

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 060**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 15/864** (2006.01)

**A61P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2007** **E 12157957 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016** **EP 2497500**

54 Título: **Terapia génica para atrofia muscular espinal**

30 Prioridad:

**03.10.2006 US 827977 P**

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

**29.03.2017**

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)**  
**500 Kendall Street**  
**Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**O'RIORDAN, CATHERINE y**  
**WADSWORTH, SAMUEL**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 607 060 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 atrofia muscular espinal

## CAMPO DE LA INVENCION

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

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una afección neurodegenerativa progresiva que implica la pérdida de grandes neuronas motoras en el cerebro y la médula espinal. Se caracteriza por debilidad progresiva, atrofia y espasticidad, que conducen a parálisis y fallo respiratorio en el plazo de cinco años desde la aparición. La ELA familiar representa el 10 % de todos los casos de ELA; aproximadamente el 25 % de estos casos son debidos a mutaciones en el gen Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1) [1]. Hasta la fecha se han identificado 109 mutaciones diferentes en el gen SOD1; éstas engloban los cinco exones [2]. Además de mutaciones muy raras en genes para la cadena pesada del neurofilamento (NFH), dinactina, gen de la proteína de unión 1 vesicular y el gen ALSIN, SOD1 es el único locus de susceptibilidad a ELA principal identificado. SOD1 es una enzima principalmente citoplásmica que cataliza la degradación de los iones superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno, que a su vez es degradada por la glutatión peroxidasa o catalasa para formar agua. Varias líneas de evidencia argumentan que la proteína SOD1 mutante es neurotóxica mediante una función adversa adquirida que implica tanto patología oxidativa como agregación de proteínas, con perturbaciones secundarias del metabolismo de glutamato, función mitocondrial, transporte axonal y homeostasis del calcio [3]. Que la SOD1 mutante sea tóxica está fuertemente soportado por la observación de que la expresión transgénica de altos niveles de la proteína SOD1 mutante en ratones produce un fenotipo de enfermedad de las neuronas motoras, con edad de aparición y duración de la enfermedad dependientes del número de copias [4].

Hasta la fecha, algunas intervenciones terapéuticas han alterado el fenotipo de las neuronas motoras en los ratones con ELA transgénicos. Aunque hasta la fecha se han probado más de 100 moléculas pequeñas, algunas han tenido incluso un beneficio marginal (por ejemplo, riluzol [5], celecoxib [6], arimoclomol [7]). Por el contrario, algunas formas de la terapia con proteínas han sido beneficiosas. Así, se produjo mejora en la supervivencia administrando factor de crecimiento similar a la insulina 1 tanto transgénicamente [8] como mediante la administración de AAV2 mediante inyección IM y posterior transporte axonal retrógrado a los nervios motores [9]. Dos otras proteínas que han mostrado promesa terapéutica como agentes neuroprotectores son la eritropoyetina [10] y el factor endotelial vascular (VEGF) [11, 12]. El último es de interés debido a que el análisis genético ha implicado variantes hipomórficas en el gen VEGF como factor de riesgo para ELA [13]. Además, los ratones que carecen de elementos promotores sensibles a hipoxia desarrollan una enfermedad de las neuronas motoras lentamente progresiva [14]. Posteriormente, se documentó que la administración lentiviral de VEGF a la médula espinal de ratones con ELA retrasa la muerte [15]. Dos investigadores independientes han informado de que la infusión de VEGF en el líquido cefalorraquídeo en ratones con ELA [16] y ratas [17] también ralentiza la evolución de la enfermedad.

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 facilitado por el desarrollo de vectores virales capaces de infectar eficazmente neuronas post-mitóticas. El sistema nervioso central está constituido por la médula espinal y el cerebro. La médula espinal conduce la información sensorial desde el sistema nervioso periférico hasta el cerebro y conduce la información motora del cerebro a diversos efectores. Para una revisión de vectores virales para administración génica al sistema nervioso central, véase Davidson et al. (2003) *Nature Rev.* 4:353-364.

Los vectores de virus adeno-asociado (AAV) se consideran útiles para la terapia génica del SNC debido a que tienen un perfil de toxicidad e inmunogenicidad favorable, son capaces de transducir células neuronales, y son capaces de mediar en la 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).

Una propiedad útil de los vectores de AAV se basa en la capacidad de algunos vectores de AAV de experimentar transporte retrógrado y/o anterógrado en células neuronales. Las neuronas en una región del cerebro están interconectadas por axones a regiones del cerebro distales, proporcionándose así un sistema de transporte para la administración de vectores. Por ejemplo, puede administrarse un vector de AAV en o cerca de los terminales de axón de las neuronas. Las neuronas internalizan el vector de AAV y lo transportan de una manera anterógrada a lo largo del axón al cuerpo de la célula. Se ha mostrado que propiedades similares de adenovirus, VHS y pseudo-virus de la rabia administran 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).

Varios grupos han informado que la transducción del cerebro por el serotipo 2 de AAV (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 virales neurotróficos, que incluyen vectores de AAV y lentivirales, también puede producirse en circuitos seleccionados del cerebro de rata normal (Kaspar et al. (2002) *Mol. Ther.* 5:50-56; Kasper et al. (2003) *Science*

301:839-842 y Azzouz et al. (2004) Nature 429:413-417. 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 Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD 1) humana de silenciamiento retardaron la aparición de la enfermedad de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en un modelo de roedor terapéuticamente relevante de ELA.

5 Células transducidas por los vectores de AAV pueden expresar un producto transgénico terapéutico, tal como una enzima o un factor neurotrófico, para mediar en efectos beneficiosos intracelularmente. Estas células también pueden secretar el producto transgénico terapéutico, que puede ser posteriormente captado por células distales donde puede mediar en sus efectos beneficiosos. Este proceso se ha descrito como corrección cruzada (Neufeld et al. (1970) Science 169:141-146). Ruitenberg et al. (2002) Methods 28:182-194 describen la administración de  
10 vectores de AAV a la médula espinal para la expresión en exceso de factores neurotróficos (véase, por ejemplo, el pasaje que abarca las páginas 184 y 185, además de la Figura 2 y la sección 2.2.2 en las páginas 191-192).

Sin embargo, existe una necesidad en la materia de medios para tratar disfunción de la médula espinal que produzca la pérdida de la función motora en pacientes humanos.

15 La presente divulgación proporciona un método de tratamiento de un mamífero con un trastorno de las neuronas motoras por inyección directa en la médula espinal de un vector neurotrófico que codifica una molécula terapéutica. En un caso, el vector neurotrófico es un vector de expresión recombinante que codifica HIF1-alfa donde el vector es un virus adeno-asociado (AAV) recombinante. Se administra por inyección directa en el parénquima de la médula espinal de un mamífero con un trastorno de las neuronas motoras. Así se prolonga la esperanza de vida del mamífero.

20 La presente divulgación también proporciona un método de tratamiento de un paciente humano con un trastorno de las neuronas motoras por inyección directa en la médula espinal de un vector neurotrófico que codifica una molécula terapéutica. En un caso, un vector de AAV recombinante que codifica HIF1-alfa fusionado con NFκB se administra a una pluralidad de sitios en la médula espinal de un paciente humano con un trastorno de las neuronas motoras. Así se prolonga la esperanza de vida del paciente humano.

25 En otro caso, la divulgación proporciona un vector de AAV recombinante que codifica HIF1-alfa para tratar pacientes con un trastorno de las neuronas motoras. El trastorno de las neuronas motoras puede ser ELA. El vector de AAV puede ser un vector AAV2/7 o AAV2/8 recombinante que codifica HIF1-alfa.

La presente invención proporciona:

30 1. Un vector de virus adeno-asociado recombinante de pseudotipo 2/7 o 2/8 que codifica SMN-1, para su uso en un método de tratamiento de un mamífero que tiene atrofia muscular espinal, en el que el vector va a inyectarse en la médula espinal del mamífero.

2. El vector de virus adeno-asociado para su uso según el punto 1, en el que el pseudotipo del vector de virus adeno-asociado es 2/7.

35 3. El vector de virus adeno-asociado para su uso según el punto 1, en el que el pseudotipo del vector de virus adeno-asociado es 2/8.

4. El vector de virus adeno-asociado para su uso según cualquiera uno de los puntos 1 a 3, en el que el vector va a administrarse en una pluralidad de sitios en la médula espinal.

5. El vector de virus adeno-asociado para su uso según cualquier punto precedente, en el que el mamífero está seleccionado del grupo que consiste en un roedor, un murino, un ser humano y un simio.

40 6. El vector de virus adeno-asociado para su uso según el punto 5, en el que el mamífero es un ser humano.

45 7. Uso de un vector de virus adeno-asociado recombinante de pseudotipo 2/7 o 2/8 que codifica SMN-1, para la fabricación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento de un mamífero que tiene atrofia muscular espinal en el que el vector va a inyectarse en la médula espinal del mamífero como se define en uno cualquiera de los puntos 1 a 6.

Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son a modo de ejemplo y explicativas solo y no son restrictivas de la invención como se reivindica.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

50 La **Figura 1** muestra la administración de genoma de vector de médula espinal mediante diferentes modos de administración y pseudotipos de vector.

La **Figura 2** muestra la administración de genoma de vector de cerebro mediante diferentes modos de administración y pseudotipos de vector.

La **Figura 3** muestra el número de genomas de vector que se administraron al músculo tras la inyección intramuscular de los vectores de AAV.

La **Figura 4** muestra la expresión génica de EPO, VEGF y IGF-1 tras la transducción de un cerebro de ratón con un vector de AAV que codifica HIF-1 alfa NF-κB.

5 La **Figura 5** muestra una curva de supervivencia de Kaplan-Meier que demuestra un aumento estadísticamente significativo ( $p = 0,033$ ) en la supervivencia de ratón con ELA tras la administración intraespinal de AAV2/8 Hif1a NF-κB (supervivencia de 133 días en ratones de control frente a supervivencia de 139 día en ratones tratados con Hif-1alfa NF-κB).

10 La **Figura 6** muestra que la hibridación *in situ* de Hif-1alfa NF-κB en las médulas espinales de ratones con ELA tratados con AAV2/8 Hif1aNFκB sugiere que la transducción se observó principalmente en la región lumbar de la médula espinal. Los animales 6817, 6715 y 6389 se trataron con AAV2/8 Hif1aNFκB; el animal 1460 fue un animal de control.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

15 Con el fin de que la presente invención y la divulgación hecha puedan ser más fácilmente entendidas, ciertos términos se definen primero. Definiciones adicionales se exponen en toda la descripción detallada.

20 La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular, microbiología, célula biología y ADN recombinante, que están dentro de la experiencia de la materia. 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 and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, y ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney, ed. (1987)).

25 Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, que incluye mezclas de las mismas.

30 Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" pretende significar que las composiciones y métodos incluyen los elementos citados, pero que no excluyen otros. "Que consiste esencialmente en", cuando se usa para definir composiciones y métodos, debe significar que excluye otros elementos de cualquier significancia esencial para la combinación. Así, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se define en el presente documento no excluiría contaminantes traza del método de aislamiento y de purificación y vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes, y similares. "Que consiste en" debe significar que excluye más de los elementos traza de otros componentes y etapas de método sustanciales para administrar las composiciones de la invención. Realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de la invención.

35 Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, que incluyen intervalos, son aproximaciones que varían (+) o (-) por incrementos de 0,1. Debe entenderse, aunque no siempre se establezca explícitamente, que todas las designaciones numéricas van precedidas por el término "aproximadamente". También debe entenderse, aunque no siempre se establezca explícitamente, que los reactivos descritos en el presente documento son simplemente a modo de ejemplo y que equivalentes de tales se conocen en la técnica.

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

45 Los términos "partículas de genoma (pg)" o "equivalentes de genoma", como se usan en referencia a un título viral, se refieren al número de viriones que contienen el genoma de ADN de AAV recombinante, independientemente de la infectividad o funcionalidad. El número de partículas de genoma en una preparación de vector particular puede medirse mediante procedimientos tal como se describen en los ejemplos en el presente documento, o por ejemplo, en Clark et al. (1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) Mol. Ther., 6:272-278.

50 Los términos "unidad de infección (ui)", "partícula infecciosa" o "unidad de replicación", como se usan en referencia a un título viral, se refieren al número de partículas de vector de AAV recombinante infecciosas y competentes en la replicación como se mide por el ensayo del centro infeccioso, también conocido como ensayo del centro de replicación, como se describe, por ejemplo, en McLaughlin et al. (1988) J. Virol., 62:1963-1973.

55 El término "unidad de transducción (ut)", como se usa en referencia a un título viral, se refiere al número de partículas de vector de AAV recombinante infecciosas que producen la producción de un producto transgénico

funcional como se mide en ensayos funcionales tal como se describen en los ejemplos en el presente 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 (LFU ensayo).

5 Los términos "terapéutico", "cantidad terapéuticamente eficaz" y sus similares se refieren a aquella cantidad de un ARN, ADN o producto de expresión de ADN y/o ARN que produce la prevención o retardo de la aparición o mejora de síntomas en un sujeto o una obtención de un resultado biológico deseado, tal como la corrección de la neuropatología, por ejemplo, patología celular asociada a una enfermedad de las neuronas motoras tal como ELA. El término "corrección terapéutica" se refiere al grado de corrección que produce la prevención o retraso de la aparición o mejora de los síntomas en un sujeto. La cantidad eficaz puede determinarse por métodos empíricos conocidos.

10 Una "composición" también pretende englobar una combinación de agente activo y otro vehículo, por ejemplo, compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o marca detectable) o activa, tal como un adyuvante, diluyente, aglutinante, estabilizador, tampones, sales, disolventes lipófilos, conservante, adyuvante o similares. Los vehículos también incluyen excipientes farmacéuticos y proteínas aditivas, péptidos, aminoácidos, lípidos e hidratos de carbono (por ejemplo, azúcares, que incluyen monosacáridos, di-, tri-, tetra- y oligosacáridos; azúcares derivatizados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcar), que pueden estar presentes individualmente o en combinación, que comprenden solos o en combinación  
15 1-99,99 % en peso o volumen. Excipientes de proteína a modo de ejemplo incluyen albúmina de suero tal como albúmina de suero humano (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína y similares. Componentes de aminoácido/anticuerpo representativos, que también pueden funcionar en una capacidad de tamponamiento, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo, y similares. También están previstos excipientes de hidrato de carbono dentro del alcance de la presente invención, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones, y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y mioinositol.

El término vehículo incluye además un tampón o un agente de ajuste del pH; normalmente, el tampón es una sal preparada a partir de un ácido orgánico o base. 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; tampones Tris, clorhidrato de trometamina, o fosfato. Vehículos adicionales incluyen excipientes/aditivos poliméricos tales como polivinilpirrolidonas, ficoles (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como 2-hidroxiopropil-cuadratura-ciclodextrina), polietilenglicoles, 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 el presente documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" engloba cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar, tales como una solución salina tamponada con disolución de 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 estabilizadores y conservantes y cualquiera de los vehículos anteriormente indicados, con la provisión adicional de que puedan ser aceptables para su uso *in vivo*. Para ejemplos de vehículos, estabilizadores y adyuvantes, véase Martin REMINGTON'S PHARM. SCI., 15th Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) y Williams & Williams, (1995), y en "PHYSICIAN'S DESK REFERENCE", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998),

45 Un "sujeto", "individuo" o "paciente" se usa indistintamente en el presente documento, que se refiere a un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. Mamíferos incluyen, pero no se limitan a, murinos, ratas, simios, seres humanos, animales de granja, animales para deportes y mascotas.

Un "control" es un sujeto alternativo o muestra usada en un experimento para fin de comparación. Un control puede ser "positivo" o "negativo". Por ejemplo, donde el fin del experimento sea determinar una correlación de un nivel de expresión alterado de un gen con un tipo de patología particular (véase ELA, por ejemplo, más adelante), es generalmente preferible usar un control positivo (un sujeto o una muestra de un sujeto, que lleva tal alteración y que presenta 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).

"Diferencialmente expresado", como se aplica a un gen, se refiere a la producción diferencial del ARNm transcrito del gen o el producto de proteína codificado por el gen. Un gen diferencialmente expresado puede expresarse en exceso o expresarse por defecto 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 alternativamente al menos 5 veces, o alternativamente al menos 10 veces más alto o más bajo que el nivel de expresión detectado en una muestra de control. El término "diferencialmente expresada" también se refiere a secuencias de nucleótidos en una célula o tejido que se expresan donde son silenciosas en una célula de control o no se expresan donde se expresan  
60 en una célula de control.

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

Como se usa en el presente documento, el término "mejorar" es sinónimo de "aliviar" y significa reducir o relajar. Por ejemplo, pueden mejorarse los síntomas de una enfermedad o trastorno haciéndolos más soportables.

5 En aspectos donde la transferencia génica está mediada por un vector viral de ADN, tal como un adenovirus (Ad) o virus adeno-asociado (AAV), una construcción de vector se refiere al polinucleótido que comprende el genoma viral o parte del mismo, y un transgén. Los adenovirus (Ads) son un grupo de virus homogéneo relativamente bien caracterizado, que incluye más de 50 serotipos. Véase, por ejemplo, la solicitud PCT internacional N.º WO 95/27071. Los Ads son fáciles de cultivar y no requieren la integración en el genoma de la célula huésped. También se han  
10 construidos vectores derivados de Ad recombinantes, particularmente aquellos que reducen las posibilidades de recombinación y generación de virus no mutantes. Véanse las solicitudes PCT internacionales N.º WO 95/00655 y WO 95/11984. El AAV no mutante tiene alta infectividad y especificidad que se integra en el genoma de la célula huésped. Véase Hermonat y Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470 y Lebkowski, et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996.

15 HIF-1 es una proteína heterodimérica compuesta de dos sub-unidades: (i) una subunidad beta ( $\beta$ ) constitutivamente expresada (compartida por otros factores de transcripción relacionados) y (ii) una subunidad alfa ( $\alpha$ ) (véase, por ejemplo, el documento WO 96/39426 que describe la purificación por afinidad y la clonación molecular de HIF-1 $\alpha$ ) cuya acumulación está regulada por un mecanismo postraduccional de forma que altos niveles de la subunidad alfa puedan solo detectarse durante condiciones hipóxicas. Ambas subunidades son miembros de la familia hélice  
20 básica-bucle-hélice (bHLH)-PAS de factores de transcripción. Estos dominios regulan la unión de ADN y dimerización. Se cree que el dominio de transactivación reside en el extremo C de la proteína.

HIF-1 participa en la regulación de varios genes diana (véase, por ejemplo, Bracken et al., Cell. Mol. Life Sci. 60 (2003) 1376-1393 para una revisión de factores inducibles por hipoxia). Entre los genes diana para HIF-1 están VEGF y eritropoyetina.

25 Para estabilizar la proteína del factor inducible por hipoxia bajo condiciones normóxicas y para proporcionar activación transcripcional constitutiva fuerte, se utiliza una proteína de fusión híbrida/química que consiste en los dominios de unión de ADN y de dimerización de HIF-1 $\alpha$  en el extremo amino, y un dominio de activador transcripcional funcional de una proteína de activador transcripcional en el extremo carboxi. Para crear esta proteína de fusión, el dominio de transactivación endógeno de HIF-1 $\alpha$  está sustituido con un dominio de transactivación  
30 heterólogo. En una realización, el dominio de transactivación es de la proteína VP16 del virus del herpes simple (VHS). Ésta se llama en el presente documento una construcción HIF1 $\alpha$ -VP16 o construcción de fusión. En otra realización, el dominio de transactivación es el dominio de transactivación de NF- $\kappa$ B, que puede ser el dominio de transactivación de NF- $\kappa$ B humano. Ésta se llama en el presente documento una construcción HIF1 $\alpha$ -NF $\kappa$ B o construcción de fusión. Puede usarse cualquier secuencia codificante de HIF1- $\alpha$  de mamífero. El dominio de  
35 transactivación heterólogo también puede ser uno de los factores de transcripción de levadura, tal como GAL4 y GCN4. Las construcciones de HIF-1 $\alpha$  que comprenden secuencias codificantes humanas pueden usarse ventajosamente para la administración a seres humanos.

La hipoxia (un estado en el que la demanda de O<sub>2</sub> del tejido o celular supera el suministro) es un poderoso modulador de la expresión génica. La respuesta fisiológica a la hipoxia implica eritropoyesis potenciada (Jelkman, Physiol. Rev. 72:449-489 (1992)), neovascularización en tejidos isquémicos (White et al., Circ. Res. 71:1490-1500 (1992)) y un cambio a metabolismo basado en la glicólisis (Wolfe et al., Eur. J. Biochem. 135:405-412 (1983)). Estas respuestas adaptativas tanto aumentan la administración de O<sub>2</sub> como activan las vías metabólicas alternativas que no requieren O<sub>2</sub>. Los productos génicos implicados en estos procesos incluyen, por ejemplo: (i) EPO, que codifica eritropoyetina, el regulador primario de la eritropoyesis y así un determinante importante de la capacidad de  
45 transporte de O<sub>2</sub> en sangre (Jiang et al., J. Biol. Chem. 271(30):17771-78 (1996)); (ii) VEGF, que codifica el factor de crecimiento endotelial vascular, un regulador primario de la angiogénesis y así un determinante importante de la perfusión de tejido (Levy et al., J. Biol. Chem. 270:13333 (1995); Liu et al., Circ. Res. 77:638 (1995); Forsythe et al., Mol. Cell. Biol. 16:4604 (1996)); (iii) ALDA, ENO1, LDHA, PFKL y PGK1, que codifican las enzimas glucolíticas aldolasa A, enolasa 1, lactato deshidrogenasa A, fosfofructocinasa L y fosfoglicerato cinasa 1, respectivamente, que  
50 proporcionan una vía metabólica para la generación de ATP en ausencia de O<sub>2</sub> (Firth et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91:6496 (1994); Firth et al., J. Biol. Chem. 270:21021 (1995); Semenza et al., J. Biol. Chem. 269:23757 (1994)); y (iv) HO1 y iNOS, que codifican la oxigenasa 1 de hemo y la óxido nítrico sintasa inducible, que son responsables de la síntesis de las moléculas vasoactivas monóxido de carbono y óxido nítrico, respectivamente (Lee et al., J. Biol. Chem. 272:5375; Melillo et al. J. Exp. Med. 182:1683 (1995)).

55 Un mediador importante de estas respuestas es la interacción de un complejo transcripcional que comprende una proteína del factor inducible por hipoxia de unión a ADN, con su sitio de reconocimiento de ADN relacionado, un elemento sensible a hipoxia (HRE) localizado dentro de los elementos promotores / potenciadores de los genes inducibles de hipoxia. Los HREs consisten en un sitio de unión de la proteína del factor inducible por hipoxia (que contiene la secuencia central 5'-CGTG-3'), además de secuencias de ADN adicionales que se requieren para la  
60 función, que en algunos elementos incluye un segundo sitio de unión.

En un aspecto, la proteína del factor inducible por hipoxia es HIF-1 $\alpha$  (por ejemplo, HIF-1 $\alpha$  humana). En otra realización, el dominio de unión de ADN de HIF-1 $\alpha$  comprende los aminoácidos 1-390 de HIF-1 $\alpha$  humana.

5 En un aspecto, el dominio de proteína capaz de la activación transcripcional no se deriva de una proteína del factor inducible por hipoxia. En otro aspecto, el dominio de proteína capaz de activación transcripcional se deriva de una proteína seleccionada del grupo que consiste en: VP16 del VHS; NF $\kappa$ B; un factor de choque térmico; p53; fos; v-jun; factor EF-C; tat del VIH; E2 del VPH; Ad E1 $\alpha$ ; Sp1; AP1; CTF/NF1; E2F1; HAP1; HAP2; MCM1; PHO2; GAL4; GCN4; y GAL11.

10 En un aspecto, el dominio de proteína capaz de activación transcripcional es sintético. En otro aspecto, la proteína del factor inducible por hipoxia es HIF-1 $\alpha$  (por ejemplo, HIF-1 $\alpha$  humana) y el dominio de proteína capaz de activación transcripcional es un dominio de activación transcripcional de VP16 del VHS. En otro aspecto adicional, la proteína del factor inducible por hipoxia es HIF-1 $\alpha$  (por ejemplo, HIF-1 $\alpha$  humana) y el dominio de proteína capaz de activación transcripcional es un dominio de activación transcripcional de NF $\kappa$ B.

15 En un aspecto, la divulgación es un método de tratamiento de un trastorno neurodegenerativo en un sujeto, que incluye ELA, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína del transactivador quimérico biológicamente activa que comprende el dominio de unión de ADN de una proteína del factor inducible por hipoxia y un dominio de proteína capaz de activación transcripcional.

En un aspecto preferido, la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína del transactivador quimérico biológicamente activa comprende el dominio de unión de ADN de una proteína del factor inducible por hipoxia (HIF) y un dominio de proteína capaz de activación transcripcional.

20 HIF-1 es una proteína heterodimérica compuesta de dos subunidades: (i) una subunidad beta ( $\beta$ ) constitutivamente expresada también conocida como translocador nuclear de hidrocarburos de arilo (ARNT) (que es compartido por otros factores de transcripción relacionados (por ejemplo, el receptor de hidrocarburos de dioxina/arilo (DR/AhR)); y (ii) una subunidad alfa ( $\alpha$ ) (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 $\alpha$ ) cuya acumulación está regulada por un mecanismo post-traducciona de forma que altos niveles de la subunidad alfa puedan solo detectarse durante condiciones hipóxicas. Ambas subunidades son miembros de la familia de hélice básica-bucle-hélice (bHLH)-PAS de los factores de transcripción. Estos dominios regulan la unión de ADN y dimerización. El dominio de transactivación reside en el extremo C de la proteína. La región básica consiste en aproximadamente 15 aminoácidos predominantemente básicos responsables de la unión de ADN directa. Esta región es adyacente a dos hélices  $\alpha$  anfipáticas, separadas por un bucle de longitud variable, que forma la interfase de dimerización primaria entre miembros de la familia (Moore, A.W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:10436-41 (2000)). El dominio PAS, que se llama según las tres primeras proteínas en las que se identificó (Per, ARNT y Sim) engloba 200-300 aminoácidos que contienen dos regiones ampliamente hidrófobas holgadamente conservadas, aproximadamente 50 aminoácidos, designadas PAS A y PAS B.

35 Mientras que HIF-1 $\beta$  (ARNT) se expresa constitutivamente a un alto nivel, la acumulación de HIF-1 en la célula es sensible a la concentración de O<sub>2</sub>, de forma que solo se detectan altos niveles durante la hipoxia. Esta observación ha conducido a un mecanismo propuesto para la activación de genes diana por el cual la concentración de O<sub>2</sub> se detecta por una proteína sensora y mediante un complejo mecanismo de señalización conduce a la estabilización de la subunidad de HIF-1 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  está disponible entonces para el complejo con HIF-1 $\beta$  y se unen selectivamente a sitios HRE en el promotor/potenciador del (de los) gen(es) diana. Se cree que las regiones de la proteína HIF-1 $\alpha$  implicadas en conferir esta respuesta coinciden con regiones implicadas en la transactivación.

40 Se cree que la inducción de la actividad de HIF-1 en respuesta a hipoxia se produce mediante la estabilización de la proteína HIF-1 $\alpha$ . Regiones de HIF-1 $\alpha$  implicadas en esta respuesta se han localizado en el extremo C de la proteína y se solapan con el dominio de transactivación. Por ejemplo, Jiang et al., J. Biol. Chem. 271(30):17771-78 (1996) mostraron que HIF-1 $\alpha$  truncado en el aminoácido 390 perdió la actividad de transactivación, pero retuvo la capacidad para unirse al ADN y mostró altos niveles de proteína bajo condiciones tanto normóxicas como hipóxicas. Este resultado demostró que el dominio de transactivación y la región que confiere inestabilidad con normoxia residen en la mitad del extremo C de la proteína. Pugh et al., J. Biol. Chem. 272(17):11205-14 (1997) han localizado además las regiones implicadas en dos áreas, los aminoácidos 549-582 y 775-826.

45 Un dominio de aproximadamente 200 aminoácidos, denominado el "dominio de degradación dependiente de oxígeno" (ODD), media en la degradación de HIF-1 $\alpha$  (Huang, L., J. Gu, M. Schau, y H. Bunn. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 7987-92). La delección del ODD (HIF-1 $\alpha$   $\Delta$ ODD) produce una HIF-1 $\alpha$  constitutivamente activa independientemente de la concentración de oxígeno (Huang, L., J. Gu, M. Schau, y H. Bunn. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 7987-92; patente de EE.UU. N.º 6.124.131).

55 En un aspecto, la presente divulgación proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas de transactivador quimérico biológicamente activas que comprenden un dominio de la proteína HIF-1 $\alpha$  suficiente para la unión de ADN y dimerización con HIF-1 $\beta$  (ARNT) y un dominio de proteína capaz de activación transcripcional.

En ratones, se producen dos transcritos de HIF-1 $\alpha$  (I.1 y I.2) a partir de diferentes promotores, en lugar de corte y empalme alternativo (Wenger, R.H., et al., *Eur. J. Biochem.* 246:155-65 (1997)). Estos transcritos son ambos eficientemente traducidos independientemente de oxígeno, pero se diferencian en que el transcrito I.1 codifica una proteína que carece de los 12 primeros aminoácidos del extremo amino y se expresa de una manera restringida en tejido, mientras I.2 se expresa ubicuamente y codifica una proteína de longitud completa. A pesar de estas diferencias, no se ha observado especificidad en la unión de ADN o actividad de transactivación (Wenger, R.H., et al., *Blood* 91:3471-80 (1998); Gorlach, A., et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1493:125-134 (2000)). También se han observado varias variantes de corte y empalme de HIF-1 $\alpha$  en seres humanos. Por ejemplo, se ha encontrado que está presente una variante de corte y empalme de HIF-1 $\alpha$  que carece del exón 14 en piel y varias líneas celulares (Gothie, E., et al., *J. Biol. Chem.* 275:6922-27 (2000)). Esto conduce a un desplazamiento del marco y codifica una proteína más corta (736 aminoácidos) que, aunque todavía es hipóxicamente inducible, carece de un TAD del extremo carboxi (C-TAD) y, por tanto, es menos activa que la HIF-1 $\alpha$  no mutante (Gothie, E., et al., *J. Biol. Chem.* 275:6922-27 (2000)). También se ha identificado una isoforma negativa dominante que carece de los exones 11 y 12, que codifica una proteína que tiene 516 aminoácidos de longitud, estable en normoxia y no muestra transactivación (Chun, Y.S., et al., *Biochem. J.* 362:71-79 (2002)). Además, una variante de corte y empalme inducida por cinc que carece del exón 12 también actúa de actividad de HIF inhibidora negativa dominante uniéndose a ARNT y previniendo su acumulación nuclear (Chun, Y.S., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:652-56 (2000)).

Secuencias representativas de HIF-1 $\alpha$  humana incluyen, por ejemplo, acceso de Genbank N.º NM\_001530 (variante 1 de transcrito) y NM\_181054 (variante 2 de transcrito). Secuencias representativas de la subunidad de HIF-1 $\beta$  humana incluyen, por ejemplo, acceso de Genbank N.º NM\_001668 (variante 1 de transcrito de ARNT), NM\_178426 (variante 2 de transcrito de ARNT) y NM\_178427 (variante 3 de transcrito de ARNT).

Se identificó una proteína estrechamente relacionada, HIF-2 $\alpha$  (también llamada PAS endotelial (EPAS), factor relacionado con HIF (HRF) y miembro de la superfamilia 2 de PAS (MOP2)) poco después de clonarse HIF-1 $\alpha$  (Tian, H., et al., *Genes Dev.* 11:72-82 (1997); Ema, M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4273-78 (1997); Flamme, I., et al., *Mech. Dev.* 63:51-60 (1997); Hogenesch, J.B., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5474-79 (1998)). HIF-2 $\alpha$  comparte el 48 % de identidad de aminoácidos con HIF-1 $\alpha$  y menor similitud con otros miembros de la familia del dominio bHLH/PAS de factores de transcripción (secuencias humanas de HIF-2 $\alpha$  representativas son los accesos de GenBank N.º NM\_001430 y U81984; una secuencia de ratón de HIF-2 $\alpha$  representativa es el acceso de GenBank N.º U81983). Al igual que HIF-1 $\alpha$ , se encontró que HIF-2 $\alpha$  se heterodimerizaba con ARNT y se unía a HREs (Tian, H., et al., *Genes Dev.* 11:72-82 (1997); Ema, M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4273-78 (1997)). El análisis de deleciones ha demostrado que tanto HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  comparten una arquitectura de dominio funcional común. Específicamente, además de los dominios bHLH y PAS del extremo amino, HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  poseen dos dominios de transactivación (TADs) separados por una región llamada el dominio inhibidor (ID), que es responsable de la represión normóxica de la actividad de TAD. El solapamiento de TAD del extremo amino (N-TAD) es un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD), que confiere estabilidad normóxica a las proteínas HIF $\alpha$  (Bracken, C.P., et al., *CMLS. Cell. Mol. Life Sci.* 60:1376-93 (2003)).

HIF-2 $\alpha$  humana y murina comparten una amplia de identidad de secuencias de aminoácidos primarias con HIF-1 $\alpha$  (48 %). La conservación de secuencias entre las dos proteínas es la mayor en las regiones bHLH (85 %), PAS-A (68 %) y PAS-B (73 %). Una segunda región de identidad de secuencia se produce en el extremo C de las proteínas HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ . Se ha mostrado que esta región conservada en mHIF-1 $\alpha$  contiene un dominio de respuesta a hipoxia (Li et al., *J. Biol. Chem.* 271(35):21262-67 (1996)). El alto grado de similitud de secuencias entre HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  sugiere que comparten función (funciones) fisiológica(s) común (comunes). Las condiciones hipóxicas estimulan la capacidad de HIF-1 $\alpha$  para transactivar genes diana que contienen la secuencia central de HRE. La actividad de HIF-2 $\alpha$  también se potencia en células cultivadas bajo condiciones hipóxicas.

Patrones de expresión de ARN han revelado que tanto HIF-1 $\alpha$  como HIF-2 $\alpha$  se expresan ampliamente de forma ubicua en tejidos humanos y de ratón de una manera independiente de oxígeno (Tian, H., et al., *Genes Dev.* 11:72-82 (1997); Ema, M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4273-78 (1997); Flamme, I., et al., *Mech. Dev.* 63:51-60 (1997); Wenger, R.H., et al., *Kidney Int.* 51:560-63 (1997); Wiesener, M.S., et al., *Blood* 92:2260-68 (1998)). El análisis del patrón de expresión específico del tipo de células ha revelado, sin embargo, que a diferencia de HIF-1 $\alpha$  ubicua, el ARNm de HIF-2 $\alpha$  se expresa predominantemente en tipos específicos de células, tales como fibroblastos endoteliales, epiteliales, neuronales y células de macrófago (Bracken, C.P., et al., *CMLS. Cell. Mol. Life Sci.* 60:1376-93 (2003)).

También se ha descubierto un tercer gen de HIF $\alpha$  y se ha llamado HIF-3  $\alpha$ . Al igual que HIF-1 $\alpha$  y HIF-2  $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  es expresado por una variedad de tejidos, se dimeriza con ARNT, se une a secuencias de ADN de HRE y regula por incremento la expresión indicadora en una manera inducible por hipoxia y dependiente de ARNT (Gu, Y.Z., et al., *Gene Expr.* 7:205-13(1998)). Se ha identificado una variante de corte y empalme de HIF-3  $\alpha$ , llamada PAS inhibidora (IPAS). IPAS parece carecer de actividad de transactivación endógena, pero actúa de regulador negativo dominante de HIF, interaccionando con la región del extremo amino de HIF-1 $\alpha$  y previniendo la unión de ADN. Secuencias representativas de HIF-3 $\alpha$  humana son los accesos de Genbank N.º NM\_152794 (variante 1 de transcrito de HIF-3 $\alpha$ ), NM\_152794 (variante 2 de transcrito de HIF-3 $\alpha$ ) y NM\_022462 (variante 3 de transcrito de HIF-3 $\alpha$ ).

Como se describe en el presente documento y es evidente para aquellos expertos en la materia, pueden usarse secuencias de HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y/o HIF-3 $\alpha$ , que incluyen secuencias de cualquier variante de corte y empalme conocida o descubierta, en los métodos de la divulgación.

5 Se ha descubierto mucho sobre la regulación de HIF- $\alpha$ . La renovación normóxica de HIF- $\alpha$  es muy rápida y produce esencialmente proteína HIF- $\alpha$  no detectable bajo condiciones normóxicas (Wang, G.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:5510-14 (1995); Yu, A.Y., et al., Am. J. Physiol. 275:L818-L826 (1998); Huang, L.E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7987-92 (1998)). Esta estabilidad normóxica está controlada por el ODDD central de 200 aminoácidos que se solapa con N-TAD (Huang, L.E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7987-92 (1998)). La rápida acumulación de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  que se produce en hipoxia está mediada por la elevada estabilidad de las proteínas. A 10 diferencia, la tensión del oxígeno no tiene un efecto importante sobre la transcripción o traducción de HIF- $\alpha$  (Wenger, R.H., et al., Kidney Int. 51:560-63 (1997); Huang, L.E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7987-92 (1998)); Huang, L.E., et al., J. Biol. Chem. 271:32253-59 (1996); Powell, J.D., et al., Biol. Reprod. 67:995-1002 (2002); Kallio, P.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5667-72 (1997)). Similarmente, el oxígeno no afecta significativamente los niveles de ARNm o de proteína de ARNT, que se expresan constitutivamente (Huang, L.E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7987-92 (1998)); Huang, L.E., et al., J. Biol. Chem. 271:32253-59 (1996); Kallio, P.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5667-72 (1997)).

La inestabilidad normóxica de HIF- $\alpha$  está mediada por la poliubiquitilación y posterior degradación por el proteasoma. Esto se ha demostrado usando inhibidores del proteasoma o mutación de la enzima activadora de la ubiquitina E1 (Huang, L.E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7987-92 (1998); Kallio, P.J., et al., J. Biol. Chem. 274:6519-25 (1999)). Así, HIF- $\alpha$  está poliubiquitilada bajo normoxia disminuyendo el nivel de ubiquitilación en hipoxia (Huang, L.E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7987-92 (1998); Kallio, P.J., et al., J. Biol. Chem. 274:6519-25 (1999)); Sutter, C.H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:4748-53 (2000)). Además, se ha mostrado que HIF-1 $\alpha$  interacciona físicamente con la subunidad del proteasoma 20S PSMA7 (Cho, S., et al., FEBS Lett. 498:62-66 (2001)).

25 La proteína supresora de tumores de von-Hippel-Lindau (VHL) es un componente de un complejo de ubiquitina E3 - proteína ligasa que contiene elonginas B y C, Cul2 y Rbx1, y es esta la capacidad por la que VHL media en la degradación del proteasoma de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  (Lisztswan, J., et al., Genes Dev. 13:1822-33 (1999)). Se proporciona soporte por el hallazgo de que bajo condiciones normóxicas, HIF-1 $\alpha$  es estable en células deficientes en VHL, sin embargo, la estabilidad de las proteínas normóxicas se restaura tras la transfección de VHL (Maxwell, P.H., et al., Nature 399:271-75 (1999); Cockman, M.E., et al., J. Biol. Chem. 275:25733-741 (2000)). VHL es capaz de ejercer este efecto uniéndose a los aminoácidos 517-571 o 380-417 de HIF-1 $\alpha$  en normoxia (aminoácidos 517-534 y 383-418 en HIF-2 $\alpha$ ) mediante su dominio  $\beta$ , mientras que el dominio  $\alpha$  se une a elonginas. La ubiquitina se transfiere entonces a residuos de HIF, marcando la proteína para la degradación del proteasoma (Cockman, M.E., et al., J. Biol. Chem. 275:25733-741 (2000); Ohh, M., et al., Nat. Cell Biol. 2:423-27 (2000)); Tanimoto, K., et al., EMBO J. 19:4298-4309 (2000); Masson, N., et al., EMBO J. 20:5197-5206 (2001); Srinivas, V., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 260:557-61 (1999)).

Se ha descubierto que la unión de VHL a HIF en normoxia, y así el principal mecanismo por el que se confiere la inestabilidad de proteínas HIF, está mediada por la irreversible hidroxilación de dos restos de prolina (P402 y P564 en HIF-1 $\alpha$ , P405 y P530 en HIF-2 $\alpha$ ) (Jaakkola, P., et al., Science 292:468-72 (2001); Ivan, M., et al., Science 292:464-68 (2001); Yu, F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9630-35 (2001)); Chan, D.A., et al., J. Biol. Chem. 277:40112-17 (2002)). Estos restos están hidroxilados solo en normoxia, permitiendo la unión de alta afinidad de VHL a HIF (Min, J.H., et al., Science 296:1886-89 (2002)). La identificación de egl9, una prolil-hidroxilasa de HIF en *Caenorhabditis elegans*, permitió la clonación de tres de los homólogos de mamífero designados dominio de prolil-hidroxilasa que contiene (PHDs) 1, 2 y 3, o prolil-hidroxilasas de HIF (HPHs 3, 2 y 1, respectivamente (Bruick, R.K., et al., Science 294:1337-40 (2001); Epstein, A.C., et al., Cell 107:43-54 (2001); Ivan, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:13459-464 (2002); Lieb, M.E., et al., Biochem. Cell. Biol. 80:421-426 (2002); Huang, J., et al., J. Biol. Chem. 277:39792-800 (2002)). También se ha identificado un cuarto PHD/HPH ampliamente expresado (Oehme, F., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 296(2):343-49 (2002)).

Las PHD/HPHs son enzimas dependientes de 2-oxoglutarato que requieren oxígeno (O<sub>2</sub>) para la hidroxilación. 50 Contienen hierro unido a dos restos de histidina y uno de ácido aspártico que, cuando se mantienen en su estado ferroso por ascorbato, se unen a dioxígeno. Un oxígeno se transfiere al resto de prolina diana de HIF; el segundo reacciona con 2-oxoglutarato para producir succinato y dióxido de carbono. Así, la ausencia de oxígeno conduce a no actividad enzimática, no modificación de restos de prolina de HIF y no unión VHL/HIF, produciendo proteína HIF- $\alpha$  estabilizada.

Por tanto, es probable que PHD/HPHs funcione como sensor de oxígeno directo en células que modulan directamente HIF en respuesta a concentración de oxígeno fisiológico (Bracken, C.P., et al., CMLS. Cell. Mol. Life Sci. 60:1376-93 (2003)).

En un aspecto, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las proteínas del transactivador quimérico comprenden un dominio de una proteína no de mamífero del factor inducible por hipoxia. Como se reconocerá por el experto, la respuesta adaptativa a hipoxia es probable que haya sido altamente conservada durante toda la 60

evolución. Por consiguiente, se esperaría que las proteínas del factor inducible por hipoxia se produjeran en una amplia variedad de especies que incluyen vertebrados no de mamífero y no vertebrados, tales como insectos. Véase, por ejemplo, Bacon et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 249:811-816 (1998), que informa de la similitud funcional entre la proteína hélice básica-bucle-hélice-PAS Sima de *Drosophila* y la proteína HIF-1 $\alpha$  de mamífero.

- 5 Pueden obtenerse secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos para proteínas del factor inducible por hipoxia no de mamífero por el experto mediante una variedad de técnicas, por ejemplo, por hibridación cruzada o amplificación usando toda o una porción de las secuencias citadas en el presente documento. Una vez se ha determinado la secuencia que codifica una proteína del factor inducible por hipoxia candidata, la localización de porciones de la proteína suficientes para unirse a HREs y dimerizarse con HIF-1 $\beta$  pueden determinarse usando, por ejemplo, los mismos tipos de técnicas usados para determinar la localización de aquellos dominios dentro de la proteína HIF-1 $\alpha$  humana. Dominios relevantes de proteínas del factor inducible por hipoxia no de mamífero útiles en las composiciones y métodos de la presente divulgación también pueden producirse sintéticamente o por manipulaciones dirigidas al sitio del ADN que codifica proteínas del factor inducible por hipoxia de mamífero conocidas. También se espera que los motivos de secuencia en común entre diversas proteínas del factor inducible por hipoxia de mamífero y no de mamífero sugieran secuencias consenso que, aunque quizás no se producen naturalmente en cualquier especie, sin embargo producirían dominios útiles en los métodos y composiciones de la presente divulgación. Todo lo que se requiere con el fin de sustituir tales dominios de proteínas del factor inducible por hipoxia no de mamífero para los dominios de la proteína HIF-1 $\alpha$  humana ejemplificados en el presente documento es que sean capaces de unirse a HREs y dimerizarse con HIF-1 $\beta$  (ARNT).
- 10
- 15
- 20 Por ejemplo, aunque la subunidad de HIF-1 $\alpha$  es inestable durante condiciones normóxicas, la expresión en exceso de esta subunidad en células cultivadas bajo niveles de oxígeno normales es capaz de inducir la expresión de genes normalmente inducidos por hipoxia. Una estrategia alternativa sería modificar la subunidad de HIF-1 $\alpha$  de forma que ya no se desestabilizara por condiciones normóxicas y, por tanto, fuera más potente bajo un intervalo de condiciones de oxígeno.
- 25 La sustitución de la región del extremo C (o de transactivación) de la proteína del factor inducible por hipoxia con un dominio de transactivación fuerte de una proteína del activador transcripcional tal como, por ejemplo, VP16 del virus del herpes simple (VHS), NF $\kappa$ B o los factores de transcripción de levadura GAL4 y GCN4, se diseña para estabilizar la proteína bajo condiciones normóxicas y proporcionar activación transcripcional constitutiva fuerte.
- 30 Para estabilizar la proteína del factor inducible por hipoxia bajo condiciones normóxicas y para proporcionar activación transcripcional constitutiva fuerte, se construyó una proteína de fusión híbrida/quimérica que consistía en los dominios de unión de ADN y de dimerización de HIF-1 $\alpha$  y el dominio de transactivación de la proteína VP16 del virus del herpes simple (VHS). La administración de este híbrido/quimera con las células de un sujeto mediante terapia génica induce la expresión de genes normalmente regulados por incremento en respuesta a hipoxia (es decir, VEGF y similares). Se ha mostrado que una HIF-1 $\alpha$  híbrida constitutivamente estable es eficaz para tratar pacientes isquémicos (patentes de EE.UU. N.º 6.432.927 y 7.053.062).
- 35 Como se describe y se ejemplifica en el presente documento, la administración de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína del transactivador quimérico biológicamente activa que comprende el dominio de unión de ADN de una proteína del factor inducible por hipoxia (por ejemplo, HIF-1 $\alpha$ ) y un dominio de proteína capaz de activación transcripcional (por ejemplo, un dominio de activación transcripcional de VP16 del VHS, un dominio de activación transcripcional de NF $\kappa$ B) pueden tratar trastornos motores neurodegenerativos en un paciente en necesidad de la misma. En un aspecto, el dominio de unión de ADN es un dominio de unión de ADN de HIF-1 $\alpha$  y el dominio de proteína capaz de activación transcripcional es un dominio de activación transcripcional de VP16 del VHS. Una secuencia de ácidos nucleicos de ADNc representativa de una construcción de HIF1 $\alpha$ /VP16 tal, que contiene el dominio de unión de ADN y el dominio de dimerización de HIF-1 $\beta$  de HIF-1 $\alpha$  y el dominio de activación transcripcional de VP16 del VHS, es la siguiente:
- 40
- 45

ATGGAGGGCGCCGGCGGCGCGAACGACAAGAAAAAGATAAGTTCT  
 GAACGTCGAAAAGAAAAGTCTCGAGATGCAGCCAGATCTCGGCCGA  
 AGTAAAGAATCTGAAGTTTTTTATGAGCTTGCTCATCAGTTGCCACT  
 TCCACATAATGTGAGTTCGCATCTTGATAAGGCCTCTGTGATGAGG  
 CTTACCATCAGCTATTTGCGTGTGAGGAACTTCTGGATGCTGGTG  
 ATTTGGATATTGAAGATGACATGAAAGCACAGATGAATTGCTTTTA  
 TTTGAAAGCCTTGGATGGTTTTTGTATGGTTCTCACAGATGATGGTG  
 ACATGATTTACATTTCTGATAATGTGAACAAATACATGGGATTAAC  
 TCAGTTTGAACAACTGGACACAGTGTGTTTGATTTTACTCATCCAT  
 GTGACCATGAGGAAATGAGAGAAATGCTTACACACAGAAATGGCC  
 TTGTGAAAAAGGGTAAAGAACAAAACACACAGCGAAGCTTTTTTCT  
 CAGAATGAAGTGTACCCTAACTAGCCGAGGAAGAACTATGAACAT  
 AAAGTCTGCAACATGGAAGGTATTGCACTGCACAGGCCACATTCAC  
 GTATATGATACCAACAGTAACCAACCTCAGTGTGGGTATAAGAAAC  
 CACCTATGACCTGCTTGGTGTGATTTGTGAACCCATTCTCAACCA  
 TCAAATATTGAAATTCCTTTAGATAGCAAGACTTTCCTCAGTCGAC  
 ACAGCCTGGATATGAAATTTTCTTATTGTGATGAAAGAATTACCGA  
 ATTGATGGGATATGAGCCAGAAGAACTTTTAGGCCGCTCAATTTAT  
 GAATATTATCATGCTTTGGACTCTGATCATCTGACCAAAACTCATC  
 ATGATATGTTTACTAAAGGACAAGTCACCACAGGACAGTACAGGA  
 TGCTTGCCAAAAGAGGTGGATATGTCTGGGTGAAACTCAAGCAAC  
 TGTCACATATAACACCAAGAATTCTCAACCACAGTGCATTGTATGT  
 GTGAATTACGTTGTGAGTGGTATTATTACAGCACGACTTGATTTTCTC  
 CCTTCAACAAACAGAATGTGTCCTTAAACCGGTTGAATCTTCAGAT  
 ATGAAAATGACTCAGCTATTCACCAAAGTTGAATCAGAAGATACA  
 AGTAGCCTCTTTGACAACTTAAGCCGGAATCCCGGGGATCTGGG  
 CCCCCCGACCGATGTCAGCCTGGGGGACGAGCTCCACTTAGACGG  
 CGAGGACGTGGCGATGGCGCATGCCGACGCGCTAGACGATTTCGA  
 TCTGGACATGTTGGGGGACGGGGATTCCCCGGGGCCGGGATTTACC  
 CCCCACGACTCCGCCCCCTACGGCGCTCTGGATATGGCCGACTTCG  
 AGTTTGAGCAGATGTTTACCGATGCCCTTGAATTGACGAGTACGG  
 TGGGTAG (SEQ ID NO: 1).

En esta secuencia de ácidos nucleicos representativa, la secuencia de los dominios de unión de ADN de HIF-1 $\alpha$  y de dimerización de HIF-1 $\beta$  es la siguiente:

ATGGAGGGCGCCGGCGGCGCAACGACAAGAAAAAGATAAGTTCT  
GAACGTCGAAAAGAAAAGTCTCGAGATGCAGCCAGATCTCGGCGA  
AGTAAAGAATCTGAAGTTTTTTATGAGCTTGCTCATCAGTTGCCACT  
TCCACATAATGTGAGTTCGCATCTTGATAAGGCCTCTGTGATGAGG  
CTTACCATCAGCTATTTGCGTGTGAGGAACTTCTGGATGCTGGTG  
ATTTGGATATTGAAGATGACATGAAAGCACAGATGAATTGCTTTTA  
TTTGAAAGCCTTGGATGGTTTTTGTATGGTTCTCACAGATGATGGTG  
ACATGATTTACATTTCTGATAATGTGAACAAATACATGGGATTAAC  
TCAGTTTGAACAACTGGACACAGTGTGTTTTGATTTACTCATCCAT  
GTGACCATGAGGAAATGAGAGAAATGCTTACACACAGAAATGGCC  
TTGTGAAAAGGGTAAAGAACAAAACACACAGCGAAGCTTTTTTCT  
CAGAATGAAGTGTACCCTAACTAGCCGAGGAAGAACTATGAACAT  
AAAGTCTGCAACATGGAAGGTATTGCACTGCACAGGCCACATTCAC  
GTATATGATACCAACAGTAACCAACCTCAGTGTGGGTATAAGAAAC  
CACCTATGACCTGCTTGGTGCTGATTTGTGAACCCATTCTCACCCA  
TCAAATATTGAAATTCTTTAGATAGCAAGACTTCTCCTCAGTCGAC  
ACAGCCTGGATATGAAATTTCTTATTGTGATGAAAGAATTACCGA  
ATTGATGGGATATGAGCCAGAAGAACTTTTAGGCCGCTCAATTTAT  
GAATATTATCATGCTTTGGACTCTGATCATCTGACCAAACTCATC  
ATGATATGTTTACTAAAGGACAAGTCACCACAGGACAGTACAGGA  
TGCTTGCCAAAAGAGGTGGATATGTCTGGGTGAAACTCAAGCAAC  
TGTCACATATAACACCAAGAATTCTCAACCACAGTGCATTGTATGT  
GTGAATTACGTTGTGAGTGGTATTATTCAGCACGACTTGATTTTCTC  
CCTTCAACAAACAGAATGTGTCCTTAAACCGGTTGAATCTTCAGAT  
ATGAAAATGACTCAGCTATTCACCAAAGTTGAATCAGAAGATACA  
AGTAGCCTCTTTGACAAACTTAAG (SEQ ID NO: 2).

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

CCGGAATTCCTCCGGGATCTGGGCCCCCCCGACCGATGTCAGCCTGG  
 GGGACGAGCTCCACTTAGACGGCGAGGACGTGGCGATGGCGCATG  
 CCGACGCGCTAGACGATTTTCGATCTGGACATGTTGGGGGACGGGG  
 ATTCCCCGGGGCCGGGATTTACCCCCACGACTCCGCCCCCTACGG  
 CGCTCTGGATATGGCCGACTTCGAGTTTGAGCAGA  
 CCGGAATTCCTCCGGGATCTGGGCCCCCCCGACCGATGTCAGCCTGG  
 GGGACGAGCTCCACTTAGACGGCGAGGACGTGGCGATGGCGCATG  
 CCGACGCGCTAGACGATTTTCGATCTGGACATGTTGGGGGACGGGG  
 ATTCCCCGGGGCCGGGATTTACCCCCACGACTCCGCCCCCTACGG  
 CGCTCTGGATATGGCCGACTTCGAGTTTGAGCAGATGTTTACCGAT  
 GCCCTTGAATTGACGAGTACGGTGGGTAG (SEQ ID NO: 3).

La divulgación engloba otros ácidos nucleicos que codifican proteínas del transactivador quimérico biológicamente activas, por ejemplo, una proteína que comprende los dominios de unión de ADN y de dimerización de HIF-1 $\alpha$  y el dominio de transactivación de una proteína NF $\kappa$ B (por ejemplo, una proteína NF $\kappa$ B humana).

- 5 Los factores de transcripción eucariotas están frecuentemente compuestos de dominios de unión de ADN y del activador transcripcional separados e independientes (Mitchell y Tjian, *Science* 245:371-378 (1989)). La independencia de los dominios ha permitido la creación de proteínas de fusión funcionales que consisten en los dominios de unión de ADN y de activación de proteínas heterólogas. Se construyeron proteínas reguladoras eucariotas quiméricas, que consisten en la proteína de unión de ADN lexA y el dominio de activación del factor de transcripción de levadura, GAL4, por Brent y Ptashne (*Nature* 312:612-615 (1985)). El uso de proteínas de fusión ha identificado varios tipos de dominios de proteína que actúan de activadores transcripcionales. Estos dominios tienen poca similitud de aminoácidos, pero frecuentemente se caracterizan por ser altamente ácidos (como en el caso de GAL4 y GNC4), ricos en glutamina (como en el caso de Sp1), o ricos en prolina (como en el caso de NF1, Ma y Ptashne, *Cell* 51:113-119 (1987); Courey y Tjian (1988); Mermod et al., *Cell* 58:741-753 (1989)).

- 15 Uno de los dominios del activador más eficientes está contenido en los 100 aminoácidos del extremo carboxilo de la proteína 16 (VP16) del virus del herpes simple (VHS) (Sadowski et al., *Nature* 335:563-564 (1988); Triezenberg et al., *Genes & Dev.* 2:718-729 (1988)). VP16, también conocida como Vmw65 o factor trans-inductor del gen alfa, es una proteína estructural del VHS que activa la transcripción de los promotores tempranos inmediatos del virus, que incluyen aquellos para ICPO e ICP4 (Campbell et al., *J. Mol. Biol.* 180:1-19 (1984); Kristie y Roizman, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 81:4065-4069 (1984); Pellet et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 82:5870-5874 (1985)). Aunque VP16 activa específicamente promotores que contienen el llamado elemento TAATGARAT, la especificidad se crea por una proteína(s) de unión de ADN celular(es) que es (son) complejada(s) con el (los) dominios(s) del extremo amino de VP16 (McKnight et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 84:7061-7065 (1987); Preston et al., *Cell* 52:425-434 (1988)).

- 25 La presente divulgación proporciona ácidos nucleicos que codifican proteínas de transactivación híbridas/quiméricas que comprenden una porción funcional de una proteína de unión de ADN y una porción funcional de una proteína del activador transcripcional. Tales proteínas de transactivación híbridas/quiméricas ofrecen una variedad de ventajas, que incluyen la activación específica de la expresión de los genes inducibles por hipoxia que contienen elementos sensibles a la hipoxia (HREs), logrando así excepcionalmente altos niveles de expresión génica. Ácidos nucleicos que codifican tales proteínas de transactivación híbridas/quiméricas son capaces de funcionar en células de vertebrado y pueden codificar proteínas de transactivación transcripcional que existen de forma natural o dominios de proteínas (por ejemplo, proteínas de transactivación transcripcional que existen de forma natural o dominios de células eucariotas que incluyen células de vertebrado), proteínas de transactivación virales o dominios o cualquier secuencia de aminoácidos sintética que sea capaz de estimular la transcripción de un promotor de vertebrado. Ejemplos de tales proteínas de transactivación incluyen, pero no se limitan a, el factor de transcripción específico linfocitoide identificado por Muller et al. (*Nature* 336:544-551 (1988)), la proteína fos (Lucibello et al., *Oncogene* 3:43-52 (1988)); proteína v-jun (Bos et al., *Cell* 52:705-712 (1988)); factor EF-C (Ostapchuk et al., *Mol. Cell. Biol.* 9:2787-2797 (1989)); proteína tat del VIH-1 (Arya et al., *Science* 229:69-73 (1985)), la proteína E2 del virus del papiloma (Lambert et al., *J. Virol.* 63:3151-3154 (1989)), la proteína E1A del adenovirus (revisada en Flint y Shenk, *Ann. Rev. Genet.* (1989), factores de choque térmico (HSF1 y HSF2) (Rabindran, et al., *PNAS* 88:6906-6910 (1991)); la proteína p53 (Levine, *Cell* 88:323-331 (1997), Ko y Prives, *Genes Dev.* 10:1054-1072 (1996)); Sp1 (Kadonaga, et al. *Cell* 51:1079-1090 (1987)); AP1 (Lee, et al., *Nature* 325:368-372 (1987)); CTF/NF1 (Mermod, et al., *Cell* 58: 741-753 (1989)), E2F1 (Neuman, et al., *Gene* 173: 163-169 (1996)); HAP1 (Pfeifer, et al., *Cell* 56: 291-301 (1989)); HAP2 (Pinkham, et al., *Mol. Cell. Biol.* 7:578-585 (1987)); MCM1 (Passmore, et al., *J. Mol. Biol.* 204:593-606 (1988)); PHO2 (Sengstag, y Hinnen, *NAR* 15:233-246 (1987)); y GAL11 (Suzuki et al., *Mol. Cell. Biol.* 8:4991-4999 (1988)). En aspectos particulares de la divulgación, la proteína de transactivación es VP16 del virus del herpes simple (Sadowski

et al., *Nature* 335:563-564 (1988); Triezenberg et al., *Genes y Dev.* 2:718-729 (1988)), NF.kappa.B ((Schmitz y Baeuerle, *EMBO J.* 10:3805-3817 (1991); Schmitz, et al., *J. Biol. Chem.* 269:25613-25620 (1994); y Schmitz, et al., *J. Biol. Chem.* 270:15576-15584 (1995)), y los activadores de levadura GAL4 y GCN4.

5 Por supuesto, el experto entenderá que los dominios de activación transcripcional útiles en las composiciones y métodos de la presente invención también pueden ser sintéticos, es decir, basados en una secuencia que no está contenida dentro de una proteína que existe de forma natural conocida. Véase, por ejemplo, Pollock y Gilman, *PNAS* 94:13388-13389 (1997), que enseña que la activación transcripcional es un proceso inherentemente flexible en el que hay poco requisito, si lo hay, de estructuras específicas o contactos de proteína estereoespecíficos. También revisa la variedad de diferentes moléculas que pueden servir de activadores transcripcionales, que incluyen motivos de péptido cortos (tan pequeños como de ocho aminoácidos), hélices anfipáticas simples e incluso dominios mutagenizados de proteínas sin relacionar con activación transcripcional.

10 Según la divulgación, se combinan secuencias de ácidos nucleicos que codifican un dominio de unión de ADN y un dominio de transactivación para preservar las propiedades de unión y de transactivación respectivas de cada uno de los dominios. En diversos aspectos de la divulgación, el ácido nucleico que codifica la proteína de transactivación, o una porción de la misma capaz de activar la transcripción, puede insertarse en ácido nucleico en un locus que no altere completamente la función del dominio de unión de ADN codificado. Se conocen regiones de proteínas del factor inducible por hipoxia que no son requeridas para las funciones de unión de ADN y de dimerización y regiones de proteínas que no son requeridas para la función de transactivación transcripcional y/o pueden identificarse por métodos conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, análisis de mutaciones mapeadas, además de la identificación de regiones que carecen de mutaciones mapeadas, que son supuestamente menos sensibles a la mutación que otras porciones más funcionalmente relevantes de la molécula. Pueden producirse construcciones recombinantes apropiadas usando técnicas convencionales en biología molecular, que incluyen aquellas expuestas en Maniatis (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory (1989))).

25 La construcción de ADN recombinante que codifica la proteína del transactivador quimérico puede ponerse bajo el control de (es decir, operativamente unida a) un promotor adecuado y/u otra secuencia de control de la expresión. Puede ser deseable que la proteína del transactivador se ponga bajo el control de una secuencia promotora constitutivamente activa, aunque la proteína del transactivador también puede ponerse bajo el control de un promotor inducible, tal como el promotor de la metalotionina (Brinster et al., *Nature* 296:39-42 (1982)) o un promotor específico de tejido. Secuencias promotoras que pueden usarse según la divulgación incluyen, pero no se limitan a, la región del promotor temprano del SV40 (Benoist y Chambon, *Nature* 290:304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición terminal larga de virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, et al., *Cell* 22:787-797 (1980)), el promotor de timidina cinasa del herpes (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 78:144-1445 (1981)), el promotor/potenciador temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV) (Boshart et al., *Cell* 41:521-530 (1985)).

En un aspecto de la divulgación, la proteína del transactivador quimérico está codificada por pcDNA3/HIF/VP16/Af12. En otro aspecto, la proteína del transactivador quimérico está codificada por pcDNA3/HIF/VP16/RI, que es idéntico a pcDNA3/HIF/VP16/Af12 excepto que el segmento de VP16 se inserta después del codón 530 de la región codificante de HIF-1 $\alpha$ .

40 Según la divulgación, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas del transactivador híbridas/quiméricas pueden utilizarse para regular específicamente la expresión de genes que contienen elementos sensibles a la hipoxia (HREs). Estos HREs se corresponden con una secuencia de ácidos nucleicos reconocida y unida por la proteína de unión de ADN usada como esqueleto de la proteína del transactivador quimérico.

45 En general, los ácidos nucleicos que codifican proteínas del transactivador quimérico pueden usarse para controlar selectivamente la expresión de genes de interés. Por ejemplo, y no a modo de limitación, las proteínas del transactivador quimérico pueden ponerse bajo el control de un promotor constitutivo y pueden usarse para aumentar constitutivamente la expresión de un gen de interés asociado a elementos sensibles a la hipoxia (HREs), por ejemplo, cuando se desea producir un producto génico particular en cantidad en un cultivo celular o en un animal transgénico. Alternativamente, la proteína del transactivador puede ponerse bajo el control de un promotor específico de tejido de manera que el gen de interés se exprese en un tejido particular. En aspectos alternativos de la divulgación, la función del transactivador quimérico es inducible, de manera que la expresión de un gen de interés, mediante elementos sensibles a la hipoxia (HREs), puede aumentarse o disminuirse selectivamente. Para revisiones de la expresión transgénica condicional e inducible, véase Fishman, *Circ. Res.*, 82:837-844 (1998) y Fishman, *Trends Cardiovasc. Med.*, 5:211-217 (1995).

55 Para información adicional sobre las construcciones de HIF1-alfa véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º de serie 6.432.947.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una afección neurodegenerativa progresiva que implica la pérdida de grandes neuronas motoras en el cerebro y la médula espinal. Se caracteriza por debilidad progresiva, atrofia y espasticidad, que conducen a parálisis y fallo respiratorio en el plazo de cinco años desde la aparición. La ELA

familiar representa el 10 % de todos los casos de ELA; aproximadamente el 25 % de estos casos son debidos a mutaciones en el gen Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1) [1]. Hasta la fecha se han identificado 109 mutaciones diferentes en el gen SOD1; éstas engloban los cinco exones [2]. Además de mutaciones muy raras en genes para la cadena pesada del neurofilamento (NFH), dinactina, gen de la proteína de unión 1 vesicular y el gen ALSIN, SOD1 es el único locus de susceptibilidad a ELA principal identificado. SOD1 es una enzima principalmente citoplásmica que cataliza la degradación de los iones superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno, que a su vez es degradada por la glutatión peroxidasa o catalasa para formar agua. Varias líneas de evidencia argumentan que la proteína SOD1 mutante es neurotóxica mediante una función adversa adquirida que implica tanto patología oxidativa como agregación de proteínas, con perturbaciones secundarias del metabolismo de glutamato, función mitocondrial, transporte axonal y homeostasis del calcio [3]. Que la SOD1 mutante sea tóxica está fuertemente soportado por la observación de que la expresión transgénica de altos niveles de la proteína SOD1 mutante en ratones produce un fenotipo de enfermedad de las neuronas motoras, con edad de aparición y duración de la enfermedad dependientes del número de copias [4].

Hasta la fecha, algunas intervenciones terapéuticas han alterado el fenotipo de las neuronas motoras en los ratones con ELA transgénicos. Aunque hasta la fecha se han probado más de 100 moléculas pequeñas, algunas han tenido incluso un beneficio marginal (por ejemplo, riluzol [5], celecoxib [6], arimoclomol [7]). Por el contrario, algunas formas de la terapia con proteínas han sido beneficiosas. Así, se produjo una mejora significativa en la supervivencia administrando factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) tanto transgénicamente [8] como mediante la administración de AAV2-administración mediante inyección IM y posterior transporte axonal retrógrado a nervios motores [9]. Dos otras proteínas que han mostrado promesa terapéutica como agentes neuroprotectores son la eritropoyetina [10] y el factor endotelial vascular (VEGF) [11, 12]. El último es de interés particular debido a que el análisis genético ha implicado variantes hipomórficas en el gen VEGF como factor de riesgo para ELA [13]. Además, los ratones que carecen de elementos promotores sensibles a hipoxia desarrollan una enfermedad de las neuronas motoras lentamente progresiva [14]. Posteriormente, se documentó que la administración lentiviral de VEGF a la médula espinal de ratones con ELA retrasa la muerte [15]. Dos investigadores independientes han informado de que la infusión de VEGF en el líquido cefalorraquídeo en ratones con ELA [16] y ratas [17] también ralentiza la evolución de la enfermedad.

Un aspecto de la divulgación es un método que aumenta los niveles de la familia VEGF de las proteínas neurotróficas y/o EPO que comprende inyectar un vector neurotrófico que codifica HIF-1 $\alpha$  en la región de la médula espinal de un sujeto con ELA u otro trastorno de las neuronas motoras. El método puede aumentar más de una proteína neurotrófica tal. Sin estar limitado en cuanto a la teoría, la administración de un transgén que codifica HIF-1 $\alpha$  aumentará la expresión de diversos genes diana de HIF-1, proporcionando así un beneficio a las neuronas motoras en los sitios de expresión de HIF-1 $\alpha$ .

Sin estar limitado en cuanto a la teoría, la inyección directa en la médula espinal de un vector neurotrófico también proporciona una ventaja para la administración de moléculas terapéuticas, tales como HIF-1 $\alpha$ , que funcionan más eficazmente cuando se expresan directamente en células de la médula espinal. Por ejemplo, vectores neurotróficos que codifican moléculas tales como ARN interferente pequeño (ARNip) pueden administrarse a células de la médula espinal mediante inyección directa en la médula espinal. El ARNip administrado de este modo puede ejercer directamente intracelularmente efectos sobre las células de la médula espinal transducidas.

Además, ciertos trastornos genéticos de las neuronas motoras, tales como AME, pueden tratarse por inyección directa en la médula espinal con un vector neurotrófico que codifica un gen terapéutico. El presente método de inyección directa en la médula espinal proporciona un medio de administración del virus recombinante directamente a células en el área de la médula espinal.

Vectores neurotróficos virales adecuados para la práctica de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, vectores virales adeno-asociados (AAV), vectores virales del herpes simple (patente de EE.UU. N.º 5.672.344) y vectores lentivirales.

En los métodos de la divulgación, puede usarse AAV de cualquier serotipo o pseudotipo. El serotipo del vector viral usado en ciertos aspectos de la divulgación está seleccionado 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 aquellos enumerados en el presente documento. Además, también pueden utilizarse vectores de AAV pseudotipificados en los métodos descritos en el presente documento. Vectores de AAV pseudotipificados son aquellos que contienen las repeticiones terminales invertidas (ITRs) de un serotipo de AAV y la cápside de un segundo serotipo de AAV; por ejemplo, un vector de AAV que contiene la cápside de AAV2 y las ITRs de AAV1 (es decir, AAV1/2) o un vector de AAV que contiene la cápside de AAV5 y las ITRs de AAV2 (es decir, AAV2/5).

Los vectores de AAV se derivan de parvovirus de ADN monocatenario (mc) que son no patógenos para mamíferos (revisado en Muzyscka (1992) Curr. Top. Microb. Immunol., 158:97-129). Brevemente, los vectores basados en AAV tienen los genes virales *rep* y *cap* que representan el 96 % del genoma viral quitado, dejando las dos repeticiones terminales invertidas (ITRs) flanqueantes de 145 pares de bases (pb), que se usan para iniciar la replicación del, encapsidación e integración del ADN viral. En ausencia de virus auxiliar, el AAV no mutante se integra en el genoma

humano de las células huésped con especificidad de sitio preferencial en el cromosoma 19q 13.3 o puede mantenerse episómicamente. Una única partícula de AAV puede acomodar hasta 5 kb de ADNmc, dejando por tanto aproximadamente 4,5 kb de un transgén y elementos reguladores, que normalmente es suficiente. Sin embargo, los sistemas de corte y empalme en trans, como se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 6.544.785, pueden casi duplicar este límite.

En un aspecto ilustrativo, AAV es AAV7 o AAV8. Se ha estudiado ampliamente el virus adeno-asociado de muchos serotipos, especialmente AAV2, y caracterizado como vectores de terapia génica. Aquellos expertos en la materia estarán familiarizados con la preparación de vectores de terapia génica basados en AAV funcionales. Numerosas referencias a diversos métodos de producción, purificación y preparación de AAV para la administración a sujetos humanos pueden encontrarse en un conjunto importante de 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. Vectores de AAV a modo de ejemplo adicionales son vectores del serotipo AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7 y AAV8 recombinante que codifican proteína humana. Vectores pseudotipificados a modo de ejemplo adicionales pueden ser los vectores de AAV AAV2/1, AAV2/2, AAV2/6, AAV2/5, AAV2/7 y AAV2/8.

En ciertos métodos de la divulgación, el vector comprende un transgén operativamente unido a un promotor. El transgén codifica una molécula biológicamente activa, cuya expresión en el SNC produce al menos corrección parcial de la neuropatología. El gen HIF1-alfa es muy conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, NM\_001530 y NP\_001521. Las secuencias de transactivación de NFκB pueden estar sustituidas por la secuencia de transactivación de HIF1-alfa. Véase, por ejemplo, NM\_003998.

El nivel de expresión transgénica en células eucariotas se determina ampliamente por el promotor de la transcripción dentro del casete de expresión del transgén. En algunos aspectos se usan promotores que muestran actividad a largo plazo y son específicos de tejido e incluso de células. Ejemplos no limitantes de promotores incluyen, pero no se limitan a, el promotor del citomegalovirus (CMV) (Kaplitt et al. (1994) *Nat. Genet.* 8:148-154), promotor del CMV/globina β3 humana (Mandel et al. (1998) *J. Neurosci.* 18:4271-4284), promotor GFAP (Xu et al. (2001) *Gene Ther.* 8:1323-1332), el promotor de enolasa específica de neurona (NSE) de 1,8 kb (Klein et al. (1998) *Exp. Neurol.* 150:183-194), promotor de beta-actina de pollo (CBA) (Miyazaki (1989) *Gene* 79:269-277), el promotor de β-glucuronidasa (GUSB) (Shipley et al. (1991) *Genetics* 10:1009-1018) y los promotores de ubiquitina tales como aquellos aislados de ubiquitina A humana, ubiquitina B humana y ubiquitina C humana, como se describen en la patente de EE.UU. N.º 6.667.174. Para prolongar la expresión, otros elementos reguladores pueden adicionalmente estar operativamente unidos al transgén, tales como, por ejemplo, el elemento post-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 de crecimiento bovina (BGH).

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

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

En un aspecto, el transgén codifica una molécula biológicamente activa, cuya expresión en el SNC produce la corrección al menos parcial de la neuropatología. En algunos aspectos, el producto transgénico terapéutico es una proteína HTF1-alfa que alivia y/o previene los síntomas de ELA. Véanse Raoul et al. (2005) *Nat. Med.* 11(4):423-428 y Ralph et al. (2005) *Nat. Med.* 11(4):429-433.

Pueden usarse transgenes adicionales o alternativos para expresar una cantidad terapéutica del factor 1 de crecimiento de insulina (IGF-1), calbindina D28, parvalbúmina, HIF1-alfa, SIRT-2, VEGF, SMN-1, SMN-2 y CNTF (factor neurotrófico ciliar).

La divulgación objeto proporciona métodos de modulación, corrección o aumento de la función motora en un sujeto afectado con daño de las neuronas motoras. El sujeto puede padecer uno o más de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular bulbar espinal, atrofia muscular espinal (AME), ataxia cerebelosa espinal, esclerosis lateral primaria (ELP), o lesión traumática de la médula espinal.

Sin estar limitado en cuanto a la teoría, la patología asociada al daño de las neuronas motoras puede incluir degeneración de las neuronas motoras, gliosis, anomalías de los neurofilamentos, pérdida de fibras mielinadas en los tractos corticoespinales y raíces ventrales. Se reconocen dos tipos de aparición: aparición bulbar, que afecta a las neuronas motoras del tronco encefálico (afecta los músculos faciales, el habla y el tragar); y la aparición de extremidades, que afecta a las neuronas motoras de la médula espinal, se refleja por espasticidad, debilidad generalizada, atrofia muscular, parálisis y fallo respiratorio. En ELA, los sujetos tienen tanto aparición bulbar como de extremidades. En ELP, los sujetos tienen aparición bulbar.

- La capacidad de organizar y ejecutar actos motores complejos depende de las señales de las áreas motoras en la corteza cerebral, es decir, la corteza motora. Los comandos del motor cortical descienden en dos tractos. Las fibras corticobulbares controlan los núcleos motores en el tronco encefálico que mueven los músculos faciales y las fibras corticoespinales controlan las neuronas motoras espinales que inervan el tronco y los músculos de las extremidades.
- 5 La corteza cerebral también influye indirectamente en la actividad motora espinal, actuando sobre las vías descendentes del tronco encefálico.
- La corteza motora primaria se encuentra a lo largo del giro precentral en el área de Brodmann (4). Los axones de las neuronas corticales que transmiten a la médula espinal se dirigen juntas en el tracto corticoespinal, un enorme haz de fibras que contiene aproximadamente 1 millón de axones. Aproximadamente un tercio de éstos se originan desde el giro precentral del lóbulo frontal. Otro tercio se originan a partir del área 6. El resto se origina en las áreas 3, 2 y 1 en la corteza sensorial somática y regulan la transmisión de la entrada aferente a través del asta dorsal.
- 10 Las fibras corticoespinales se dirigen junto con las fibras corticobulbares a través de la extremidad posterior de la cápsula interna para llegar a la porción ventral del mesencéfalo. Se separan en la protuberancia en pequeños haces de fibras que atraviesan entre los núcleos de la protuberancia. Se reagrupan en el bulbo raquídeo para formar la pirámide medular. Aproximadamente tres cuartos de las fibras corticoespinales cruzan la línea media de la decusación piramidal en el empalme entre el bulbo raquídeo y 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 fibra sin cruzar descienden en las columnas ventrales como el tracto corticoespinal ventral.
- 15 Las divisiones laterales y ventrales del tracto corticoespinal terminan en aproximadamente las mismas regiones de la materia gris espinal como los sistemas lateral y medial del tronco encefálico. El tracto corticoespinal lateral transmite principalmente a los núcleos motores en la parte lateral del asta y a interneuronas en la zona intermedia. El tracto corticoespinal ventral transmite bilateralmente a la columna de células ventromedial y a porciones adjuntas de la zona intermedia que contienen las neuronas motoras que inervan los músculos axiales.
- 20 En un aspecto, los métodos desvelados incluyen administrar al SNC de un sujeto afectado un vector neurotrófico viral que lleva 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 a medida que la proteína expresada se transporta mediante el CSF a través de todo el SNC. Además, el vector puede comprender un polinucleótido que codifica una molécula biológicamente activa eficaz para tratar el trastorno del SNC. Tales moléculas biológicamente activas pueden comprender péptidos que incluyen, pero no se limitan a, versiones nativas, fusionadas o mutadas de proteínas de longitud completa, versiones nativas, fusionadas o mutadas de fragmentos de proteínas, polipéptidos sintéticos.
- 25 En un aspecto ilustrativo, la administración se lleva a cabo por inyección directa de una disolución de vector de título alto en la médula espinal de un sujeto o paciente.
- 30 En algunos aspectos, los métodos comprenden la administración de un vector neurotrófico de alto título que lleva un transgén terapéutico de manera que el producto transgénico se exprese a un nivel terapéutico en un primer sitio dentro de la médula espinal. En algunos aspectos, el título viral de la composición es al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 50 ( $\times 10^{12}$  pg/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 50 ( $\times 10^9$  ut/ml); o (c) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 50 ( $\times 10^{10}$  ui/ml).
- 35 En ratones experimentales, el volumen total de disolución de AAV inyectada es, por ejemplo, entre 1 y 20  $\mu$ l. Para otros mamíferos, que incluyen el ser humano, los volúmenes y las velocidades de administración son apropiadamente escalados. El tratamiento puede consistir en una única inyección por sitio diana, o puede repetirse en uno o más sitios. Pueden usarse múltiples sitios de inyección. Por ejemplo, en algunos aspectos, además del primer sitio de administración, una composición que contiene un vector viral que lleva un transgén se administra a otro sitio que puede ser contralateral o ipsilateral al primer sitio de administración. Las inyecciones pueden ser
- 40 únicas o múltiples, unilaterales o bilaterales.
- 45 Pueden producirse preparaciones de AAV de alto título 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.
- 50 Los siguientes ejemplos en ciertos aspectos soportan la invención. Un experto habitual en la materia reconocerá las numerosas modificaciones y variaciones que pueden realizarse sin alterar el alcance de la presente invención. Tales modificaciones y variaciones están englobadas dentro del alcance de la invención. Los ejemplos no limitan de ningún modo la invención.

## EJEMPLOS

### **Ejemplo 1.** *Administración del vector de rAAV de transgén a la médula espinal.*

- 55 Hasta la fecha ha habido relativamente pocos estudios que monitoricen sistemáticamente los patrones de distribución de diferentes serotipos de rAAV al sistema nervioso. Uno de los más informativos sugirió que rAAV2/1 y

rAAV2/5 tendieron a presentar transducción más alta de rAAV2/2. Además, se ha observado transporte retrógrado de rAAV1 y rAAV5 [20]. Los presentes inventores, por tanto, realizaron experimentos iniciales para determinar la captación y administración relativa de varios serotipos de AAV, usando dos vías de administración, a células en la médula espinal, centrándose en las neuronas motoras. Estos experimentos iniciales compararon la inyección intraparáncima de la médula espinal de AAV que codifica GFP (proteína verde fluorescente) con la inyección intramuscular de AAV que codifica GFP. Se evaluaron seis vectores pseudotipificados diferentes de AAV que incluyen los serotipos 2/1, 2/2, 2/5, 2/6, 2/7 y 2/8.

Inyecciones en la médula intraespinal. Se anestesiaron ratones por inhalación de isoflurano y se inmovilizaron usando un dispositivo estereotáxico. Se inyectaron grupos de ratones con un vector CBA-GFP de AAV; un grupo con cada uno de los siguientes serotipos: AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/6, AAV2/7 y AAV2/8. Cada ratón recibió un total de 2,5 e 10 partículas resistentes a DNasa (DRPs). La dosis se inyectó por inyección intraparáncima en las siguientes áreas de la médula espinal la región C6 (dentro de la región cervical), la región T8/T9 y la región T13 (dentro de la región torácica) y la región L3/L4 (dentro de la región lumbar). Se inyectaron cuatro microlitros de virus por sitio a una tasa de 1 microlitro/minuto.

Inyecciones intramusculares. Se inyectaron grupos de ratones con un vector CBA-GFP de AAV; un grupo con cada uno de los siguientes serotipos AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/6, AAV2/7 y AAV2/8. Cada ratón recibió cuatro inyecciones de AAV; dos inyecciones en el músculo cuádriceps y dos inyecciones en el músculo gastrocnemio. Cada ratón recibió una dosis total de 2,5 e 10 partículas resistentes a la DNasa (DRPs).

Se diseccionaron cerebro completo, médula espinal y músculos. Se extrajo ADN mediante el kit Qiagen Dneasy™. Se realizó el análisis del ensayo Taqman™ de BGH (hormona de crecimiento bovina) en el cerebro, médula espinal y músculos usando cebadores y sondas contra la secuencia de BGH en el vector CBA-GFP de AAV para determinar el número de copias de genoma de vector en cada tejido. Se determinó el número de copias de BGH del ADN total. También se realizó inmunohistoquímica en las médulas espinales diseccionadas para detectar cada uno de los siguientes: 1) GFP para medir la expresión transgénica, 2) proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) para marcar las células de la glía, y 3) SM132 y NeuN para marcar células neuronales.

La Figura 1 demuestra el número de genomas de vector de AAV que se administraron a la médula espinal por tanto inyecciones espinales como mediante inyecciones intramusculares. Se encontraron más genomas de vector en las médulas espinales de ratones tratados con las inyecciones espinales AAV 2/7 y 2/8.

La Figura 2 muestra el número de genomas de vector que se administraron al cerebro tras tanto la inyección en la médula espinal como intramuscular de los vectores de AAV. Estuvo presente muy poco vector de AAV en el cerebro. No fueron evidentes diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento. Los datos demuestran que hubo poca diseminación de vector al cerebro tras la inyección directa en la médula espinal de cualquier serotipo de AAV. Esto puede ser una ventaja de seguridad y sugiere que el vector sigue en el área de la médula espinal tras la inyección en la médula espinal.

La Figura 3 muestra el número de genomas de vector que se administraron al músculo tras la inyección intramuscular de los vectores de AAV.

Los datos demuestran que la inyección directa en la médula espinal de vectores de AAV media en una mayor transferencia génica a la médula espinal en comparación con la inyección intramuscular de los vectores de AAV. Esto se demuestra por el mayor número de genomas de vector de AAV como se mide en la médula espinal en ratones inyectados en la médula espinal frente a en el músculo con vectores de AAV idénticos. Además, los datos demuestran que los serotipos que median en la mayor transferencia génica de la médula espinal en este experimento fueron AAV2/7 y AAV2/8.

Los resultados de inmunohistoquímica demuestran que la inyección en la médula espinal de vectores de AAV que codifican GFP produjo expresión de GFP significativa. La expresión de GFP se co-localizó en células que expresaban marcadores neuronales, SM132 y NeuN. No se observó co-localización de GFP con GFAP, un marcador de la astrogliá. Los resultados inmunohistoquímicos fueron similares para todos los serotipos probados. Tras la inyección intramuscular, no se observaron GFP o algunas células positivas para GFP (principalmente no neuronales) en la médula espinal después de las inyecciones intramusculares.

#### **Ejemplo 2. Evaluación de AAV-HIF-1alfaNFkB en el cerebro de ratón.**

Inyección de AAV-HIF1alfaNFkB en el cerebro de ratón: Se inyectaron ratones con vectores de AAV que codificaban HIF1alfaNFkB en el área del tálamo del cerebro. Se evaluaron dos serotipos 1) AAV2/1-HIF1alfaNFkB y 2) AAV2-HIF1alfaNFkB. Cada ratón recibió 9 e9 partículas resistentes a la DNasa (DRPs). Ratones sin tratar sirvieron de controles. Cuatro semanas después de la inyección, los ratones se sacrificaron y se recogieron sus cerebros. Se realizó hibridación *in situ* en secciones del cerebro para visualizar ARNm de HIF-1alfa. También se realizó RT-PCR en ADNc extraído de los cerebros para evaluar la expresión génica de VEGF. La expresión génica de VEGF se normalizó a la expresión génica de GUSB.

Se observó ARNm de HIF-1alfa mediante hibridación *in situ* en cerebros de ratones tratados con tanto AAV2/1-HIF1alfaNFkB como AAV2-HIF1alfaNFkB; no se observaron mensajeros en los cerebros de control. Se observó más señal de ARNm de HIF-1alfa en ratones tratados con AAV2/1-HIF1alfaNFkB. El análisis de la expresión génica por RT-PCR demostró un aumento en la expresión génica de VEGF en ratones tratados con AAV2/1-HIF1alfaNFkB con respecto a los animales de control. No se observó aumento medible en la expresión génica de VEGF en ratones tratados con AAV2-HIF1alfaNFkB.

En un segundo experimento, los ratones se inyectaron con AAV2/1-HIF1alfaNFkB bilateralmente en el área del cerebelo del cerebro del ratón. Cada ratón recibió 2 e10 partículas resistentes a la DNAsa (DRPs). Ratones sin tratar sirvieron de controles. Tres semanas después de la inyección, los ratones se sacrificaron y se recogieron sus cerebros. Se realizó hibridación *in situ* en secciones del cerebro para visualizar ARNm de HIF-1alfa. También se realizó RT-PCR en ADNc extraído de los cerebros para evaluar la expresión génica de VEGF, EPO e IGF-1. Los niveles de expresión se normalizaron a la expresión génica de GUSB.

Se observó ARNm de HIF-1alfa mediante hibridación *in situ* en todo el cerebelo. La expresión fue robusta y estuvo presente durante todas las diversas capas de las células neuronales. No se observó ARNm de HIF-1alfa en los troncos encefálicos. No se observó ARNm de HIF-1alfa en los cerebros de ratones de control. Como se muestra en la Figura 4, los niveles de ARNm de VEGF, EPO e IGF-1 se regularon por incremento en el cerebro tras la transducción con un vector de AAV que codificaba HIF-1alfa. No se observó regulación por incremento en estos genes en ratones de control. Esto demuestra que HIF-1alfa tiene la capacidad de modular niveles de expresión génica en genes diana en el cerebro tras la transducción con un vector de AAV.

**Ejemplo 3. Administración mediada por rAAV de HIF-1alfa a la médula espinal de ratones con ELA.**

*Modelo terapéuticamente relevante de esclerosis lateral amiotrófica (ELA).* La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa letal que se caracteriza por una pérdida selectiva de neuronas motoras en la corteza, tronco encefálico y 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 va acompañada de gliosis reactiva, anomalías de los neurofilamentos y una pérdida significativa de grandes fibras mielinadas en los tractos corticoespinales y las raíces ventrales. Aunque la etiología de la ELA es apenas conocida, cada vez más pruebas indican que la ELA esporádica (ELAE) y familiar (ELAF) comparten muchas características patológicas similares; proporcionando así una esperanza de que el estudio de cualquier forma conducirá a un tratamiento común. La ELAF representa aproximadamente el 10 % de los casos diagnosticados, de los que el 20 % están asociados a mutaciones predominantemente heredadas en la Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1). Los ratones transgénicos que expresan la proteína SOD1 humana mutante (por ejemplo, ratones SOD1<sup>G93A</sup>) resumen muchas características patológicas de ELA y son un modelo animal disponible para estudiar la ELA. Para ELAE, innumerables mecanismos patológicos participan como causa subyacente, que incluyen excitotoxicidad inducida por glutamato, exposición a toxinas, disfunción del proteasoma, daño mitocondrial, desorganización de neurofilamentos y pérdida del soporte neurotrófico.

Los presentes inventores probarán la hipótesis de que la administración mediada por rAAV de HIF1alfa a la médula espinal podía promover la supervivencia de las neuronas motoras y mejorar la progresión de la enfermedad de ratones con ELA SOD1<sup>G93A</sup>. La administración con un vector de AAV recombinante permite la expresión transgénica relativamente a largo plazo (los ratones con ELA puede requerir expresión transgénica durante muchos meses). Además, dependiendo del serotipo, AAV infecta tanto a células neuronales como no neuronales, un posible beneficio si, como sospechan los presentes inventores, células no neuronales participan en la muerte de las neuronas motoras [21].

*Descripción experimental.* Los presentes inventores usaron inyecciones intraespinales para administrar AAV2/8-HIF1alfa NFkB para determinar el efecto de esta estrategia sobre la supervivencia de las neuronas motoras y la aparición de la enfermedad y supervivencia de ratones con ELA SOD1<sup>G93A</sup>.

*Infección por rAAV de la médula espinal de ratones con ELA.* Para el grupo de tratamiento viral, ratones SOD1<sup>G93A</sup> o SOD1WT (5/ grupo) y ratones WT (5/ grupo) de tanto 60 días de edad como de 90 días de edad se inyectaron con 1 e 11 DRPs de AAV2/8-Hif1alfa-NFkB. Como controles negativos, ratones SOD1 tanto de 60 días de edad como de 90 días de edad se inyectaron con la misma dosis de vector vacío (como control positivo adicional, ratones SOD1 (5/ grupo) de tanto 60 días de edad como de 90 días de edad podrían inyectarse con la misma dosis de vector AAV2/8-hIGF-1 (IGF-1 humano). Un control negativo adicional también podrían ser ratones no mutantes). Se inyectó virus en las vértebras C6, T8/T9, T13, L3/L4 de la médula espinal, 4 µl por sitio, administrados a 1 µl/min, con 2,5 e 10 de dosis total de DRP. Se usarán ensayos TaqMan para detectar los genomas virales, mensajero para HIF1alfa, y VEGF, en la médula espinal. Se realizó hibridación *in situ* de las médulas espinales para visualizar la expresión de HIF1-alfa en las médulas espinales de tanto ratones tratados con AAV2/8-Hif1alfa-NFkB como de control negativo.

*Tamaño de muestra y consideraciones estadísticas.* Se trataron veinte ratones TgSOD1<sup>G93A</sup> con AAV2/8-HIF1alfa para observar la aparición y supervivencia. Podrían sacrificarse 30 ratones adicionales de cada tipo para análisis histológico y bioquímico a 110 d y terminalmente. Basándose en estudios previos, los presentes inventores suponen (i) ratones con el transgén SOD1<sup>G93A</sup> viven 130 ± 13 días; (ii) la potencia estadística del estudio de los presentes

inventores para detectar la diferencia verdadera entre grupos es del 90 %; (iii) alfa es bilateral a 0,05; y (iv) los presentes inventores desean detectar una diferencia del 10 % o mayor en la supervivencia media de ratones tratados. Con estas suposiciones, los presentes inventores requieren un mínimo de 14 ratones por haplotipo de prueba. Los presentes inventores, por tanto, eligen observar al menos 20 animales en cada grupo para la aparición, progresión de la enfermedad y supervivencia, en caso de que los ratones mueran por motivos no relacionados con su enfermedad de las neuronas motoras. En el análisis de la supervivencia final, se evaluaron 20 ratones tratados con AAV2/8-HIF1alfa y se evaluaron 18 ratones de control. Podrían sacrificarse 30 ratones adicionales por grupo para análisis histológico y bioquímico a intervalos de tiempo predeterminados (5 por mes x 6 meses). Se comparó el momento de aparición de la enfermedad y la supervivencia usando representaciones de Kaplan-Meier y la prueba estadística del rango logarítmico. Se empleará un modelo de riesgos proporcionales de Cox para controlar los efectos del sexo.

Determinación de los efectos de rAAV-HIF1alfa sobre el fenotipo de ELA. La aparición de la enfermedad se define por la aparición de temblores en las patas estiradas cuando el ratón se sujeta por su cola. La muerte se define como aquel momento en el que el ratón no puede enderezarse en el plazo de 30 segundos.

Evaluación del efecto de rAAV-HIF1alfa sobre la supervivencia de las neuronas motoras. Los presentes inventores usarán el análisis de la raíz ventral para monitorizar los números de neuronas motoras en 5 ratones TgSOD1<sup>G93A</sup> tratados con rAAV-HIF1alfa en momentos de tiempo sintomáticos (110 días) y terminales.

Resultados. Se observó un aumento estadísticamente significativo ( $p = 0,033$ ) en la supervivencia del ratón con ELA tras la administración intraespinal de AAV2/8 Hif1aNFkB (supervivencia de 133 días de animales de control frente a la supervivencia de 139 días de animales experimentales). Diferentes cohortes de animales respondieron de diferente forma al tratamiento; el 25 % de los animales tratados mostró un aumento en la supervivencia de 18-23 días mientras que el 25 % de los animales mostró un aumento en la supervivencia de 8-13 días. El análisis de hibridación *in situ* para Hif1aNFkB en las médulas espinales de ratones con ELA tratados con AAV2/8 Hif1aNFkB sugiere que la transducción se observó principalmente en la región lumbar de la médula espinal. Además, el análisis sugiere que solo se administró el 25 % de la dosis prevista de 1 e 11 drps a los animales.

**TABLA 1**

**Tabla resumen de la supervivencia para la columna 1**

**Variable de censura: Columna 3**

**Variable de agrupación: Columna 1.2**

	N.º obs.	N.º eventos	N.º censurados	% de censurados	N.º ausentes	N.º inválidos
CONTROL	18	13	5	27,778	0	0
EXP	20	20	0	0,000	0	0
Total	38	33	5	13,158	0	0

**TABLA 2**

**Estadística de la supervivencia de Kaplan-Meier para la columna 1**

**Variable de censura: Columna 3**

**Variable de agrupación: Columna 1.2**

	Estimado	Error est.
CONTROL: 25 %	129,000	4,992
CONTROL: 50 %	134,000	2,996
CONTROL: 75 %	139,000	1,519
CONTROL: Media	133,000	2,169
EXP: 25 %	131,000	4,782
EXP: 50 %	139,000	2,966

EXP: 75 %

144,000

3,873

EXP. Media

138,100

2,334

**Ejemplo 4. Construcción híbrida / quimera**

Puede construirse un factor de transcripción híbrido (pcDNA3/HIF.VP-16.Afl2) compuesto de un dominio de unión de ADN y de dimerización a partir de HIF-1 $\alpha$  y el dominio de transactivación de VP16 del virus del herpes simple para proporcionar la fuerte activación constitutiva de genes normalmente implicados en la adaptación fisiológica a hipoxia como se expone brevemente más adelante.

Se aisló PCR (kit de PCR de ADNc Advantage, Clontech, Palo Alto, Calif.) del gen HIF-1  $\alpha$  de longitud completa (aa 1-826) de una biblioteca de ADNc de células HeLa (Clontech) usando los cebadores expuestos (SEQ ID NO: 4: ggggtacctt ctctctccg cgtgtggagg gagccagc; SEQ ID NO: 5: gctctagagt gagccaccag tgccaataaa aaggatg) y se insertó entre los sitios KpnI y XbaI del vector de expresión, pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.). En este plásmido, la expresión génica está controlada por el potenciador/promotor inmediato temprano del citomegalovirus (CMV). Se construyó el híbrido HIF-1  $\alpha$  / VP-16 truncando HIF-1 $\alpha$  en el aa 390 (un sitio Afl2) y luego uniendo el dominio de transactivación de VHS VP-16 en la dirección 3'. Un fragmento de VP16 (aa 413-490) con los extremos Afl2 y XbaI se amplificó por PCR usando polimerasa Vent (New England Biolabs, Beverly, MA) y los cebadores expuestos (SEQ ID NO:6: cgtacgctta agccggaatt cccggggatc tgg; SEQ ID NO: 7: cgctctagac taccaccctg actcgtcaat tc) y este fragmento se clonó en los sitios apropiados de la construcción pcDNA3/ HIF-1 $\alpha$ . Se produjo una construcción relacionada (pcDNA3/HIF/VP-16/R1) truncando HIF-1 $\alpha$  en el aa 530 por digestión parcial con EcoR1. La integridad de todas las secuencias generadas por PCR se verificó por secuenciación de ADN usando un secuenciador de ADN 377 de Applied Biosystems. Todas las manipulaciones de clonación se llevaron a cabo siguiendo procedimientos convencionales (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2d Ed. (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)). Se obtuvieron enzimas de restricción y enzimas modificadoras de ADN de tanto New England Biolabs como Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Md.) y se usaron según las especificaciones del fabricante. Se purificaron ADN de plásmido con kits obtenidos de Qiagen (Chatsworth, Calif.).

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes, cultivo celular, condiciones de tratamiento, etc., usados en la memoria descriptiva deben entenderse como que están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden depender mucho de las propiedades deseadas que se buscan obtener por la presente invención. A menos que se indique lo contrario, el término "al menos" que precede a una serie de elementos debe entenderse para referirse a cada elemento en la serie. Aquellos expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más de experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento.

**Referencias**

1. Rosen, D.R., et al., Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 1993. 362: p. 59-62.

2. Andersen, P.M., et al., Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2003. 4(2): p. 62-73.

3. Cleveland, D.W. and J.D. Rothstein, From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci*, 2001. 2(11): p. 806-19.

4. Gurney, M.E., et al., Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 1994. 264: p. 1772-1775.

5. Gurney, M.E., et al., Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis [see comments]. *Ann Neurol*, 1996. 39(2): p. 147-57.

6. Drachman, D.B., et al., Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol*, 2002. 52(6): p. 771-8.

7. Kieran, D., et al., Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nat Med*, 2004. 10(4): p. 402-5.

8. Dobrowolny, G., et al., Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. *J Cell Biol*, 2005. 168(2): p. 193-9.

9. Kaspar, B.K., et al., Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science*, 2003. 301(5634): p. 839-42.

10. Iwasaki, Y., et al., Protective effect of interleukin-3 and erythropoietin on motor neuron death after neonatal axotomy. *Neurol Res*, 2002. 24(7): p. 643-6.
11. Brockington, A., et al., Vascular endothelial growth factor and the nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2004. 30(5): p. 427-46.
- 5 12. Storkebaum, E., D. Lambrechts, and P. Carmeliet, VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays*, 2004. 26(9): p. 943-54.
13. Lambrechts, D., et al., VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet*, 2003. 34(4): p. 383-94.
- 10 14. Oosthuysen, B., et al., Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet*, 2001. 28(2): p. 131-8.
- 15 15. Azzouz, M., et al., VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature*, 2004. 429(6990): p. 413-7.
16. Zheng, C., et al., Vascular endothelial growth factor prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol*, 2004. 56(4): p. 564-7.
17. Storkebaum, E., et al., Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci*, 2005. 8(1): p. 85-92.
18. Yamakawa, M., et al., Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circ Res*, 2003. 93(7): p. 664-73.
- 20 19. Vincent, K.A., et al., Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1alpha/VP1 6 hybrid transcription factor. *Circulation*, 2000. 102(18): p. 2255-61.
20. Burger, C., et al., Recombinant AA V viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther*, 2004. 10(2): p. 302-17.
- 25 21. Clement, A.M., et al., Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science*, 2003. 302(5642): p. 113-7.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

ES 2 607 060 T3

< 213> Homo sapiens

<400> 1

```

atggagggcg cggcgggcgc gaacgacaag aaaaagataa gttctgaacg tcgaaaagaa 60
aagtctcgag atgcagccag atctcggcga agtaaagaat ctgaagttt ttatgagctt 120
gctcatcagt tggcacttcc acataatgtg agttcgcac ttgataaggc ctctgtgatg 180
aggcttacca tcagctattt gcgtgtgagg aaacttctgg atgctggtga tttggatatt 240
gaagatgaca tgaagcaca gatgaattgc ttttatttga aagccttggg tggttttgtt 300
atggttctca cagatgatgg tgacatgatt tacatttctg ataatgtgaa caaatacatg 360
ggattaactc agtttgaact aactggacac agtgtgtttg attttactca tccatgtgac 420
catgaggaaa tgagagaaat gcttacacac agaaatggcc ttgtgaaaaa gggtaaagaa 480
caaaacacac agcgaagctt ttttctcaga atgaagtgtg ccctaactag ccgaggaaga 540
actatgaaca taaagtctgc aacatggaag gtattgcact gcacaggcca cattcacgta 600
tatgatacca acagtaacca acctcagtggt gggataaga aaccacctat gacctgcttg 660
gtgctgattt gtgaacccat tcctcaccca tcaaatattg aaattcctt agatagcaag 720
actttcctca gtcgacacag cctggatag aaattttctt attgtgatga aagaattacc 780
gaattgatgg gatatgagcc agaagaactt ttaggccgct caatttatga atattatcat 840
gctttggact ctgatcatct gaccaaaact catcatgata tgtttactaa aggacaagtc 900
accacaggac agtacaggat gcttgccaaa agaggtggat atgtctgggt tgaaactcaa 960
gcaactgtca catataacac caagaattct caaccacagt gcattgtatg tgtgaattac 1020
gttgtgagtg gtattattca gcacgacttg attttctccc tcaacaacac agaatgtgtc 1080
cttaaaccgg ttgaatcttc agatatgaaa atgactcagc tattcaccaa agttgaatca 1140
gaagatacaa gtagcctctt tgacaaaact aagccggaat tcccggggat ctgggcccc 1200
ccgaccgatg tcagcctggg ggaacgagctc cacttagacg gcgaggacgt ggcgatggcg 1260
catgccgacg cgtagacgca tttcgatctg gacatgttgg gggacgggga ttccccgggg 1320
ccgggattta cccccacgca ctccgcccc tacggcgctc tggatatggc cgacttcgag 1380
tttgagcaga gtttaccga tgcccttggg attgacgagt acgggtgggta g 1431

```

5

<210> 2

< 211> 1173

< 212> AND

< 213> Homo sapiens

10

<400> 2

```

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

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

```

15

<210> 3

< 211> 475

ES 2 607 060 T3

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

<400> 3

```

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

```

<210> 4

< 211> 38

< 212> ADN

10 < 213> Homo sapiens

<400> 4

ggggfacctt ctcttcccg cgtgtggagg gagccagc 38

15 <210> 5

< 211> 37

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

20 <400> 5

gctctagagt gagccaccag tgtcaaaaa aaggatg 37

<210> 6

< 211> 33

< 212> ADN

25 < 213> Homo sapiens

<400> 6

cgtacgctta agccggaatt cccggggatc tgg 33

30 <210> 7

< 211> 32

< 212> ARN

< 213> Homo sapiens

# ES 2 607 060 T3

<400> 7

cgctctagac taccaccgt actcgtcaat tc 32

**REIVINDICACIONES**

1. Un vector de virus adeno-asociado recombinante de pseudotipo 2/7 o 2/8 que codifica SMN-1, para su uso en un método de tratamiento de un mamífero que tiene atrofia muscular espinal, en el que el vector va a inyectarse en la médula espinal del mamífero.
- 5 2. El vector de virus adeno-asociado para su uso según la reivindicación 1, en el que el pseudotipo del vector de virus adeno-asociado es 2/7.
3. El vector de virus adeno-asociado para su uso según la reivindicación 1, en el que el pseudotipo del vector de virus adeno-asociado es 2/8.
- 10 4. El vector de virus adeno-asociado para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el vector va a administrarse en una pluralidad de sitios en la médula espinal.
5. El vector de virus adeno-asociado para su uso según cualquier reivindicación precedente, en el que el mamífero está seleccionado del grupo que consiste en un roedor, un murino, un ser humano y un simio.
6. El vector de virus adeno-asociado para su uso según la reivindicación 5, en el que el mamífero es un ser humano.
- 15 7. Uso de un vector de virus adeno-asociado recombinante de pseudotipo 2/7 o 2/8 que codifica SMN-1, para la fabricación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento de un mamífero que tiene atrofia muscular espinal en el que el vector va a inyectarse en la médula espinal del mamífero como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

Fig. 1. Genomas de vector de la médula espinal

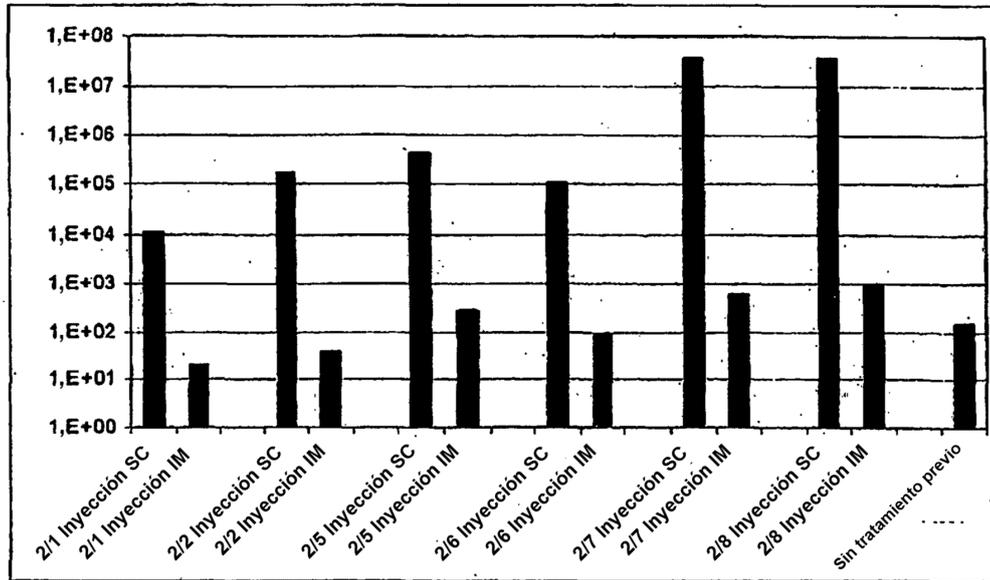


Fig. 2. Genomas de vector del cerebro

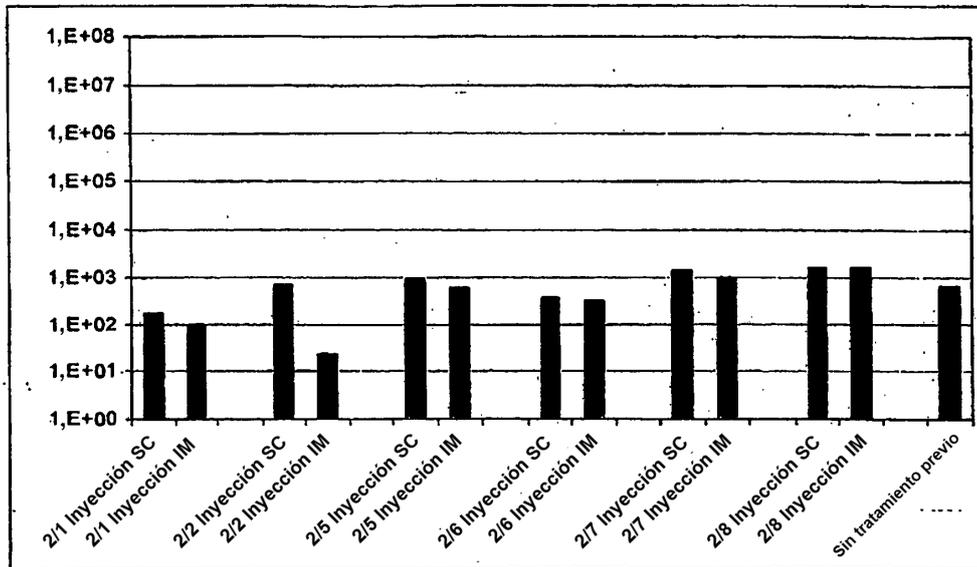
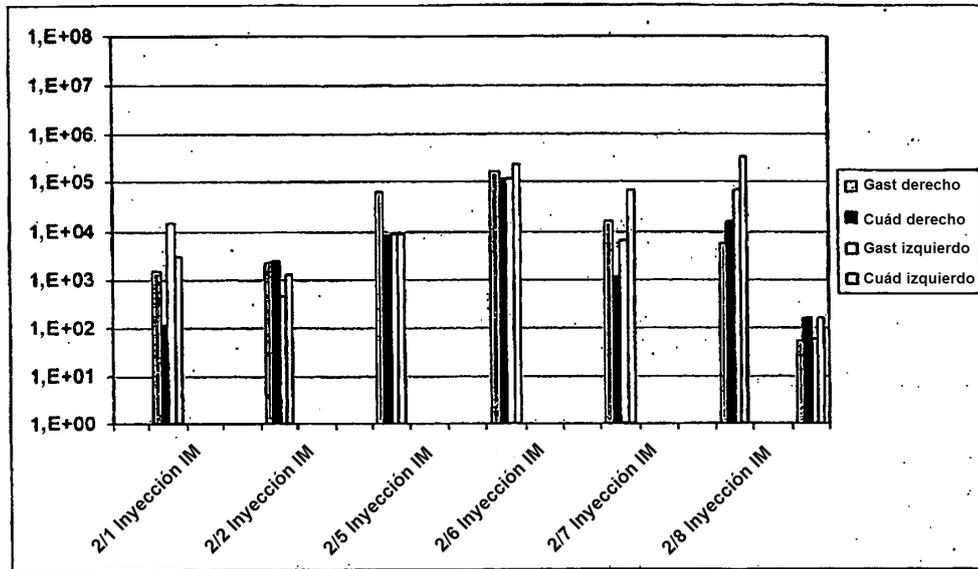


Fig. 3. Genomas de vector de músculo



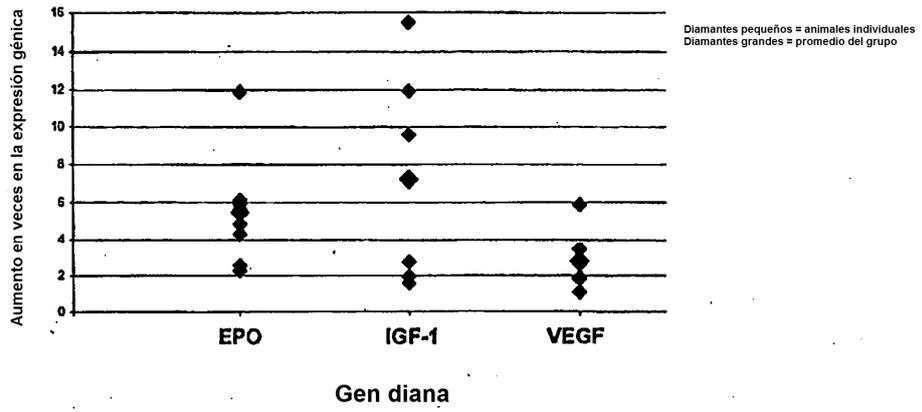
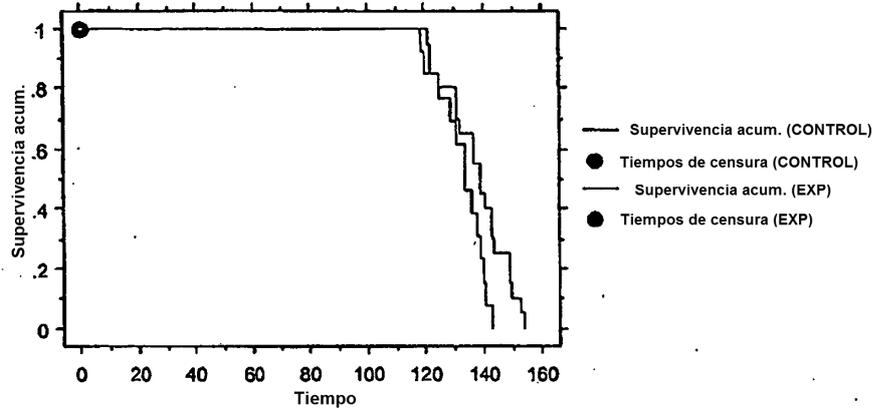


Fig. 4

Representación de supervivencia acum. de Kaplan-Meier para la columna 1  
 Variable de censura: Columna 3  
 Variable de agrupamiento: Columna 1.2



Rango logarítmico (Mantel-Cox) Prueba para la columna 1  
 Variable de censura: Columna 3  
 Variable de agrupamiento: Columna 1.2

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

Fig. 5

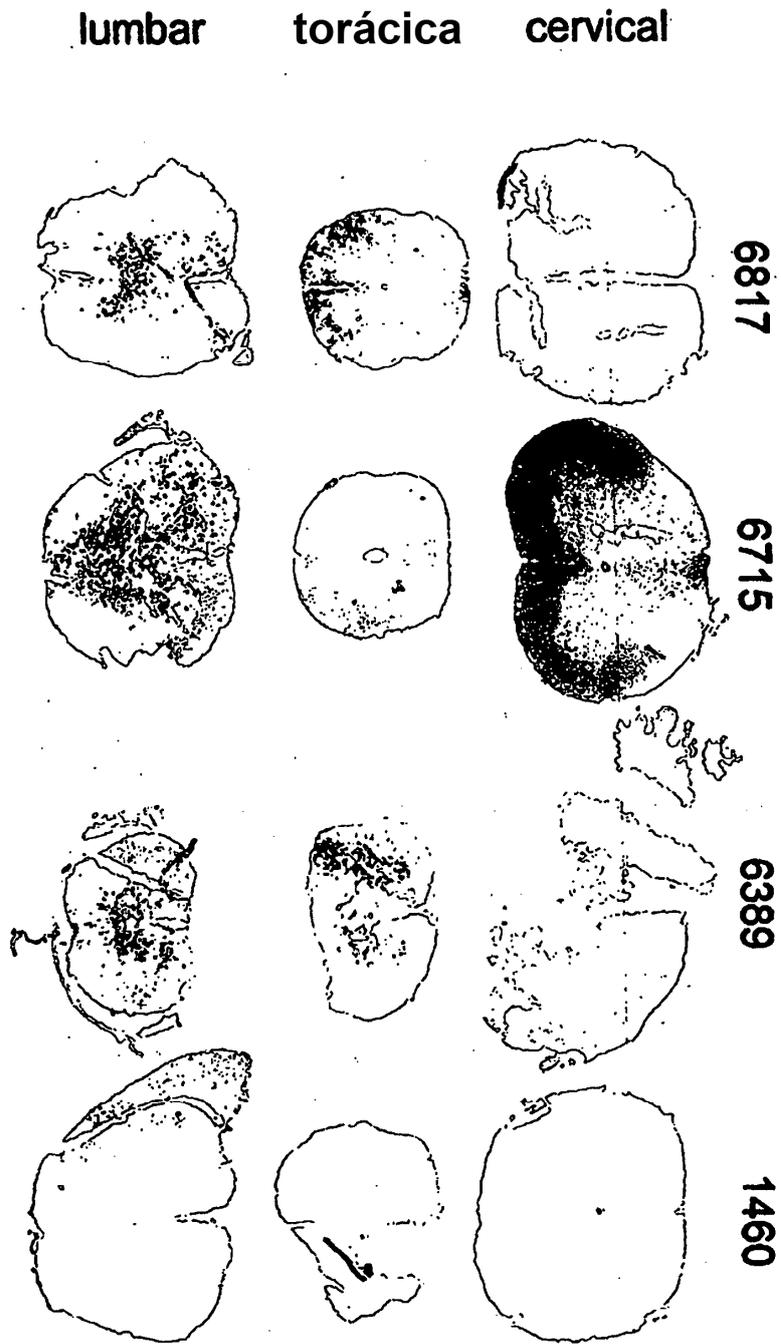


Fig. 6