuroglial cells in the aging primate cerebral cortex. *Cereb Cortex* 14:995-1007.
- 15 50. Polito A, Reynolds R (2005) NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat* 207:707-716.
51. Selenkow HA, Saxena BN, Dana CL. Measurement and pathophysiologic significance of human placental lactogen. En Pecile A, Finzi C (eds). *The Feto-Placental Unit*. Amersterdam, Excerpta Medica, 1969, pág. 340.
- 20 52. van Walderveen MA, Tas MW, Barkhof F, Polman CH, Frequin ST, Hommes OR, Valk J (1994) Magnetic resonance evaluation of disease activity during pregnancy in multiple sclerosis. *Neurology* 44:327-329.
53. Voskuhl RR (2003) Hormone-based therapies in MS. *Int MS J* 10:60-66.
54. Zumkeller W. Current topic: the role of growth hormone and insulin-like growth factors for placental growth and development. *Placenta*. 2000 Jul-Ago; 21(5-6):451-67.

25

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Dodge, James

5 <120> Terapia génica para esclerosis lateral amiotrófica y otros trastornos de la médula espinal

<130> 003482.00033

<160> 3

10

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 153

15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Gly Lys Ile Ser Ser Leu Pro Thr Gln Leu Phe Lys Cys Cys Phe
 1      5      10      15
Cys Asp Phe Leu Lys Val Lys Met His Thr Met Ser Ser Ser His Leu
      20      25      30
Phe Tyr Leu Ala Leu Cys Leu Leu Thr Phe Thr Ser Ser Ala Thr Ala
      35      40      45
Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
 50      55      60
Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
 65      70      75      80
Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
      85      90      95
Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
      100      105      110
Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp
      115      120      125
Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly
 130      135      140
Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg Met
 145      150
    
```

20

<210> 2

<211> 195

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 2

```

Met Gly Lys Ile Ser Ser Leu Pro Thr Gln Leu Phe Lys Cys Cys Phe
 1      5      10      15
Cys Asp Phe Leu Lys Val Lys Met His Thr Met Ser Ser Ser His Leu
      20      25      30
Phe Tyr Leu Ala Leu Cys Leu Leu Thr Phe Thr Ser Ser Ala Thr Ala
      35      40      45
    
```

ES 2 596 885 T3

Gly	Pro	Glu	Thr	Leu	Cys	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Asp	Ala	Leu	Gln	Phe
	50					55					60				
Val	Cys	Gly	Asp	Arg	Gly	Phe	Tyr	Phe	Asn	Lys	Pro	Thr	Gly	Tyr	Gly
65					70					75					80
Ser	Ser	Ser	Arg	Arg	Ala	Pro	Gln	Thr	Gly	Ile	Val	Asp	Glu	Cys	Cys
			85						90					95	
Phe	Arg	Ser	Cys	Asp	Leu	Arg	Arg	Leu	Glu	Met	Tyr	Cys	Ala	Pro	Leu
			100					105					110		
Lys	Pro	Ala	Lys	Ser	Ala	Arg	Ser	Val	Arg	Ala	Gln	Arg	His	Thr	Asp
		115						120					125		
Met	Pro	Lys	Thr	Gln	Lys	Tyr	Gln	Pro	Pro	Ser	Thr	Asn	Lys	Asn	Thr
		130				135						140			
Lys	Ser	Gln	Arg	Arg	Lys	Gly	Trp	Pro	Lys	Thr	His	Pro	Gly	Gly	Glu
145					150					155					160
Gln	Lys	Glu	Gly	Thr	Glu	Ala	Ser	Leu	Gln	Ile	Arg	Gly	Lys	Lys	Lys
				165						170				175	
Glu	Gln	Arg	Arg	Glu	Ile	Gly	Ser	Arg	Asn	Ala	Glu	Cys	Arg	Gly	Lys
			180					185						190	
Lys	Gly	Lys													
		195													

Secuencia génica para IGF-1:

```

tcactgtcac  tgctaaattc  agagcagatt  agagcctgcy  caatggaata  aagtcctcaa
aattgaaatg  tgacattgct  ctcaacatct  cccatctctc  tggatttcct  tttgcttcat
tattcctgct  acccaattca  ttttcagact  ttgtacttca  gaagcaatgg  gaaaaatcag
cagtcttcca  acccaattat  ttaagtgctg  cttttgtgat  ttcttgaagg  tgaagatgca
caccatgtcc  tcctcgcatc  tcttctacct  ggcgctgtgc  ctgctcacct  tcaccagctc
tgccacggct  ggaccggaga  cgctctgcyg  ggctgagctg  gtggatgctc  ttcagttcgt
gtgtggagac  aggggctttt  atttcaacaa  gccacaggg  tatggctcca  gcagtcggag
ggcgctcag  acaggcatcg  tggatgagtg  ctgcttccgg  agctgtgatc  taaggaggct
ggagatgtat  tgcgcacccc  tcaagcctgc  caagtcagct  cgctctgtcc  gtgcccagcg
ccacaccgac  atgcccaga  cccagaagga  agtacatttg  aagaacgcaa  gtgaggggag
tgcaggaaac  aagaactaca  ggatgtagga  agaccctcct  gaggagtga  gagtgcacatg
ccaccgcagg  atcctttgct  ctgcacgagt  tacctgttaa  actttggaac  acctacaaa
aaataagttt  gataacattt  aaaagatggg  cgtttcccc  aatgaaatc  acaagtaaac
attccaacat  tgtcttttag  agtgatttgc  accttgcaa  aatggtcctg  gagttggtag
attgctgttg  atcttttata  aataatgttc  tatagaaaag  aaaaaaaaaat

```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector vírico neurotrófico recombinante que comprende un transgén, para su uso en un método de suministro del producto del transgén a la médula espinal de un sujeto, en el que el método comprende administrar el vector vírico a al menos un ventrículo del cerebro, mediante lo cual se expresa dicho transgén y se suministra el producto transgénico expresado a la médula espinal, en el que el vector vírico es un vector de virus adenoasociado (AAV) y en el que el transgén es SMN-1.
- 10 2. El vector vírico neurotrófico recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el método comprende administrar el vector vírico por inyección directa en un ventrículo del cerebro.
3. El vector vírico neurotrófico recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el método comprende administrar el vector vírico por inyección directa en un ventrículo lateral del cerebro.
- 15 4. El vector vírico neurotrófico recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el método comprende administrar el vector vírico por inyección directa en el cuarto ventrículo del cerebro.
- 20 5. El vector vírico neurotrófico recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el transgén expresa una proteína adicional seleccionada del grupo que consiste en factor de crecimiento de insulina-1 (IGF-1), calbindina D28, parvalbúmina, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-2, CNTF (factor neurotrófico ciliar), sonic hedgehog (shh), eritropoyetina (EPO), lisilo oxidasa (LOX), progranulina, prolactina, grelina, neuroserpina, angiogenina y lactógeno placentario.
- 25 6. El vector vírico neurotrófico recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene atrofia muscular espinal.
7. El vector vírico neurotrófico recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sujeto es un mamífero.
- 30 8. El vector vírico neurotrófico recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho mamífero se selecciona del grupo que consiste en un roedor, un murino, un simio y un ser humano.
9. El vector vírico neurotrófico recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sujeto es un paciente humano.
- 35 10. Un vector vírico de AAV recombinante que comprende un transgén que codifica SMN-1, para su uso en un método de suministro de SMN-1 a la médula espinal de un sujeto que tiene atrofia muscular espinal, en el que el método comprende administrar el vector vírico a al menos un ventrículo del cerebro seleccionado del grupo que consiste en un ventrículo lateral y el cuarto ventrículo, mediante lo cual se expresa dicho transgén y se suministra SMN-1 a la médula espinal.
- 40 11. Uso de un vector vírico de AAV recombinante que comprende un transgén de SMN-1 para la fabricación de un medicamento para tratar la atrofia muscular espinal en un sujeto, en el que el tratamiento comprende administrar el vector vírico a al menos un ventrículo del cerebro seleccionado del grupo que consiste en un ventrículo lateral y el cuarto ventrículo, mediante lo cual se expresa el transgén.
- 45 12. El vector vírico recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 10, en el que el producto transgénico es una proteína que comprende un motivo de 11 aminoácidos del dominio de transducción de proteínas de la proteína TAT de VIH.
- 50 13. El uso de la reivindicación 11, en el que el producto transgénico es una proteína que comprende un motivo de 11 aminoácidos del dominio de transducción de proteínas de la proteína TAT VIH.

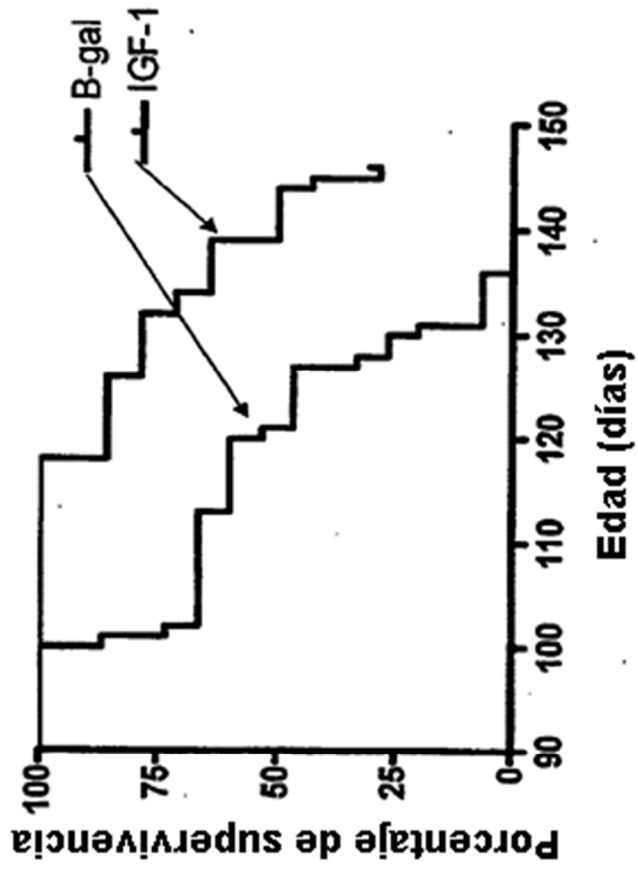


Figura 1

Figura 2

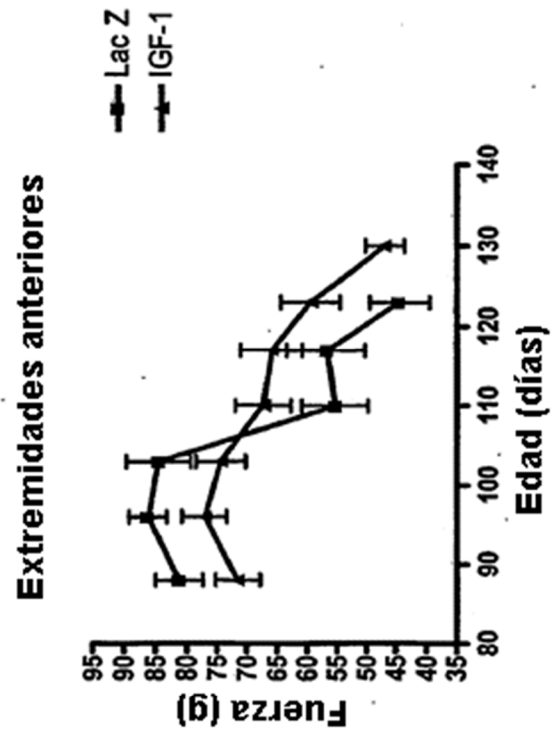
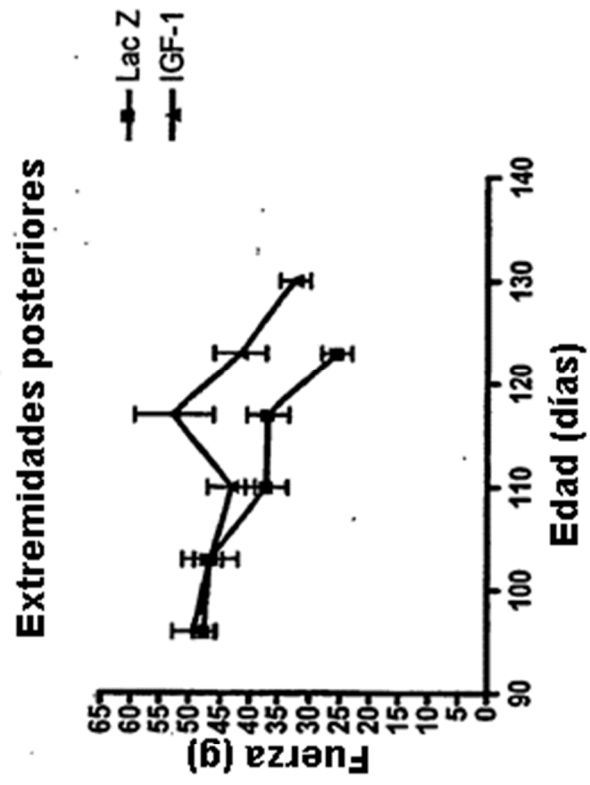


Figura 3



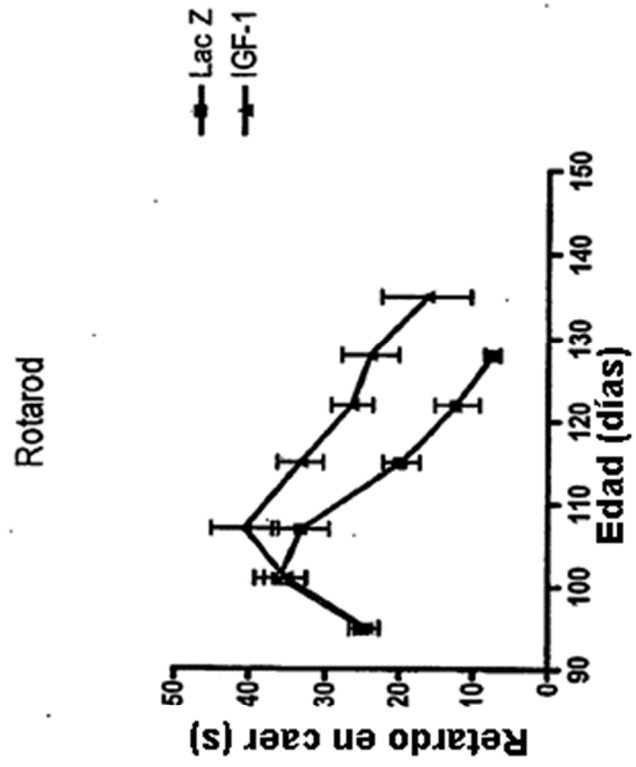


Figura 4

Figura 5

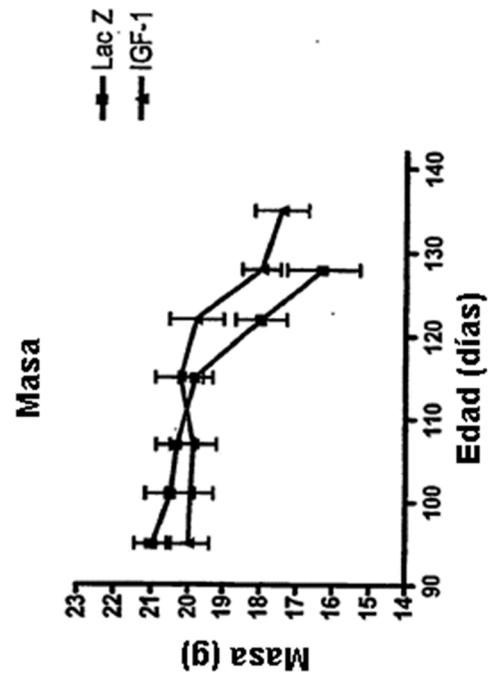


Figura 6

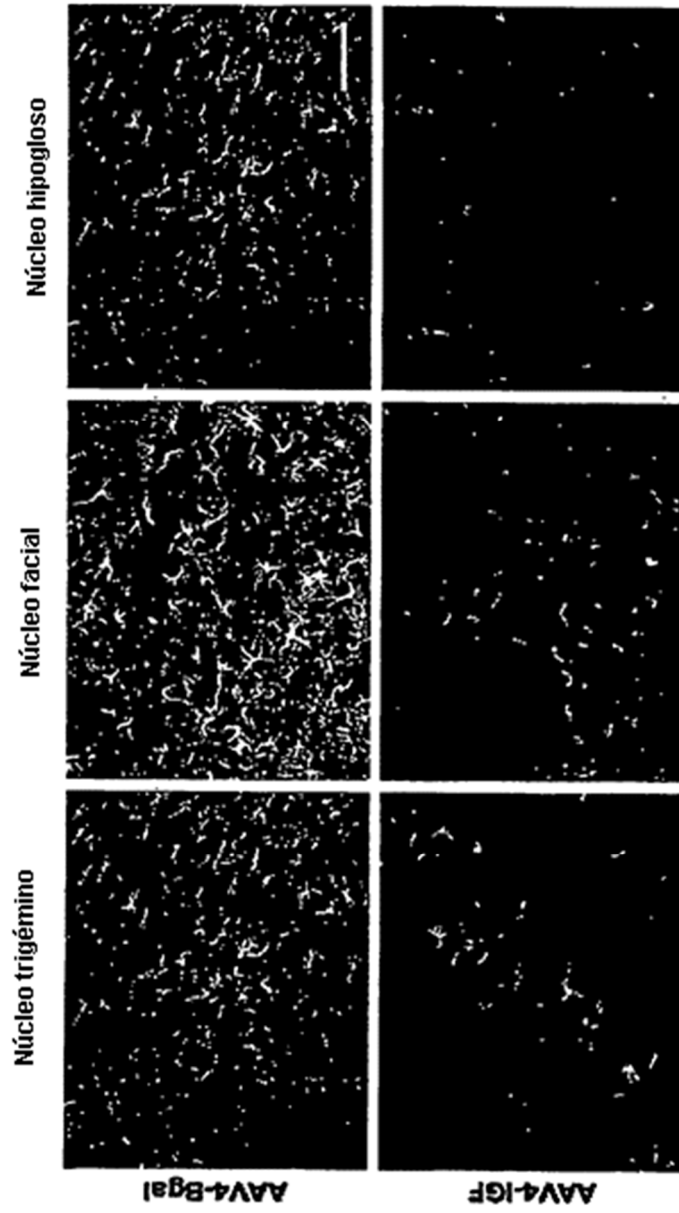


Figura 7

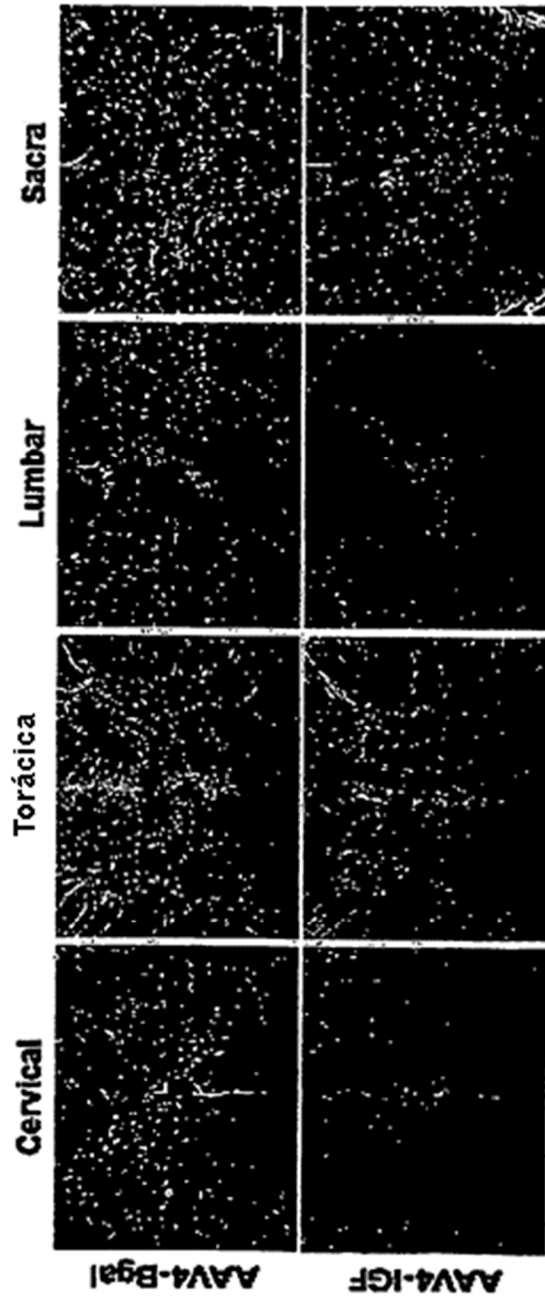


Figura 8

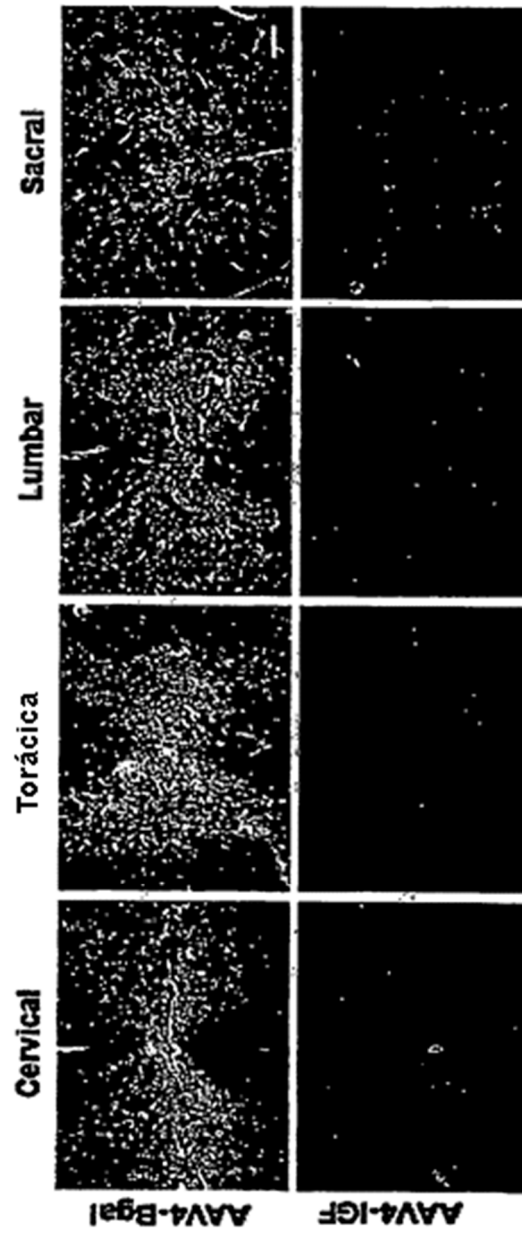


Figura 9

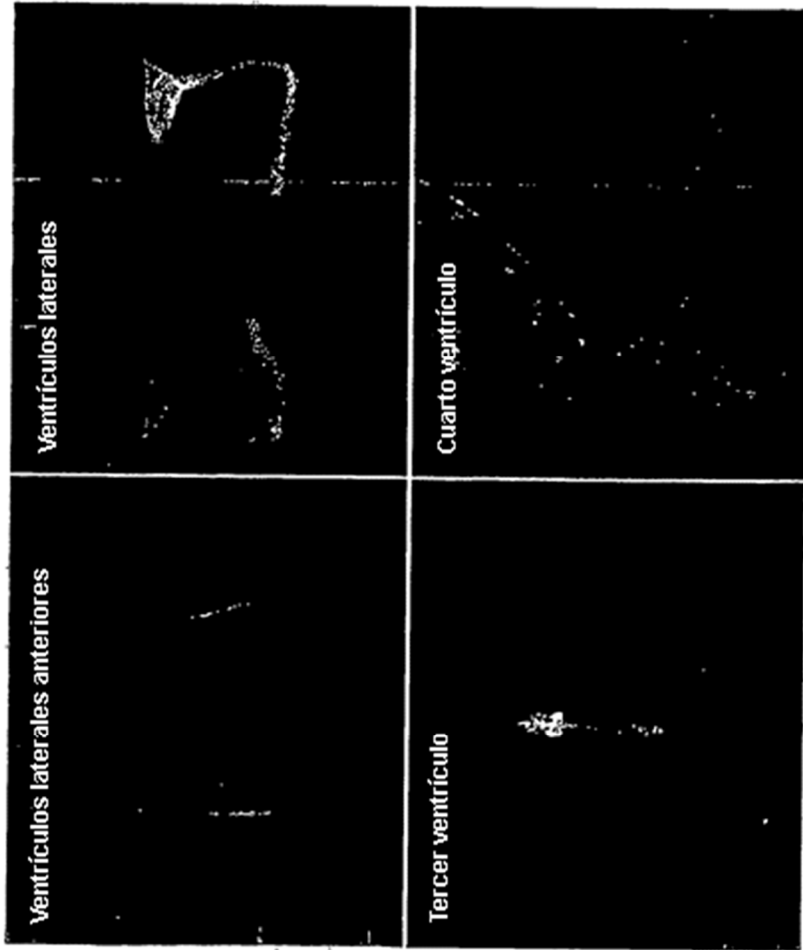


Figura 10



Figura 11

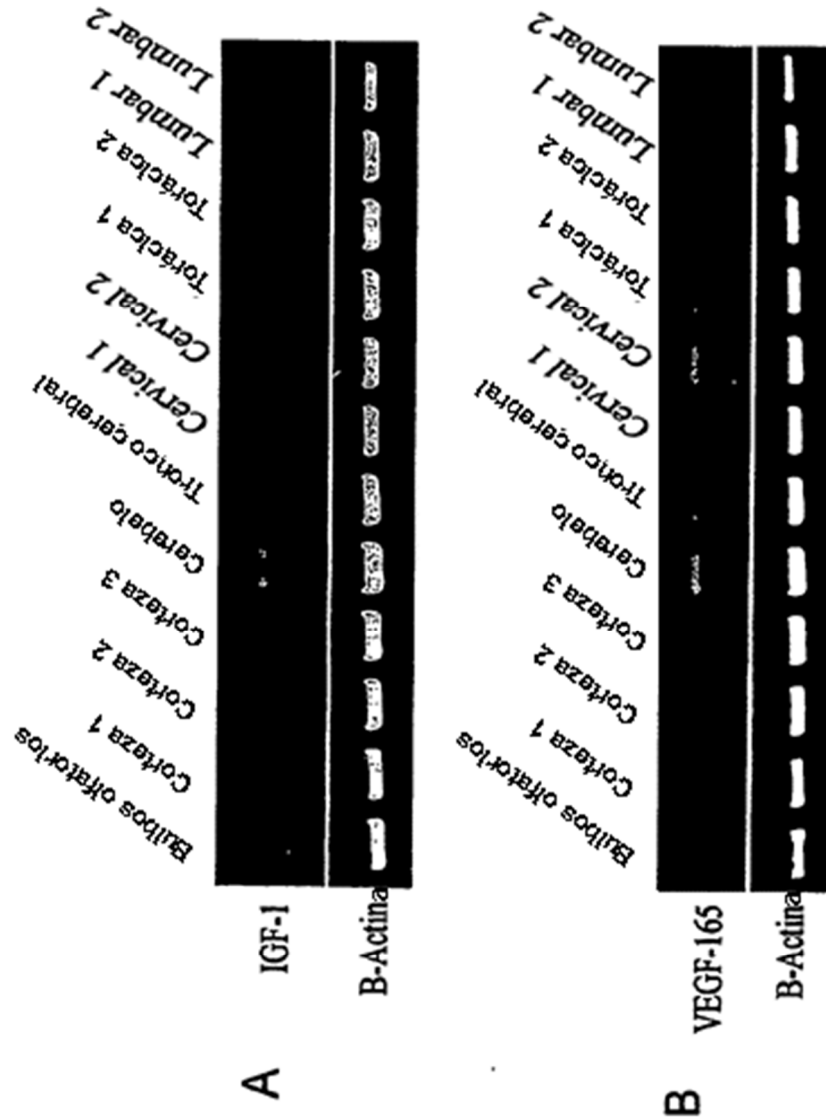
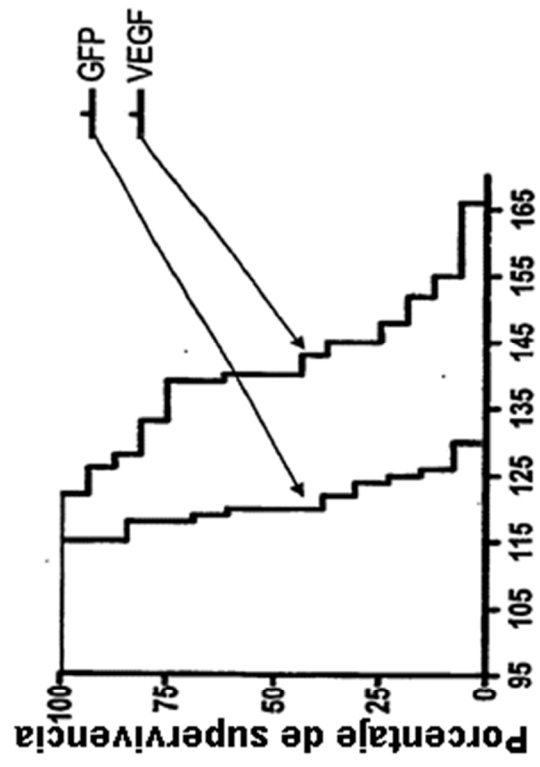


Figura 12



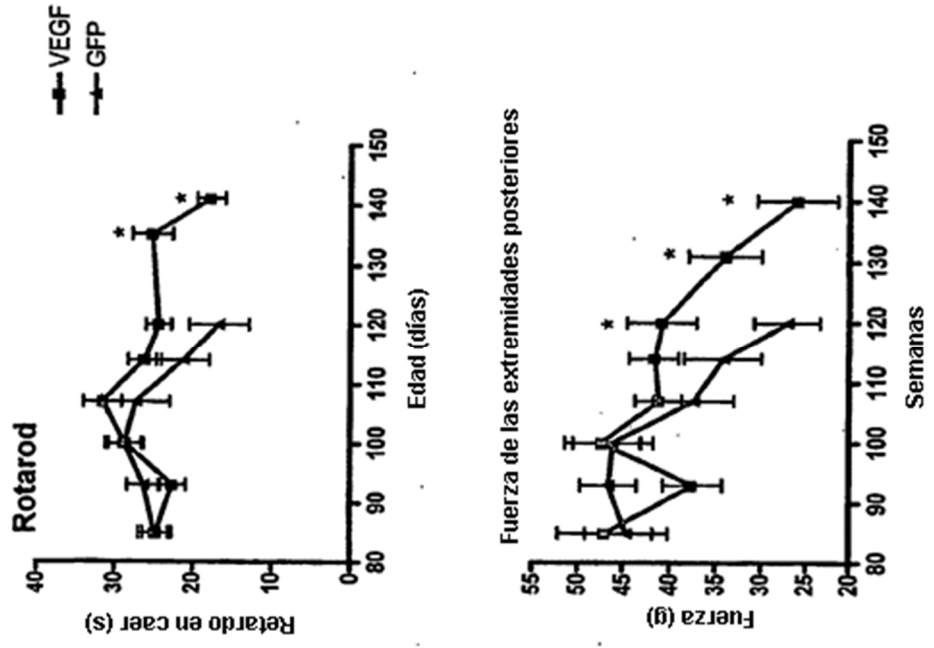


Figura 13