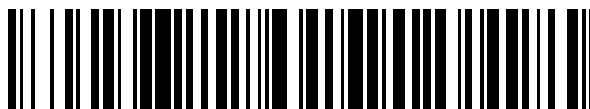


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 151**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2013 PCT/US2013/063858**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2014 WO14058866**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2013 E 13845040 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 2906580**

54 Título: **Tratamiento para la esclerosis lateral amiotrófica**

30 Prioridad:

11.10.2012 US 201261712322 P

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

10.11.2020

73 Titular/es:

**BRANDEIS UNIVERSITY (100.0%)
415 South Street, Ms 115
Waltham, MA 02454, US**

72 Inventor/es:

**PETSKO, GREG;
RINGE, DAGMAR y
JU, SHULIN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 792 151 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

Tratamiento para la esclerosis lateral amiotrófica

Antecedentes de la invención

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA, también llamada enfermedad de Lou Gehrig) es una enfermedad neurodegenerativa, mortal e implacablemente progresiva, con una prevalencia de aproximadamente 5 personas de cada 100.000 cada año y una media en la edad de inicio de unos 60 años. Los pacientes con ELA sufren la degeneración de las neuronas motoras en el cerebro y en la médula espinal, lo que les conduce a una cierta debilidad muscular progresiva. La ELA representa entre alrededor de 1/300 a 1/400 de todas las muertes, lo que significa que alrededor de 1.000.000 de personas que ahora están vivas en los Estados Unidos desarrollarán en un futuro la ELA. La muerte ocurre típicamente 3-5 años después del inicio de la enfermedad, debido a una parálisis respiratoria. No existe ningún tratamiento eficaz para esta enfermedad; el único medicamento aprobado para el ELA (riluzol) solo extiende la vida de algunos pacientes con ELA en apenas unos 3 meses. Por lo tanto, sigue siendo necesario crear nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de la ELA.

Compendio

La presente descripción abarca el sorprendente descubrimiento de que los agentes involucrados en la descomposición del ARNm mediado sin sentido (NMD) pueden proteger a las células neuronales del daño asociado a TDP-43 o FUS/TLS. Por lo tanto, la presente invención proporciona un polipéptido UPF1 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido UPF1 para su uso en medicamentos y, específicamente, en el tratamiento o la prevención (por ejemplo, retraso del inicio) de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). En un aspecto, la presente descripción proporciona métodos para reducir la toxicidad del TDP-43 en una célula neuronal humana o célula glial humana que sufre dicha toxicidad o es susceptible a ella, que comprende proporcionar a la célula in vitro una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido UPF1, reduciendo así la toxicidad del TDP-43 en la célula. En algunas realizaciones, el paso de proporcionar comprende la administración de una composición que comprende el polipéptido UPF1, o un ácido nucleico que codifica el polipéptido UPF1.

En los diversos aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido UPF o un nucleótido que codifica el polipéptido UPF1 para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en un sujeto humano, en el que un polipéptido UPF1, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de UPF1 debe administrarse a un sujeto que sufre ELA o es susceptible de sufrirla, y en el que la ELA está asociada con la toxicidad de TDP-43; o el sujeto no tiene ninguna mutación en un gen SOD1. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente efectiva se correlaciona con una probabilidad estadísticamente significativa de reducir la toxicidad del TDP-43 en una célula neuronal o una célula de la glía. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente efectiva se correlaciona con una probabilidad estadísticamente significativa de mejorar el procesamiento del ARNm en una célula neuronal o una célula glial. En algunas realizaciones, la enfermedad, trastorno o condición no está asociada con la toxicidad de SOD1. En algunas realizaciones, el polipéptido UPF1 o el ácido nucleico que codifica el polipéptido UPF1 debe administrarse en el SNC del sujeto, tal como por una inyección intratecal.

En varios aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido UPF para su uso en el tratamiento de la ELA en un sujeto humano, en el que el polipéptido UPF1 debe administrarse a un sujeto que sufre ELA o es susceptible de padecerla, y en el que la ELA está asociada con la toxicidad de TDP-43 o el sujeto no tiene ninguna mutación en un gen SOD1. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente efectiva se correlaciona con una probabilidad estadísticamente significativa de reducir la toxicidad en una célula neuronal humana o una célula glial humana. En algunas realizaciones, la toxicidad es la toxicidad de TDP-43. En algunas realizaciones, la toxicidad no es la toxicidad de SOD1. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente efectiva se correlaciona con una probabilidad estadísticamente significativa de mejorar el procesamiento del ARNm en una célula neuronal humana o una célula glial humana.

Se describen en este documento métodos para identificar un agente útil en el tratamiento de la ELA que comprende: poner en contacto una población de células neuronales o células gliales que sufren o son susceptibles frente a la toxicidad de FUS/TLS o TDP-43 con un agente de ensayo; determinar un número de células viables en la población después de la etapa de contacto; y comparar el número de células viables con un control; en el que el agente de ensayo que aumenta el número de células viables en relación con el control se identifica como un agente útil en el tratamiento de la ELA. En algunas realizaciones, las células neuronales o las células gliales se transfectan con un ácido nucleico que codifica FUS/TLS o TDP-43.

También se describen en este documento métodos para identificar un agente útil en el tratamiento de la ELA que comprende: poner en contacto una población de células neuronales o células gliales que sufren o son susceptibles a la toxicidad de FUS/TLS o TDP-43 con un agente de ensayo; determinar un nivel de procesamiento del ARNm en la población de células neuronales o células gliales después de la etapa de contacto; y comparar el nivel de procesamiento de ARNm con un control; en el que el agente de ensayo que aumenta el nivel de procesamiento de ARNm en relación con el control se identifica como agente útil en el tratamiento del ELA.

También se describen en el presente documento métodos de identificación de un agente útil en el tratamiento de la ELA que comprende: poner en contacto una primera población de células neuronales o células gliales que sufren o son susceptibles a la toxicidad de FUS/TLS o TDP-43 con un agente de ensayo; determinar un primer número de células viables en la primera población después de la etapa de contacto; administrar un polipéptido NMD a una segunda población de células neuronales o células gliales que sufren o son susceptibles a la toxicidad de FUS/TLS o TDP-43; y determinar un segundo número de células viables en la segunda población después de la etapa de administración; en el que un primer número de células viables que es comparable al segundo número de células viables indica que el agente de ensayo es un agente útil en el tratamiento de la ELA.

En varios aspectos, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas para el uso de ELA que comprende un polipéptido UPF1, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido UPF1, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que la ELA está asociada con la toxicidad de TDP-43 o el sujeto no tiene ninguna mutación en un gen SOD1. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un agente de reconocimiento. En algunas realizaciones, tras la administración a un sujeto, el agente de reconocimiento detecta selectivamente la composición en el cerebro.

En varios aspectos, la presente descripción proporciona un polipéptido UPF1 para el tratamiento de la ELA en un sujeto humano que sufre o es susceptible de sufrir la ELA, en el que el polipéptido UPF1 debe administrarse a dicho sujeto, en el que el sujeto no tiene ninguna mutación en un gen SOD1. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una mutación en un gen ALS2, un gen VAPB, un gen SETX, un gen TDP-43, un gen FUS/TLS o un gen OPTN.

Breve descripción de los dibujos

Las siguientes figuras se presentan únicamente con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

La FIG. 1A es una representación gráfica de la muerte celular de neuronas después de la expresión de UPF1.

La FIG. 1B es una representación gráfica de la muerte celular de neuronas tras la expresión de TDP-43 y UPF1.

Los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solamente y no pretenden ser limitantes. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puedan utilizarse en la práctica métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento o en las pruebas de la presente invención, a continuación se describen algunos métodos y materiales adecuados.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y de las reivindicaciones.

Definiciones

Para que la presente invención se entienda más fácilmente, ciertos términos se definen primero a continuación. Otras definiciones para los siguientes términos y expresiones se establecen a lo largo de la memoria descriptiva.

Aproximadamente: Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente", tal como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia declarado. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" se refiere a un intervalo de valores dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia indicado a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo a partir del contexto (excepto cuando dicho número supere el 100% de un valor posible).

Mejora: Tal como se utiliza en el presente documento, el término "mejora" significa la prevención, reducción o paliación de un estado, o la mejora del estado de un sujeto. La mejora incluye, pero no requiere, una recuperación completa o prevención completa de una condición de enfermedad.

Parte característica: Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "parte característica" de una sustancia, en el sentido más amplio, es aquel que comparte cierto grado de secuencia o identidad estructural con respecto a toda la sustancia. En determinadas realizaciones, una parte característica comparte al menos una característica funcional con la sustancia intacta. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una "porción característica" de un polipéptido o proteína es una que contiene un tramo continuo de aminoácidos, o una colección de tramos continuos de aminoácidos, que juntos son característicos de un polipéptido o proteína. En algunas realizaciones, cada uno de estos tramos continuos contiene al menos 2, 5, 10, 15, 20, 50 o más aminoácidos. En algunas realizaciones, dicho tramo continuo incluye ciertos residuos cuya posición e identidad son fijas; ciertos residuos cuya identidad tolera cierta variabilidad (es decir, se acepta uno de los pocos residuos especificados); y, opcionalmente, ciertos residuos cuya identidad es variable (es decir, se acepta cualquier residuo). En general, una porción característica de una sustancia (por ejemplo, de un polipéptido o proteína) es una que, además de la identidad de secuenciación y/o estructural especificada anteriormente, comparte al menos una característica funcional con la sustancia intacta pertinente. En algunas realizaciones, una porción característica puede ser biológicamente activa.

Secuencia característica: Una "secuencia característica" es una secuencia que se encuentra en todos los miembros de una familia de polipéptidos o ácidos nucleicos y, por lo tanto, puede ser utilizada por los expertos en la técnica para definir a los miembros de la familia.

Terapia combinada: La expresión "terapia combinada", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a aquellas situaciones en las que dos o más agentes farmacéuticos diferentes se administran en regímenes concomitantes para que el sujeto se exponga simultáneamente a ambos agentes. Cuando se utiliza en terapia de combinación, se pueden administrar dos o más agentes diferentes simultáneamente o por separado. Esta administración en combinación puede incluir la administración simultánea de los dos o más agentes en la misma forma de dosificación, la administración simultánea en formas de dosificación separadas, y la administración separada. Es decir, dos o más agentes se pueden formular juntos en la misma forma de dosificación y se administran simultáneamente. Alternativamente, dos o más agentes se pueden administrar simultáneamente, donde los agentes están presentes en formulaciones separadas. En otra alternativa, un primer agente se puede administrar solo seguido de uno o más agentes adicionales. En el protocolo de administración independiente, se pueden administrar dos o más agentes con unos minutos de diferencia, o con unas horas de diferencia, o con unos días de diferencia.

Comparable: La expresión "comparable", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un sistema, conjunto de condiciones, efectos o resultados que son lo suficientemente similares a un sistema de prueba, conjunto de condiciones, efectos o resultados, que permiten una comparación científicamente legítima. Los expertos en la técnica apreciarán y comprenderán qué sistemas, conjuntos de condiciones, efectos o resultados son suficientemente similares para ser "comparables" a cualquier sistema de prueba en particular, conjunto de condiciones, efectos o resultados como se describe en el presente documento.

Correlatos: El término "correlatos", tal como se utiliza en el presente documento, tiene su significado corriente de "mostrar una correlación con". Los expertos en la técnica apreciarán que dos características, elementos o valores muestran una correlación entre sí si muestran una tendencia a aparecer y/ o a variar, juntos. En algunas realizaciones, una correlación es estadísticamente significativa cuando su valor p es menor que 0,05; en algunas realizaciones, una correlación es estadísticamente significativa cuando su valor p es menor que 0,01. En algunas realizaciones, la correlación se evalúa mediante el análisis de regresión. En algunas realizaciones, una correlación es un coeficiente de correlación.

Homología: Tal como se utiliza en el presente documento, el término "homología" se refiere a la relación general entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. En algunas realizaciones, las moléculas poliméricas se consideran "homólogas" entre sí si sus secuencias son al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% idénticas. En algunas realizaciones, las moléculas poliméricas se consideran "homólogas" entre sí si sus secuencias son al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% similares.

Identidad: Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "identidad" se refiere a la relación general entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. El cálculo de la identidad porcentual de dos secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, se puede realizar alineando las dos secuencias con fines de comparación óptimos (por ejemplo, se puede inducir las huecos en una o ambas secuencias de ácido nucleico para una alineación óptima y las secuencias no idénticas pueden ser ignoradas a efectos de comparación). En determinadas realizaciones, la longitud de una secuencia alineada a efectos de comparación es al menos un 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o sustancialmente 100% de la longitud de la secuencia de referencia. A continuación, se comparan los nucleótidos en las posiciones de los nucleótidos correspondientes. Cuando es ocupada una posición en la primera secuencia por el mismo nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que debe introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias se puede realizar mediante un algoritmo matemático. Por ejemplo, la identidad porcentual entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Meyers y Miller (CABIOS, 1989, 4:11-17), que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0) utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede, alternativamente, determinarse utilizando el programa GAP en el paquete de software GCG utilizando una matriz NWSgapdna.CMP.

Mejorar, aumentar o reducir: Tal y como se utiliza en el presente documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir" o sus equivalentes gramaticales, indican valores que son relativos a una medición de referencia (por ejemplo, línea de base), como una medición tomada en condiciones comparables (por ejemplo, en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en el presente documento, o una medición en un individuo de control (o múltiples individuos de control) en ausencia de tratamiento) descrito en el presente documento.

Agente NMD: Como se utiliza en el presente documento, la expresión "agente NMD" se refiere a un polipéptido NMD, un ácido nucleico que codifica un polipéptido NMD, o un agente que aumenta el nivel y/o la actividad del polipéptido NMD. En algunas realizaciones, un agente NMD es un agente terapéutico.

Polipéptido NMD: Como se utiliza en el presente documento, la expresión "polipéptido NMD" se refiere a un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos una secuencia característica y/o muestra al menos 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71% o 70% de identidad con una proteína involucrada en la descomposición del ARNm mediada anti-sentido (por ejemplo, UPF1, UPF2, UPF3, SMG1, SMG5, SMG6 o SMG7). Una amplia variedad de secuencias NMD de moscas, vertebrados, y mamíferos son conocidas en la técnica, como las descritas en el presente documento; en algunas realizaciones, un polipéptido NMD comparte al menos una secuencia característica y / o muestra el grado especificado de identidad de secuencia global con uno de los UPF1, UPF2, UPF3, SMG1, SMG5, SMG6, o SMG7 establecidos en el presente documento (cada uno de los cuales puede ser considerado un polipéptido NMD de "referencia"). En algunas realizaciones, un polipéptido NMD, tal y como se describe en este documento, comparte al menos una actividad biológica con un polipéptido NMD de referencia como se establece en el presente documento. En algunas de esas realizaciones, la actividad biológica compartida se relaciona con la descomposición del ARNm mediada anti-sentido.

Polipéptido: Tal y como se utiliza en el presente documento, un "polipéptido", hablando en términos generales, es una cadena de al menos dos aminoácidos unidos entre sí por un enlace peptídico. En algunas realizaciones, un polipéptido puede incluir al menos 3-5 aminoácidos, cada uno de los cuales se une a otros por medio de al menos un enlace péptido. Los expertos en la técnica apreciarán que los polipéptidos a veces incluyen aminoácidos "no naturales" u otras entidades que, sin embargo, son capaces de integrarse en una cadena de polipéptidos, opcionalmente.

Proteína: Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "proteína" se refiere a un polipéptido (es decir, una cadena de al menos dos aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos). Las proteínas pueden incluir restos distintos de los aminoácidos (por ejemplo, pueden ser glicoproteínas, proteoglicanos, etc.) y/o pueden procesarse o modificarse de otro modo. Los expertos en la técnica apreciarán que una "proteína" puede ser una cadena de polipéptidos completa tal y como es producida por alguna célula (con o sin una secuencia de señal), o puede ser una porción característica de la misma. Los expertos apreciarán que una proteína puede incluir algunas veces más de una cadena de polipéptidos, por ejemplo, unidos por uno o más enlaces de disulfuro o asociados por otros medios. Los polipéptidos pueden contener L-aminoácidos, D-aminoácidos, o ambos y pueden contener cualquiera de una variedad de modificaciones de aminoácidos o análogos conocidos en la técnica. Las modificaciones útiles incluyen, por ejemplo, acetilación terminal, amidación, metilación, etc. En algunas realizaciones, las proteínas pueden comprender aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, aminoácidos sintéticos y sus combinaciones. El término "péptido" se utiliza generalmente para referirse a un polipéptido que tiene una longitud de menos de 100 aminoácidos, menos de unos 50 aminoácidos, menos de 20 aminoácidos, o menos de 10 aminoácidos.

Proporcionar: Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "proporcionar" se refiere a la realización de una manipulación que hace que una entidad de interés esté presente en un nivel y/o con una actividad superior a la observada en condiciones de otro modo comparables previo o sin ninguna manipulación. En algunas realizaciones, proporcionar consiste o comprende la administración de la propia entidad (sola o como parte de una composición); en alguna realización, proporcionar consiste o comprende la administración de un agente que cause un aumento en el nivel y/o la actividad de la entidad de interés. Por ejemplo, cuando la entidad de interés es o comprende un polipéptido, en algunas realizaciones, "proporcionar" el polipéptido consiste o comprende la administración del polipéptido (por ejemplo, a una célula, ya sea aislada o en un organismo); en algunas realizaciones, "proporcionar" el polipéptido consiste o comprende la administración de un ácido nucleico que codifica el polipéptido; en algunas realizaciones, "proporcionar" el polipéptido consiste o comprende la administración de un agente que resulta en una mayor expresión de una copia endógena del polipéptido (por ejemplo, estimulando una o más de una transcripción, procesamiento de ARN, traducción, etc. y/o inhibiendo un inhibidor de uno de estos).

Referencia: Una entidad de "referencia", sistema, cantidad, conjunto de condiciones, etc., es una contra la cual se compara una entidad de prueba, sistema, cantidad, conjunto de condiciones, etc. como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un individuo de "referencia" es un individuo de control que no está sufriendo ninguna forma de la enfermedad ELA o no es susceptible a esta tampoco; en algunas realizaciones, un individuo de "referencia" es un individuo de control afectado con la misma forma de la enfermedad de ELA que un individuo que esté siendo tratado y, opcionalmente, que tiene aproximadamente la misma edad que el individuo que está siendo tratado (para asegurar que las etapas de la enfermedad en el individuo tratado y el individuo o individuos control sean comparables).

Sujeto: Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto", "individuo" o "paciente" se refiere a cualquier organismo sobre el que las realizaciones de la invención pueden ser utilizadas o administradas, por ejemplo, con fines experimentales, diagnósticos, profilácticos y/o terapéuticos. Los sujetos típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y seres humanos; insectos; gusanos; etc.).

Célula diana o tejido diana: Tal y como se utiliza en el presente documento, las expresiones "célula diana" o "tejido diana" se refieren a cualquier célula, tejido u organismo que se vea afectado por la ELA a tratar, o cualquier célula, tejido u organismo en el que se exprese alguna proteína implicada en la ELA. En algunas realizaciones, las células diana, los tejidos diana u organismos diana incluyen aquellas células, tejidos u organismos en los que hay una cantidad detectable o anormalmente alta de FUS o TDP-43 (por ejemplo, comparable a la observada en pacientes que sufren o son susceptibles de sufrir ELA). En algunas realizaciones, las células diana, los tejidos diana u organismos diana incluyen aquellas células, tejidos u organismos que muestran una patología, síntoma o característica asociado a una enfermedad.

Agente terapéutico: Tal y como se utiliza en el presente documento, la frase "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que, cuando se administra a un sujeto, tiene un efecto terapéutico y/o provoca un efecto biológico y/o farmacológico deseado.

Régimen terapéutico: Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión "régimen terapéutico" se refiere a cualquier agente utilizado para aliviar, parcial o completamente, mejorar, paliar, inhibir, prevenir, retrasar la aparición de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno, y / o condición particular, reducir su gravedad y / o reducir la incidencia. Puede incluir la administración de una o más dosis, opcionalmente espaciadas por intervalos de tiempo regulares o variados. En algunas realizaciones, un régimen terapéutico es aquel cuyo rendimiento está diseñado para lograr y/o está correlacionado con el logro de un efecto particular (por ejemplo, en una población relevante de células, tejidos u organismos), por ejemplo, reduciendo o eliminando una condición o enfermedad perjudicial como la ELA. En algunas realizaciones, el tratamiento incluye la administración de uno o más agentes terapéuticos simultáneamente, secuencialmente o en diferentes momentos, durante la misma o diferente cantidad de tiempo. En algunas realizaciones, el "régimen de tratamiento" incluye métodos genéticos como la terapia génica, la eliminación de genes u otros métodos conocidos por inducir o reducir la expresión (por ejemplo, la transcripción, el procesamiento y/o la traducción de un producto genético en particular, como una transcripción primaria o ARNm).

Cantidad terapéuticamente eficaz: Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico (por ejemplo, un polipéptido NMD) que confiere un efecto terapéutico sobre el sujeto tratado, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Tal efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible por alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación o siente un efecto). En algunas realizaciones, la "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico o una composición efectiva para tratar, mejorar o prevenir (por ejemplo, el retraso en su aparición) de una enfermedad o condición relevante, y/o exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable, tal y como es aliviar los síntomas asociados con la enfermedad, prevenir o retrasar el inicio de la enfermedad, y/o también disminuir la gravedad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz debe comúnmente administrarse en un régimen de dosificación que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier agente terapéutico en particular, una cantidad terapéuticamente eficaz (y/o una dosis unitaria adecuada dentro de un régimen de dosificación eficaz) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, o de la combinación con otros agentes terapéuticos.

Alternativamente o adicionalmente, una cantidad específica terapéuticamente eficaz (y/o dosis unitaria) para cualquier paciente en particular puede depender de una variedad de factores, incluyendo la forma particular de ELA que se está tratando; la gravedad de la ELA; la actividad del agente terapéutico específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y/o la tasa de excreción o metabolismo del agente terapéutico específico empleado; la duración del tratamiento; y factores similares como son reconocidos en las artes médicas.

Tratamiento: Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento" (también "tratar" o "que trata") se refiere a cualquier administración de un agente terapéutico (por ejemplo, un polipéptido NMD) de acuerdo con un régimen terapéutico que logra un efecto deseado en el sentido de que alivia parcial o completamente, mejora, palia, inhibe, retrasa la aparición, reduce la gravedad y/o reduce la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad en particular, trastorno, y / o condición (por ejemplo, ELA); en algunas realizaciones, la administración del agente terapéutico de acuerdo con el régimen terapéutico está correlacionada con el logro del efecto deseado. Dicho tratamiento puede ser en un sujeto que no presente signos de enfermedad, ni de trastorno y/o condición relevante y/o en un sujeto que sólo presente signos iniciales de la enfermedad, trastorno y/o condición. Alternativa o adicionalmente, dicho tratamiento puede ser en un sujeto que presente uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o condición pertinentes. En algunas realizaciones, el tratamiento puede ser en un sujeto que haya sido diagnosticado como que sufre de una enfermedad, trastorno y/o condición relevantes. En algunas realizaciones, el tratamiento puede ser en un sujeto que se sabe que tiene uno o más factores de susceptibilidad que están estadísticamente correlacionados con un mayor riesgo del desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o condición pertinentes.

Descripción detallada de la invención

La presente descripción abarca el sorprendente descubrimiento de que la UPF1 puede prevenir la toxicidad neuronal debida a TDP-43. La UPF1 es una proteína involucrada en la destrucción del ARNm mediado sin sentido (NMD). En consecuencia, la descripción proporciona, entre otras cosas, diversas modalidades terapéuticas, incluyendo el uso del polipéptido NMD UPF1 para tratar la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

5 Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

La ELA, que existe en formas heredadas y aleatorias, se caracteriza por la degeneración de las neuronas motoras espinales, lo que conduce a la parálisis y la muerte. Mientras que la mayoría de las formas de ELA son esporádicas e idiopáticas (ELAE), alrededor del 10% de los casos se heredan de una manera mendeliana y se denomina en tal caso ELA familiar (ELAF). La presente invención proporciona composiciones y métodos útiles para el tratamiento de la ELA.

Mediante el análisis genético, se han identificado varios genes que causan las ELAF. Las primeras mutaciones fueron identificadas en SOD1, que codifica la superóxido dismutasa de cobre/zinc expresada ubicuamente. Estas variantes están involucradas en aproximadamente el 20% de los casos de ELAF en todo el mundo (Rosen et al., Nature 362:59-62 (1993)). Otros genes involucrados en las ELAF incluyen genes que codifican para alsin (ALS2), una proteína B de membrana asociada a vesículas (VAPB) (Nishimura et al., Am. J. Hum. Genet. 75:822-831 (2004)), senataxin (SETX) (Chen et al., Am. J. Hum. Genet. 74:1128-1135 (2004)), Proteína de unión al ADN TAR (TDP-43) (Sreedharan et al., Science 319:1668-1672 (2008)), fusionado en sarcoma o transubicado en liposarcoma (FUS/TLS) (Kwiatkowski et al., Science 323:1205-1208 (2009); Vance et al., Science 323:1208-1211 (2009)), y optineurin (OPTN) (Maruyama et al., Nature 465:223-226 (2010)). El FUS/TLS es una proteína de unión al ácido nucleico en la que, cuando se muta, puede causar un subconjunto de ELAF y también puede aumentar el riesgo de padecer la enfermedad esporádica. Aunque el FUS/TLS se encuentra por lo normal predominantemente en el núcleo, las formas mutantes patógenas de FUS/TLS pasan, y las inclusiones de forma, al citoplasma de las neuronas motoras espinales afectadas o la glía.

Los estudios de estos genes han proporcionado información sobre los procesos bioquímicos que pueden ser fundamentales en la ELA. Los mecanismos putativos de las neuronas motoras que reconocen la toxicidad incluyen la excitotoxicidad del glutamato, el daño oxidativo, la inhibición proteosómica, la disfunción mitocondrial, el estrés RE, defectos en el transporte axonal, deficiencia de señalización del factor de crecimiento y disfunción celular glial (Rothstein et al., Ann. Neurol. 65:S3-S9 (2009); Iliava et al., J. Cell Biol. 187:761-772 (2009)).

Descomposición del ARNm mediado sin sentido

En las células de mamíferos, la expresión de genes codificantes proteicos requiere una serie de pasos en los que el pre-mRNA se procesa hasta ARNm en el núcleo antes de que el ARNm se traduzca en proteínas en el citoplasma. Estos pasos están sujetos a controles de calidad para garantizar que sólo el ARNm completamente procesado se exporte al citoplasma (véase, por ejemplo, Maquat et al., Cell 104:173-176 (2001)). Una forma de control de calidad, llamada vigilancia del ARNm o descomposición del ARNm mediado por sin sentido (NMD), degrada los ARNm que terminan prematuramente la traducción más de 50-55 nucleótidos después de una unión exón-exón como un medio para prevenir la síntesis de proteínas truncadas potencialmente dañinas (ver, por ejemplo, Maquat, J. Cell Sci. 118:1773-1776 (2005); Nicholson et al., Biochem. Soc. Trans. 38:1615-20 (2010)). Un número de proteínas están involucradas en NMD en las células de mamíferos, incluyendo UPF1, UPF2, UPF3, SMG1, SMG5, SMG6 y SMG7 (Wittkopp et al., Mol. Cell Biol. 29:3517-3528 (2009); Rehwinkel et al., Trends Biochem. Sci. 31:639-646 (2006); Rehwinkel et al., RNA 11:1530-1544 (2005)). Según la presente descripción, cualesquiera polipéptidos NMD se pueden utilizar para tratar la ELA en los métodos descritos en este documento.

Secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos NMD

Los métodos, usos y composiciones descritos en este documento incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican el polipéptido NMD UPF1. Según la presente descripción, tales ácidos nucleicos (y polipéptidos) son útiles en el tratamiento de la ELA. En algunas realizaciones, tales ácidos nucleicos tienen o incluyen una secuencia de nucleótidos como se establece en SEQ ID NO:1, o elementos de secuencia característicos de los mismos o en los mismos. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos útiles muestran al menos 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71% o 70% de identidad de secuencia general con SEQ ID NO:1. Alternativamente o además, en algunas realizaciones, los ácidos nucleicos útiles incluyen al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más residuos contiguos que se encuentran en SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, se generan ácidos nucleicos útiles in vitro, en algunas realizaciones, se generan ácidos nucleicos in vivo útiles. En algunas realizaciones, se generan ácidos nucleicos útiles utilizando medios tecnológicos de ingeniería genética (por ejemplo, para la producción y/o la mutagénesis de una secuencia de referencia). Por poner sólo algunos ejemplos, en algunas realizaciones, las variantes de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 se generan utilizando técnicas tales como mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis química aleatoria, procedimientos de eliminación de exonucleasa III y técnicas de clonación estándar. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos útiles se generan utilizando procedimientos de síntesis y/o de modificación química.

Diversos métodos de fabricación de ácidos nucleicos que son "variantes" con respecto al ácido nucleico de referencia (por ejemplo, un ácido nucleico de origen natural u otro tipo) son habituales en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, procedimientos en los que las secuencias de ácido nucleico obtenidas a partir de aislados naturales son modificados para generar ácidos nucleicos que codifican polipéptidos con características que mejoran su valor en aplicaciones industriales o de laboratorio. En algunas de tales realizaciones de dichos procedimientos, se genera y caracteriza un gran número de secuencias de variantes que tienen una o más diferencias de nucleótidos con respecto a la secuencia obtenida del aislado natural. Típicamente, estas diferencias de nucleótidos resultan en cambios de aminoácidos con respecto a los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos de los aislados naturales.

Por ejemplo, se pueden crear variantes utilizando una PCR propensa a errores (véase, por ejemplo, Leung et al., *Technique* 1:11-15, 1989; y Caldwell et al., *PCR Methods Applic.* 2:28-33, 1992). En la PCR propensa a errores, la PCR se realiza en condiciones en las que la fidelidad de la copia de la ADN polimerasa es baja, de modo que se obtiene una alta tasa de mutaciones puntuales a lo largo de toda la longitud del producto PCR. Brevemente, en tales procedimientos, los ácidos nucleicos que se mutan se mezclan con cebadores de la PCR, tampón de reacción, $MgCl_2$, $MnCl_2$, Taq polimerasa, y una concentración adecuada de dNTPS para lograr una alta tasa de mutación puntual a lo largo de toda longitud del producto PCR. Por ejemplo, la reacción se puede realizar utilizando 20 fmoles de ácido nucleico a ser mutado, 30 pmol de cada cebador PCR, un tampón de reacción compuesto por 50 mM de KCl, 10 mM de Tris HCl (pH 8,3), y 0,01% de gelatina, $MgCl_2$ 7 mM, $MnCl_2$ 0,5 mM, 5 unidades de polimerasa Taq, 0,2 mM de dGTP, 0,2 mM de dATP, 1 mM de dCTP y 1 mM de dTTP. La PCR se puede realizar durante 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 45°C durante 1 min y 72°C durante 1 min. Sin embargo, se apreciará que estos parámetros pueden variar según corresponda. Los ácidos nucleicos mutagenizados se clonan en un vector apropiado y se evalúan las actividades de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos mutagenizados.

Las variantes también se pueden crear utilizando mutagénesis dirigida por oligonucleótidos para generar mutaciones específicas del sitio en cualquier ADN clonado de interés. La mutagénesis de oligonucleótidos se describe, por ejemplo, en Reidhaar-Olson et al., *Science* 241:53-57 (1988). En resumen, en tales procedimientos se sintetiza una pluralidad de oligonucleótidos bicatenario que llevan una o más mutaciones que se deben introducir al ADN clonado y se insertan en el ADN clonado para ser mutagenizados. Se recuperan clones que contienen el ADN mutagenizado y se evalúan las actividades de los polipéptidos que codifican.

Otro método para generar variantes es el montaje de la PCR. El montaje de la PCR implica la incorporación de un producto PCR a partir de una mezcla de pequeños fragmentos de ADN. Un gran número de reacciones PCR diferentes se producen en paralelo en el mismo vial, con los productos de una reacción cebando los productos de otra reacción. La PCR de montaje se describe, por ejemplo, en la Pat. de EE.UU. No. 5.965.408. Otro método de generación de variantes es la mutagénesis PCR sexual. En la mutagénesis PCR sexual, la recombinación homóloga forzada ocurre entre las moléculas de ADN de diferentes, pero altamente relacionadas, secuencias de ADN in vitro como resultado de una fragmentación aleatoria de la molécula de ADN basada en la homología de secuencia. Esto es seguido por la fijación del cruce por la extensión de cebador en una reacción PCR. La mutagénesis de la PCR sexual está escrita, por ejemplo, en Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91:10747-10751 (1994).

También pueden ser creadas variantes por mutagénesis in vivo. En algunas realizaciones, las mutaciones aleatorias en una secuencia de ácido nucleico se generan propagando la secuencia en una cepa bacteriana, tal como en una cepa de *E. coli*, que transmite mutaciones en una o más de las vías de reparación del ADN. Estas cepas "mutadoras" tienen una tasa de mutación aleatoria más alta que la de una cepa de tipo salvaje. La propagación de una secuencia de ADN en una de estas cepas generará mutaciones aleatorias dentro del ADN. Las cepas mutadoras adecuadas para su uso para la mutagénesis in vivo se describen, por ejemplo, en la Publicación PCT No. WO 91/16427.

También se pueden generar variantes utilizando mutagénesis de casete. En la mutagénesis de casete, una pequeña región de una molécula de ADN bicatenario se reemplaza por un "casete" de oligonucleótido sintético que difiere de la secuencia nativa. El oligonucleótido a menudo contiene una secuencia nativa completa y / o parcialmente aleatoria. La mutagénesis recursiva del conjunto también se puede utilizar para generar variantes. La mutagénesis recursiva del conjunto es un algoritmo para la ingeniería de proteínas (es decir, mutagénesis de proteínas) desarrollada para producir diversas poblaciones de mutantes fenotípicamente relacionados cuyos miembros difieren en la secuencia de aminoácidos. Este método utiliza un mecanismo de retroalimentación para controlar rondas sucesivas de mutagénesis combinatoria de casete. La mutagénesis de conjuntos recursivos se describe, por ejemplo, en Arkin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 89:7811-7815 (1992).

En algunas realizaciones, se crean variantes utilizando mutagénesis de conjunto exponencial. La mutagénesis de conjunto exponencial es un procedimiento para generar bibliotecas combinatorias con un alto porcentaje de mutantes únicos y funcionales, en el que pequeños grupos de residuos se aleatorizan en paralelo para identificar, en cada posición alterada, aminoácidos que conducen a proteínas funcionales. La mutagénesis de ensamblaje exponencial se describe, por ejemplo, en Delegrave et al., *Biotech. Res.* 11:1548-1552 (1993). La mutagénesis aleatoria y dirigida por el sitio se describen, por ejemplo, en Arnold, *Curr. Opin. Biotech.* 4:450-455 (1993). En algunas realizaciones, se crean variantes utilizando procedimientos de barajado en los que porciones de una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos distintos se fusionan para crear secuencias de ácido

nucleico quimérico que codifican polipéptidos quiméricos como se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nos. 5.965.408 y 5.939.250.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos para su uso de acuerdo con la presente descripción comprenden residuos de nucleótidos de origen natural. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos para su uso de acuerdo con la presente descripción incluyen uno o más "análogos" de nucleótidos. Un análogo de nucleótido es un nucleótido (es decir, una entidad que se incorpora a un polímero de ácido nucleico sin alterar significativamente la estructura y/o función de ese polímero) cuya estructura química difiere de la de los residuos de referencia de ácidos ribonucleicos o desoxirribonucleicos naturales adenina, guanina, citosina, timina y uracilo. En algunas realizaciones, un análogo de nucleótido difiere de su nucleótido de referencia en el resto base, el resto azúcar y/o la estructura de fosfato. En algunas realizaciones, un análogo de nucleótido contribuye a una o más características alteradas en un polímero de ácido nucleico en el que se incorpora en comparación con un polímero de ácido nucleico comparable que contiene su nucleótido de referencia en lugar del análogo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, dicho polímero que contiene el análogo muestra mejores estabilidad, hibridación y/o solubilidad.

En algunas realizaciones, las alteraciones del resto de la base que se encuentran en los análogos de nucleótidos incluyen desoxiuridina para la desoxitimidina y 5-metil-2'-desoxicitidina o 5-bromo-2'-desoxicitidina para la desoxicitodina. En algunas realizaciones, las alteraciones del resto del azúcar que se encuentran en los análogos de nucleótidos incluyen la modificación del 2'-hidroxilo del azúcar de ribosa para formar azúcares de 2'-O-metilo o 2'-O-alilo. En algunas realizaciones, las alteraciones de la estructura de la desoxirribosa fosfato que se encuentran en los análogos de nucleótidos incluyen ácidos nucleicos de morfonilo, en los que cada resto base se une a un anillo de seis miembros de morfolino o ácidos nucleicos peptídicos, en los que la estructura de desoxifosfato se sustituye por una estructura de pseudopéptido y se conservan las cuatro bases (véase, por ejemplo, Summerton et al., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:187-195 (1997); Hyrup et al., *Bioorgan. Med. Chem.* 4:5-23(1996)). Alternativa o adicionalmente, los análogos de nucleótidos pueden tener una estructura de fosfotioato o fosfoditioato, un fosforoamidito o una estructura de fosfotriester de alquilo.

En algunos casos, un polinucleótido UPF1 o variante para su uso de acuerdo con la presente descripción incluye alteraciones de codón o codones para optimizar la expresión en una célula huésped determinada. Por ejemplo, para la expresión en *E. coli*, un polinucleótido o variante NMP puede incluir uno o más codones alterados como se describe, por ejemplo, en Grosjean et al., *Gene* 18:199-209 (1982).

Polipéptidos NMD

Los métodos, usos y composiciones descritos utilizan el polipéptido NMD UPF1. Según la presente descripción, este polipéptido es útil en el tratamiento de la ELA. En algunas realizaciones, tal polipéptido útil en la práctica de la presente descripción tiene o incluye la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO:2, o elementos de secuencia característicos de la misma o en la misma. En algunas realizaciones, los polipéptidos útiles muestran al menos 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71% o 70% de identidad de secuencia global con SEQ ID NO:2. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, los polipéptidos útiles incluyen al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100 o 150 o más residuos de aminoácidos contiguos que se encuentran en SEQ ID NO:2.

En algunas realizaciones, el polipéptido útil difiere de su polipéptido de referencia (por ejemplo, un polipéptido que tiene o incluye una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO:2, o elementos de secuencia característicos de los mismos o en el mismo) por uno o más residuos de aminoácidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la diferencia es una sustitución conservadora o no conservadora de uno o más residuos de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras son aquellas que sustituyen un aminoácido dado en un polipéptido por otro aminoácido de características similares. Las sustituciones conservadoras típicas comportan los siguientes reemplazos: reemplazo de un aminoácido alifático, como alanina, valina, leucina y isoleucina, con otro aminoácido alifático; reemplazo de una serina con una treonina o viceversa; la sustitución de un residuo ácido, como el ácido aspártico y el ácido glutámico, por otro residuo ácido; la sustitución de un residuo que lleve un grupo de amida, como la asparagina y la glutamina, por otro residuo que lleve un grupo de amida; el intercambio de un residuo básico, como la lisina y la arginina, por otro residuo básico; y la sustitución de un residuo aromático, como la fenilalanina y la tirosina, por otro residuo aromático.

En algunas realizaciones, los polipéptidos UPF1 incluyen un grupo sustitutivo en uno o más residuos de aminoácidos. Otros polipéptidos útiles están asociados (por ejemplo, fusionados, vinculados o acoplados) con otro resto (por ejemplo, un péptido o molécula). Por ejemplo, los polipéptidos UPF1 útiles se pueden fusionar, vincular o acoplar a una secuencia de aminoácidos (por ejemplo, una secuencia líder, una secuencia secretora, una secuencia de proproteínas, un segundo polipéptido o una secuencia que facilite la purificación, el enriquecimiento o la estabilización del polipéptido). En otras determinadas realizaciones, el polipéptido incluye un agente de reconocimiento, por ejemplo, el agente de reconocimiento descrito en este documento.

Se conocen diversos métodos de fabricación de polipéptidos en la técnica y se pueden utilizar para preparar polipéptidos NMD como el UPF1. Por ejemplo, los polipéptidos NMD pueden ser producidos de forma recombinante mediante la utilización de un sistema de células huésped diseñado para expresar un ácido nucleico que codifique un

polipéptido NMD (por ejemplo, el ácido nucleico descrito en este documento). Alternativa o adicionalmente, el polipéptido NMD se puede producir activando un gen endógeno (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido NMD presente endógenamente en una célula). Alternativa o adicionalmente, el polipéptido NMD puede ser parcial o totalmente preparado por síntesis química. Alternativa o adicionalmente, el polipéptido NMD puede ser purificado a partir de fuentes naturales.

Cuando se produce de forma recombinante un polipéptido UPF1, se puede utilizar cualquier sistema de expresión. Los sistemas de expresión conocidos incluyen, entre otros, por ejemplo, células de huevo, baculovirus, plantas, levaduras o mamíferos.

En algunas realizaciones, el polipéptido UPF1 adecuado para su uso en los métodos descritos en este documento se produce en células de mamíferos. Ejemplos no limitativos de células de mamíferos que se pueden utilizar incluyen la línea de mieloma del ratón BALB/c (NSO/I, ECACC No: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6, CruCell, Leiden, Países Bajos); línea CVI renal de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea renal embrionaria humana (células 293 o 293 subclonadas para su crecimiento en el cultivo de la suspensión, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59,1977); línea celular de fibrosarcoma humano (por ejemplo, HT1080); células renales de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino +/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216, 1980); células sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251, 1980); células renales de monos (CV1 ATCC CCL 70); células renales de monos verdes africanos (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata de búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68, 1982); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Agentes de reconocimiento

Un agente NMD descrito en este documento se puede proporcionar en asociación con un agente de reconocimiento y/o puede incluirlo. El agente NMD utilizado en los métodos de la invención, para su uso en el tratamiento de acuerdo con la invención o en la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento según la invención es un polipéptido UPF1 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido UPF1.

La presente descripción no se limita a ningún agente de reconocimiento particular, y se puede utilizar una variedad de agentes de reconocimiento. Ejemplos de estos agentes de reconocimiento incluyen, entre otros, ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN y ADN), polipéptidos (por ejemplo, ligandos receptores, péptidos de señal, avidina, proteína A y proteínas de unión de antígeno), polisacáridos, biotina, grupos hidrófobos, grupos hidrófilos, fármacos y cualquier molécula orgánica que se una a las células diana o a los tejidos diana (por ejemplo, receptores de células diana o tejidos diana).

Los agentes de reconocimiento se pueden asociar con agentes NMD de varias maneras. Por ejemplo, los agentes de reconocimiento de polipéptidos se pueden acoplar o fusionar a un polipéptido NMD. En otras realizaciones, el agente de reconocimiento está asociado (por ejemplo, unidos covalente o no covalentemente) a un agente NMD con un enlace corto (por ejemplo, acoplamiento directo), medio (por ejemplo, utilizando enlaces bifuncionales de moléculas pequeñas como SPDP (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Ill.) o largos (por ejemplo, enlaces bifuncionales PEG (Nektar Therapeutics, Inc., San Carlos, California)).

En algunos casos, los agentes de reconocimiento son o comprenden proteínas de unión a antígenos o anticuerpos o porciones de unión de los mismos. Se pueden generar anticuerpos para permitir la focalización específica de antígenos o inmunogenes (por ejemplo, antígenos específicos de células diana o tejido diana). Tales anticuerpos incluyen, entre otros, anticuerpos policlonales; anticuerpos monoclonales o sus fragmentos de unión a antígeno; anticuerpos modificados como anticuerpos quiméricos, anticuerpos remodelados, o anticuerpos humanizados, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, Fv, Fab', Fab, F(ab')₂); o anticuerpos biosintéticos, por ejemplo, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de dominio único (DAB), Fvs o Fvs monocatenarios (scFv) (véase, por ejemplo, en Harlow et al., Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol I. Cold Spring Harbor Laboratory (Dic, 1, 1998). Zola, Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives, Springer Verlag (15 de diciembre de 2000; 1ª edición)). La unión de anticuerpos se puede realizar por cualquier método conocido, por ejemplo, mediante una unión covalente estándar a grupos de aminas libres (véase, por ejemplo, Torchilin et al., Hybridoma 6:229-240 (1987); Torchilin et al, Biochim. Biophys. Acta 1511:397-411 (2001); Masuko et al., Biomacromol. 6:800-884 (2005)).

En algunos casos, el agente de reconocimiento es o comprende un ácido nucleico (por ejemplo, ARN o ADN). En algunos ejemplos, los agentes de reconocimiento de ácido nucleico están diseñados para hibridarse mediante el emparejamiento de bases con un ácido nucleico determinado (por ejemplo, ADN cromosómico, ARNm o ARN ribosómico). En algunas situaciones, los agentes de reconocimiento de ácido nucleico se unen a un ligando en una célula diana o tejido diana. Por ejemplo, un ácido nucleico puede unirse al factor de crecimiento del nervio humano (Binkley et al., Nucl. Acids Res. 23:3198-205 (1995)). Los ácidos nucleicos que unen ligandos se identifican mediante métodos conocidos, como los procedimientos SELEX (véase, por ejemplo, los documentos Pat. de EE.UU.

Nº 5.475.096; 5.270.163; y 5.475.096; y WO 97/38134; WO 98/33941; y WO 99/07724). En algunas realizaciones, los agentes de reconocimiento pueden ser o comprender aptámeros, por ejemplo, que se unan a secuencias particulares.

En algunas realizaciones, el agente de reconocimiento se une a un receptor en la superficie de una célula cerebral para facilitar la captación celular. Por ejemplo, el agente de reconocimiento puede ser manosa-6-fosfato (M6P), oligosacáridos bis-fosforilados, o IGF-II, que son útiles para detectar al receptor de la manosa-6-fosfato independiente del catión (CI-MPR) en una célula cerebral. En algunas realizaciones, el agente de reconocimiento es o comprende ascorbato, que es tomado por un transportador de la vitamina C dependiente del sodio (SVCT2), (véase, por ejemplo, Tsukaguchi et al., *Nature* 399:70-75 (1999)), que es útil para reconocer una célula cerebral.

Administración terapéutica

Los agentes NMD (por ejemplo, polinucleótidos NMD, un ácido nucleico que codifique un polipéptido NMD o un agente que aumente el nivel y/o la actividad del polipéptido NMD) descritos en el presente documento se pueden utilizar para tratar la ELA, por ejemplo, sujetos que sufren o son susceptibles de sufrir ELA. El agente NMD para su uso en el tratamiento según la invención o en la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento según la invención es un polipéptido UPF1 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido UPF1. La ruta y/o el modo de administración del agente NMD descrito en este documento pueden variar dependiendo de los resultados deseados. Todo experto en la técnica, por ejemplo, los médicos, son conscientes de que los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada, por ejemplo, una respuesta terapéutica.

Las vías de administración incluyen, entre otras, intradérmicas, intramusculares, intraperitoneales, intravenosas, subcutáneas, intranasales, epidurales, orales, sublinguales, intracerebrales, intratecales, intravaginales, transdérmicas, rectales, por inhalación o tópicas, particularmente en los oídos, nariz, ojos o piel. El modo de administración queda a discreción del practicante.

En algunos casos, el agente NMD descrito en este documento (por ejemplo, una formulación farmacéutica de un agente NMD) puede cruzar eficazmente la barrera hematoencefálica y entrar en el cerebro. En otros casos, el agente NMD puede ser administrado utilizando técnicas diseñadas para permitir o para mejorar la capacidad de la formulación para cruzar la barrera hematoencefálica. Estas técnicas se conocen en la técnica (por ejemplo, WO 89/10134; Cloughesy et al., *J. Neurooncol.* 26:125-132 (1995); y Begley, J. *Pharm. Pharmacol.* 48:136-146 (1996)). Los componentes de una formulación también se pueden modificar (por ejemplo, químicamente) usando métodos conocidos en la técnica para facilitar su entrada en el SNC.

Por ejemplo, los métodos físicos de transporte de composiciones a través de la barrera hematoencefálica incluyen, entre otros, eludir la barrera hematoencefálica por completo, o mediante la creación de aberturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos de elusión incluyen, entre otros, la inyección directa en el cerebro (ver, por ejemplo, Papanastassiou et al., *Gene Therapy* 9: 398-406 (2002)) e implantar un dispositivo de administración en el cerebro (ver, por ejemplo, Gill et al., *Nature Med.* 9: 589- 595 (2003); y Glia Wafers®, Guildford Pharmaceutical). Los métodos para crear aberturas en la barrera incluyen, entre otros, ultrasonido (ver, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE.UU. No. 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, por administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, Vols 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989)), permeabilización, por ejemplo, por bradiquinina o permeabilizador A-7 (véase, por ejemplo, los documentos Pat. de EE.UU. Nos. 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206 y 5.686.416), y la transfección de neuronas que se extienden por la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican un agente NMD (véase, por ejemplo, Publ. Patente de EE.UU. Nº. 20030083299).

Los métodos basados en lípidos también se pueden utilizar para transportar un agente NMD a través de la barrera hematoencefálica. Los métodos ejemplares y no limitativos incluyen encapsular un agente NMD en liposomas que están acoplados al agente de reconocimiento descrito en este documento (por ejemplo, un anticuerpo que se une a los receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Publ. Patente de EE.UU. Nº. 20020025313)). En otras realizaciones, el agente de reconocimiento está recubierto de partículas de lipoproteínas de baja densidad (véase, por ejemplo, la Publ. Patente de EE.UU. Nº. 20040204354) o una polipoproteína E (véase, por ejemplo, Publ. Patente de EE.UU. Nº. 20040131692).

En algunas realizaciones, el agente NMD se administra al SNC de un sujeto, por ejemplo, mediante la administración en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de un sujeto que necesita tratamiento. Tal como se utiliza en el presente documento, la administración intratecal (también conocida como inyección intratecal) se refiere a una inyección en el canal espinal (espacio intratecal que rodea la médula espinal). Se pueden utilizar varias técnicas, incluyendo, sin limitación, la inyección cerebroventricular lateral a través de un agujero de rebaba o una punción cisternal o lumbar o similares. Los métodos ejemplares se describen en Lazorthes et al., *Adv. Tech. Stand. Neurosurg.* 18:143-192 (1991), y Omay, *Cancer Drug Deliv.* 1:169-179 (1984).

En algunos casos, el agente NMD descrito en este documento debe administrarse localmente. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante perfusión local durante la cirugía, aplicación tópica (por ejemplo, en una crema o loción), por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o enema, o por medio de un implante, siendo dicho

implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, como las membranas sialásticas, o fibras. En algunas situaciones, el agente NMD descrito en este documento se introduce en el sistema nervioso central, sistema circulatorio o tracto gastrointestinal por cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intraventricular, inyección intratecal, inyección paraspinal, inyección epidural, enema y por inyección adyacente a un nervio periférico.

Específicamente, se pueden utilizar varios dispositivos para la entrega intratecal de los agentes NMD descritos en este documento. En algunas realizaciones, el dispositivo para la administración intratecal contiene un puerto de entrada de fluidos (por ejemplo, un puerto inyectable); un cuerpo hueco (por ejemplo, un catéter) que tiene un primer orificio de flujo en comunicación fluida con el puerto de entrada del fluido y un segundo orificio de flujo configurado para su inserción en la médula espinal; y un mecanismo de aseguramiento para asegurar la inserción del cuerpo hueco en la médula espinal. Se pueden utilizar otros dispositivos para efectuar la administración intratecal de una composición terapéutica. Por ejemplo, las formulaciones que contienen agentes NMD se pueden administrar utilizando un reservorio de Ommaya que es común que se utilice para la administración intratecal de medicamentos para la carcinomatosis meníngea (Lancet 2: 983-84, 1963). Más específicamente, el tubo ventricular debe ser insertado a través de un agujero formado en el cuerno anterior y debe ser conectado a un depósito Ommaya instalado bajo el cuero cabelludo, y el depósito debe ser perforado subcutáneamente para entregar intratecalmente el agente NMD, que se inyecta en el depósito. Otros dispositivos para la administración intratecal de composiciones terapéuticas o formulaciones a un individuo se describen en el documento Pat. de EE.UU. No 6.217.552. Alternativamente, el agente NMD puede administrarse intratecalmente, por ejemplo, mediante una sola inyección o por perfusión continua. Debe entenderse que el tratamiento de dosificación puede estar en la forma de una administración de dosis única o dosis múltiples.

En algunas realizaciones, la administración intratecal se puede realizar mediante punción lumbar (es decir, bolo lento) o a través de un sistema de administración de catéter de puerto (es decir, perfusión o bolo).

En relación con la administración intravenosa, el volumen de dosis única adecuado para la administración intratecal suele ser pequeño. Típicamente, la administración intratecal mantiene el equilibrio de la composición del LCR, así como la presión intracraneal del sujeto. En algunas realizaciones, la administración intratecal se realiza sin la retirada correspondiente del LCR en el sujeto. En algunas realizaciones, un volumen de dosis única adecuado puede ser, por ejemplo, inferior a aproximadamente 10 ml, 8 ml, 6 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1,5 ml, 1 ml o 0,5 ml. En algunas realizaciones, el volumen de dosis única adecuado puede ser de aproximadamente 0,5-5 ml, 0,5-4 ml, 0,5-3 ml, 0,5-2 ml, 0,5-1 ml, 1-3 ml, 1-5 ml, 1,5-3 ml, 1-4 ml o 0,5-1,5 ml. En algunas realizaciones, la administración intratecal de acuerdo con el presente invento implica una cantidad deseada de LCR que se retirará primero. En algunas realizaciones, menos de aproximadamente 10 ml (p. ej., menos de aproximadamente 9 ml, 8 ml, 7 ml, 6 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml) de LCR se retirará primero antes de la administración intratecal. En esos casos, el volumen de dosis única adecuado puede ser, por ejemplo, superior a aproximadamente 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml, o 20 ml.

La administración pulmonar también se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante, o mediante perfusión en un fluorocarbono o un tensioactivo pulmonar sintético.

El agente NMD descrito en este documento puede formularse como una composición farmacéutica que incluya una cantidad adecuada de un excipiente fisiológicamente aceptable (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences pp. 1447-1676 (Alfonso R. Gennaro, ed., 19ª ed. 1995)). Estos excipientes fisiológicamente aceptables pueden ser, por ejemplo, líquidos, como agua y aceites, incluidos los de origen petrolero, animal, vegetal o sintético, como el aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite mineral, el aceite de sésamo y similares. Los excipientes fisiológicamente aceptables pueden ser solución salina, goma acacia, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además, se pueden utilizar agentes auxiliares, estabilizadores, espesantes, lubricantes y colorantes. En una situación, los excipientes fisiológicamente aceptables son estériles cuando se administran a un animal. El excipiente fisiológicamente aceptable debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de los microorganismos. Las soluciones salinas de soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como excipientes líquidos, especialmente para soluciones inyectables. Los excipientes fisiológicamente aceptables adecuados también incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel sílice, estearato sódico, glicerol monoestearato, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Otros ejemplos de excipientes fisiológicamente aceptables adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences pp. 1447-1676 (Alfonso R. Gennaro, ed., 19ª ed. 1995). Las composiciones farmacéuticas, si se desean, también pueden contener pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tampón del pH.

Los portadores de líquidos se pueden utilizar en la preparación de soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires. El agente NMD descrito en este documento puede ser suspendido en un portador de líquidos farmacéuticamente aceptable como agua, un disolvente orgánico, una mezcla de ambos, o aceites o grasas farmacéuticamente aceptables. El portador líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos adecuados, incluidos solubilizantes, emulsionantes, tampones, conservantes, edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, colores, reguladores de la viscosidad, estabilizantes u osmoreguladores. Ejemplos

adecuados de portadores de líquidos para la administración oral y parenteral incluyen agua (particularmente conteniendo los aditivos descritos en este documento, por ejemplo, derivados de celulosa, incluyendo solución de carboximetilcelulosa sódica), alcoholes (incluyendo alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos, por ejemplo, glicoles) y sus derivados, y aceites (por ejemplo, aceite de coco fraccionado y aceite de araquís). Para la administración parenteral el portador también puede ser un éster aceitoso como el oleato etílico y el miristato de isopropilo. Los portadores de líquidos pueden estar en forma líquida estéril para su administración. El portador líquido para composiciones presurizadas puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propelente farmacéuticamente aceptable.

En otros casos, el agente NMD descrito en este documento está formulado para su administración intravenosa. Las composiciones para administración intravenosa pueden comprender un tampón acuoso isotónico estéril. Las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones para la administración intravenosa pueden incluir opcionalmente un anestésico local como la lidocaína para disminuir el dolor en el lugar de la inyección. Los ingredientes se pueden suministrar por separado o mezclarse en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente sellado como una ampolla o un sobre que indique la cantidad de agente activo. Cuando un agente NMD descrito en este documento deba administrarse por perfusión, se puede dispensar, por ejemplo, con un frasco de perfusión que contenga agua estéril de grado farmacéutico o una solución salina. Cuando un agente NMD descrito en este documento se administre por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

El agente NMD descrito en este documento se puede administrar rectal o vaginalmente en la forma de un supositorio convencional. Las formulaciones en supositorio se pueden preparar utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica a partir de materiales tradicionales, incluyendo manteca de cacao, con o sin la adición de ceras para alterar el punto de fusión del supositorio, y glicerina. También se pueden utilizar bases de supositorios solubles en agua, como polietilenglicol de diversos pesos moleculares.

La cantidad del agente NMD descrito en este documento que es eficaz para el tratamiento de la ELA se puede determinar utilizando técnicas clínicas estándar conocidas por los expertos en la técnica. Además, los ensayos in vitro o in vivo se pueden emplear opcionalmente para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear también puede depender de la vía de administración, la condición, la gravedad de la condición que se está tratando, así como varios factores físicos relacionados con la persona que está siendo tratada, y se puede decidir según al juicio del profesional de la salud.

Las composiciones descritas en el presente documento (por ejemplo, las cantidades terapéuticamente efectivas de las composiciones descritas en el presente documento) pueden administrarse como administraciones individuales o como administraciones múltiples. Dichas composiciones se pueden administrar a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza, gravedad y extensión de la condición del sujeto (por ejemplo, ELA). En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico (por ejemplo, un agente NMD) se administra intratecalmente y periódicamente a intervalos regulares (por ejemplo, una vez al año, una vez cada seis meses, una vez cada cinco meses, una vez cada tres meses, bimestralmente (una vez cada dos meses), mensualmente (una vez al mes), quincenalmente (una vez cada dos semanas), o semanalmente).

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se determina en gran medida sobre la base de la cantidad total del agente terapéutico contenido en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. Generalmente, la cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para lograr un beneficio significativo para un sujeto (por ejemplo, tratar, modular, curar, prevenir y/o mejorar la ELA). Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad suficiente para lograr el efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, tal como una cantidad suficiente para tratar la ELA o sus síntomas. Generalmente, la cantidad del agente terapéutico (por ejemplo, un agente NMD) administrado al sujeto necesitado de éste dependerá de las características del sujeto. Tales características incluyen la condición, gravedad de la enfermedad, estado de salud general, edad, sexo y peso corporal del sujeto. Todo experto en la técnica será capaz de determinar fácilmente las dosis adecuadas dependiendo de estos y otros factores relacionados. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos dianas y subjetivos para identificar intervalos de dosificación óptimos. La cantidad terapéuticamente eficaz se puede administrar en un régimen de dosificación que puede incluir múltiples dosis unitarias.

En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz oscila entre aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 500 mg/kg de peso cerebral, por ejemplo, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 400 mg/kg de peso cerebral, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral hasta 300 mg/kg de peso cerebral, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral hasta 200 mg/kg de peso cerebral, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 100 mg/kg de peso cerebral, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral hasta 90 mg/kg de peso cerebral, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral hasta 80 mg/kg de peso cerebral, , desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral hasta 70 mg/kg de peso cerebral, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral hasta 60 mg/kg de peso cerebral, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral hasta 50 mg/kg de peso cerebral, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral hasta 40 mg/kg de peso cerebral, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral a 30 mg/kg de peso cerebral, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral hasta 25 mg/kg de peso cerebral, desde aproximadamente

0,005 mg/kg de peso cerebral hasta 20 mg/kg de peso cerebral, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral hasta 15 mg/kg de peso cerebral, desde aproximadamente 0,005 mg/kg de peso cerebral hasta 10 mg/kg de peso cerebral.

En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es mayor que aproximadamente 0,1 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 0,5 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 1,0 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 3 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 5 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 10 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 15 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 20 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 30 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 40 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 50 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 60 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 70 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 80 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 90 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 100 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 150 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 200 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 250 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 300 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 400 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 450 mg/kg de peso cerebral, mayor que aproximadamente 500 mg/kg de peso cerebral.

En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz se puede expresar como mg/kg de peso corporal. Como todo experto en la técnica apreciaría, los pesos cerebrales y los pesos corporales pueden estar correlacionados (véase, por ejemplo, Dekaban, Ann. Neurol. 4:345-56 (1978)).

En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz puede expresarse como mg/15 cc de líquido ceforraquídeo. Como apreciarían los expertos en la técnica, las dosis terapéuticamente efectivas basadas en pesos cerebrales y pesos corporales se pueden convertir en mg/15 cc de LCR. Por ejemplo, el volumen de LCR en humanos adultos es de aproximadamente 150 ml (Johanson et al., Cerebrospinal Fluid Res. 14:5:10 (2008)). Por lo tanto, las inyecciones monodosis de 0,1 mg a 50 mg de proteína en adultos serían de aproximadamente 0,01 mg/15 cc de LCR (0,1 mg) a 5,0 mg/15 cc de dosis de LCR (50 mg) en adultos.

Debe entenderse además que para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos se pueden ajustar con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de un agente NMD y que los intervalos de dosificación establecidos en este documento son ejemplares solamente y no están destinados a limitar el alcance o la práctica de la invención reivindicada.

En algunos casos, la composición farmacéutica descrita en este documento está en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como una tableta, cápsula, polvo, solución, suspensión, emulsión, gránulo, o supositorio. En tal forma, la composición farmacéutica se puede subdividir en dosis unitarias que contengan cantidades apropiadas de un agente NMD descrito en este documento. La forma de dosificación unitaria puede ser un paquete de una composición farmacéutica, por ejemplo, polvos envasados, viales, ampollas, jeringas precargadas o sobres que contienen líquidos. La forma de dosificación unitaria puede ser, por ejemplo, una cápsula o tableta por sí misma, o puede ser un número adecuado de cualquiera de estas composiciones en la forma de un paquete. Tal forma de dosificación unitaria puede contener de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg, y se puede administrar en una sola dosis o en dos o más dosis divididas.

Terapia genética

En las realizaciones en las que el agente NMD consiste o comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido UPF1, la presente descripción incluye métodos de administración de dicho ácido nucleico a un sujeto para tratar la ELA.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el polipéptido UPF1 se inserta en un vector viral para su administración a un sujeto. Por ejemplo, se pueden utilizar vectores retrovirales como sistema de administración recombinante para transferir ácidos nucleicos que codifican polipéptidos UPF1 in vivo (ver, por ejemplo, Dropulic, Hum. Gene Ther. 22:649-57 (2011); y Kumar et al., Curr. Gene Ther. 11:144-53 (2011)). Los retrovirus útiles en los métodos de la presente descripción incluyen, entre otros, el virus de la leucemia murina (MLV), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus equino de la anemia infecciosa (EIAV), virus tumoral mamario de ratón (MMTV) virus del sarcoma de Rou (RSV), virus del sarcoma de Fujinami (FuSV), virus del osteosarcoma murino FBR (FBR MSV), virus del sarcoma murino de Moloney (Mo-MSV), el virus murino de la leucemia de Abelson (A-MLV), el virus 29 de la mielocitomatosis aviar (MC29), el virus de la eritroblastosis aviar (AEV) y todos los demás retrovirales, incluidos los lentivirus (véase, por ejemplo, Coffin et al., "Retroviruses", 1997 Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds: J M Coffin, S M Hughes, H E Varmus, pp. 758-763)). Un retrovirus defectuoso de replicación se puede empaquetar en viriones que se pueden utilizar para infectar una célula diana mediante el uso de un virus auxiliar por técnicas estándar (ver, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Secciones 9.10-9.14).

En otras realizaciones, los vectores derivados del adenovirus se utilizan para suministrar ácidos nucleicos que codifican polipéptidos UPF1. El genoma de un adenovirus puede ser manipulado de tal manera que codifique y exprese un polipéptido UPF1, pero se inactiva en términos de su capacidad para replicarse en un ciclo de vida viral lítico normal (ver, por ejemplo, Berkner et al. (1988) *BioTechniques* 6:616; Rosenfeld et al. (1991) *Science* 252:431-434; y Rosenfeld et al. (1992) *Cell* 68:143-155). Los vectores adenovirales adecuados útiles en los métodos de la presente descripción incluyen los derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 d1324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7, etc.).

En algunas realizaciones, se utiliza un virus adeno-asociado (AAV) para suministrar el ácido nucleico que codifica el polipéptido UPF1 (véase, por ejemplo, Muzyczka et al. (1992) *Curr. Topics in Micro. and Immunol.* 158:97-129). Se ha introducido una variedad de ácidos nucleicos en diferentes tipos de células utilizando vectores AAV (véase, por ejemplo, Hermonat et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470; Tratschin et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Wondisford et al. (1988) *Mol. Endocrinol.* 2:32-39; Tratschin et al. (1984) *J. Virol.* 51:611-619; y Flotte et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790). Los AAV especialmente útiles incluyen aquellos que normalmente infectan a los seres humanos (por ejemplo, los serotipos 1, 2, 3A, 3B, 4, 5 y 6) o los primates (por ejemplo, los serotipos 1 y 4).

En otras realizaciones, los métodos no virales son útiles para suministrar un ácido nucleico que codifica un polipéptido UPF1 a un sujeto. Estos métodos no virales de transferencia de genes pueden explotar los mecanismos utilizados normalmente por las células de mamíferos para la utilización y el transporte intracelular de macromoléculas. Por ejemplo, se pueden utilizar sistemas de administración liposómicos, conjugados de polilisina y cubiertas virales artificiales. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el polipéptido UPF1 está atrapado en liposomas que llevan cargas positivas en su superficie (por ejemplo, lipofectinas). En algunas realizaciones, el liposoma se puede conjugar con un agente de reconocimiento descrito en este documento (véase, por ejemplo, Mizuno et al. (1992) *No Shinkei Geka* 20:547-551).

Ciertos polímeros catiónicos ("agentes de complejidad") conocidos por unirse espontáneamente y condensar ácidos nucleicos en nanopartículas también se pueden utilizar incluyendo, por ejemplo, proteínas naturales, péptidos o derivados, así como polímeros catiónicos sintéticos como polietilénimina (PEI), polilisina (PLL), etc. Muchos polímeros útiles contienen ambos grupos amino cargables que permiten la interacción iónica con fosfato de ADN cargado negativamente, y una región degradable, como un enlace de éster hidrolizable. Ejemplos de estos incluyen, sin limitación, poli(L-ácido alfa-(4-aminobutil)-glicólico), red poli(éster de amino), y poli(ésteres de beta-amino). Estos agentes de complejación pueden proteger el ADN contra la degradación, por ejemplo, mediante nucleasas, componentes séricos, etc., y crear una carga superficial menos negativa que pueda facilitar el paso a través de membranas hidrofóbicas (por ejemplo, citoplasmática, lisosómica, endosómica, nuclear) de la célula. Ciertos agentes complejantes facilitan eventos de tráfico intracelular como escapes endosómicos, transporte citoplasmático y entrada nuclear, y pueden disociarse del ácido nucleico.

Terapia basada en células

El polinucleótido UPF1 también se puede proporcionar ventajosamente a una célula ex vivo, seguido de la administración de la célula viva al sujeto. En algunas realizaciones, las células primarias o secundarias están genéticamente diseñadas para expresar un polipéptido UPF1. Tales células se pueden obtener a partir de una variedad de tejidos e incluyen tipos celulares que se pueden mantener propagados en el cultivo. Por ejemplo, las células primarias y secundarias incluyen fibroblastos, células endoteliales, células gliales y células neuronales. En algunas realizaciones, las células primarias se obtienen a partir de un individuo al que se le va a administrar una célula primaria o secundaria genéticamente diseñada. También se pueden obtener células primarias a partir de un donante (que no sea el receptor) de la misma especie u otra especie (por ejemplo, ratón, rata, conejo, gato, perro, cerdo, vaca, pájaro, oveja, cabra, caballo).

Las células primarias o secundarias (por ejemplo, de origen vertebrado o de mamíferos) pueden ser transfectadas con un ácido nucleico que codifica un polipéptido UPF1. En algunas realizaciones, la célula es transfectada con una secuencia de ácido nucleico exógena que incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido UPF1 y una secuencia de ácido nucleico adicional (por ejemplo, una secuencia reguladora, por ejemplo, un promotor, que causa la expresión, por ejemplo, una expresión inducible o sobre-regulación de una secuencia UPF1 endógena). Las células primarias o secundarias transfectadas también pueden incluir un ADN que codifique un marcador seleccionable que confiera un fenotipo seleccionable, facilitando su identificación y aislamiento.

Las células que han sido modificadas para expresar una proteína recombinante para su uso en el tratamiento de enfermedades también son muy conocidas. Véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. No. 5.399.346 que describe métodos para introducir un ácido nucleico en una célula humana primaria para su introducción en un ser humano. Aunque el uso de células humanas para la terapia ex vivo se prefiere en algunas realizaciones, otras células como las células bacterianas pueden ser implantadas en la vasculatura de un sujeto, liberando continuamente el agente terapéutico. Véase, por ejemplo, Pat. de EE.UU. 4.309.776 y 5.704.910.

Kits

El agente NMD descrito en este documento (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un agente NMD) se puede proporcionar en un kit. En algunos casos, el kit incluye (a) un recipiente que contiene el agente NMD descrito en el presente documento (por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende el agente NMD) y, opcionalmente (b) material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, instructivo, comercial u otros tipos de materiales relacionados con los métodos descritos en el presente documento y/o el uso de un agente NMD, por ejemplo, para beneficio terapéutico.

El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En algunos casos, el material informativo puede incluir información sobre la producción de un agente NMD, el peso molecular de un agente NMD, la concentración, la fecha de caducidad, la información por lotes o del sitio de producción, etc. En otras situaciones, el material informativo se refiere a un agente NMD que se debe administrar, por ejemplo, en una cantidad, forma o modo de administración adecuado (por ejemplo, una dosis, forma de dosificación o modo de administración descrito en este documento).

En algunos casos, el material informativo, por ejemplo, las instrucciones, se proporcionan impresos, por ejemplo, en un texto impreso, dibujo y/o fotografía, por ejemplo, una etiqueta o una hoja impresa. El material informativo también se puede proporcionar en otros formatos, como Braille, material informático, de grabación de vídeos o grabación de audios. En otros casos, el material informativo del kit es información de contacto, por ejemplo, una dirección física, dirección de correo electrónico, sitio web o número de teléfono, donde el usuario del kit puede obtener información sustantiva sobre el agente NMD en él y / o su uso en los métodos descritos en el presente documento. El material informativo también se puede proporcionar en cualquier combinación de formatos.

Además de un agente NMD, el kit puede incluir otros ingredientes, como un disolvente o tampón, un estabilizador o un conservante. El kit también puede incluir otros agentes, por ejemplo, un segundo o un tercer agente, por ejemplo, otros agentes terapéuticos. Los componentes se pueden proporcionar en cualquier forma, por ejemplo, líquida, seca o liofilizada. Los componentes pueden ser sustancialmente puros (aunque se pueden combinar juntos o administrarse separados entre sí) y / o estériles. Cuando los componentes se proporcionan en una solución líquida, la solución líquida puede ser una solución acuosa, tal como una solución acuosa estéril. Cuando los componentes se proporcionan como una forma seca, la reconstitución generalmente es mediante la adición de un disolvente adecuado. El disolvente, por ejemplo, agua estéril o tampón, se puede proporcionar opcionalmente en el kit.

El kit puede incluir uno o más recipientes para un agente NMD u otros agentes. En algunos casos, el kit contiene recipientes, divisores o compartimentos separados para el agente NMD y el material informativo. Por ejemplo, el agente NMD puede estar contenido en una botella, vial o jeringa, y el material informativo puede estar contenido en un manguito o paquete de plástico. En otras situaciones, los elementos separados del kit se encuentran dentro de un único recipiente no dividido. Por ejemplo, el agente NMD puede estar contenido en una botella, vial o jeringa que se haya adjuntado al material informativo en forma de una etiqueta. En algunos casos, el kit puede incluir una pluralidad (por ejemplo, un envase) de envases individuales, conteniendo cada uno una o más formas de dosificación unitaria (por ejemplo, la forma de dosificación descrita en este documento) de un agente NMD. Los recipientes pueden incluir una dosis unitaria, por ejemplo, una unidad que incluya un agente NMD. Por ejemplo, el kit puede incluir una pluralidad de jeringas, ampollas, paquetes de papel de aluminio, blísters o dispositivos médicos, por ejemplo, cada uno de los cuales conteniendo una dosis unitaria. Los recipientes de los kits pueden ser herméticos, resistentes al agua (por ejemplo, impermeables a los cambios de humedad o evaporación) y/o herméticos.

El kit puede incluir opcionalmente un dispositivo adecuado para la administración de un agente NMD, por ejemplo, una jeringa u otro dispositivo de administración adecuado. El dispositivo se puede proporcionar precargado con un agente NMD, por ejemplo, en una dosis unitaria, o puede estar vacío, pero ser adecuado para la carga.

Tratamiento de la ELA

La presente invención abarca el sorprendente hallazgo de que los agentes NMD son útiles, entre otras cosas, en el tratamiento o la prevención (es decir, retraso de la aparición) de la ELA. UPF1 fue identificado inicialmente como uno de los muchos genes capaces de restablecer la toxicidad mediada por FUS/TLS en un modelo de levadura (Ju et al., PLoS Biol. 9:e1001052 (2011)). Sin embargo, la presente constatación de que la expresión de UPF1 en células neuronales que expresan TDP-43 reduce la toxicidad celular es sorprendente, especialmente teniendo en cuenta la constatación de que la expresión de UPF1 no tuvo ningún efecto sobre los niveles en citoplasma de FUS/TLS o TDP-43 en las células neuronales. En consecuencia, en algunas realizaciones, se debe proporcionar al sistema nervioso central de un sujeto, por ejemplo, a un sujeto que sufre o es susceptible de sufrir la ELA, un agente NMD, un polipéptido UPF1 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido UPF1. En algunas realizaciones, el agente NMD debe proporcionarse a una o más de las células diana o tejidos del cerebro, la médula espinal y/o los órganos periféricos. En algunas realizaciones, las células o tejidos diana incluyen las células o tejidos que muestran una patología, síntoma o característica asociada a la enfermedad. En algunas realizaciones, las células o tejidos diana incluyen aquellas células o tejidos en los que el TDP-43 se expresa a un nivel elevado, por ejemplo, las células en las que TDP-43 se expresa a un nivel elevado en el citoplasma de las células. Tal y como se utiliza en el presente documento, el tejido diana puede ser un tejido diana cerebral, un tejido diana de la médula espinal y/o un tejido diana periférico.

Las composiciones descritas en el presente documento se pueden proporcionar directamente en el SNC de un sujeto que sufre o está en riesgo de desarrollar ELA, logrando así una concentración terapéutica dentro de las células y tejidos afectados del SNC (por ejemplo, el cerebro). Por ejemplo, se puede proporcionar un polipéptido UPF1 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido UPF1 a las células o tejidos diana del cerebro, la médula espinal y/o los órganos periféricos para tratar la ELA. Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a la mejora de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, la prevención o el retraso de la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, y / o disminuir la gravedad o frecuencia de uno o más síntomas de la enfermedad.

En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la mitigación parcial o completa, mejora, alivio, inhibición, retraso del inicio, reducción de la gravedad y / o incidencia del deterioro neurológico en un paciente que sufre o es susceptible de sufrir ELA. Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión "deterioro neurológico" incluye varios síntomas asociados con la incomunicación del sistema nervioso central (por ejemplo, el cerebro y la médula espinal). Los síntomas de deterioro neurológico pueden incluir, por ejemplo, retraso del desarrollo, deterioro cognitivo progresivo, pérdida de audición, deterioro del desarrollo del habla, déficits sensomotores, hiperactividad, agresividad y/o trastornos del sueño, entre otros.

En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la disminución de la toxicidad de varias células o tejidos. En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere a la disminución de la toxicidad neuronal debido a TDP-43 en los tejidos diana del cerebro, neuronas de la médula espinal, y / o tejidos diana periféricos. En ciertas realizaciones, la toxicidad se reduce en aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más en comparación con un control. En algunas realizaciones, la toxicidad se reduce al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces en comparación con el control. En algunas realizaciones, la toxicidad se mide mediante pruebas conocidas por los expertos en la técnica, incluidos, entre otros, los métodos de neuroimagen (por ejemplo, tomografías computarizadas CT, resonancia magnética, MRI, resonancia magnética, MRI, funcional, etc.).

En determinadas realizaciones, el tratamiento según la presente descripción da como resultado una reducción (por ejemplo, alrededor de un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 97,5%, 99% o más de reducción) o una eliminación completa de la presencia, o alternativamente la acumulación, de uno o más marcadores patológicos, clínicos o biológicos que están asociados con la ELA. Por ejemplo, en algunas realizaciones, tras la administración a un sujeto, la composición farmacéutica descrita en este documento demuestra o logra una reducción en la pérdida muscular, la flexibilidad muscular, la debilidad muscular, la espasticidad, los reflejos anormales del tendón, el signo de Babinski, los problemas respiratorios, la debilidad facial, el habla sorda, la pérdida de percepción, la pérdida de razonamiento, la pérdida de juicio y/o la pérdida de la imaginación.

En algunas realizaciones, el tratamiento se refiere al aumento de la supervivencia (por ejemplo, el tiempo de supervivencia). Por ejemplo, el tratamiento puede resultar en un aumento de la esperanza de vida de un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento da como resultado un aumento de la esperanza de vida de un paciente en más de aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 100%, aproximadamente 105%, aproximadamente 110%, aproximadamente 115%, aproximadamente 120%, aproximadamente 125%, aproximadamente 130%, aproximadamente 135%, aproximadamente 140%, aproximadamente 145%, aproximadamente 150%, aproximadamente 155%, aproximadamente 160%, aproximadamente 165%, aproximadamente 170%, aproximadamente 175%, aproximadamente 180%, aproximadamente 185%, aproximadamente 190%, aproximadamente 195%, aproximadamente 200% o más, en comparación con la esperanza de vida media de uno o más individuos de control con ELA sin tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento da como resultado un aumento de la esperanza de vida de un paciente en más de 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 6 años, aproximadamente 7 años, aproximadamente 8 años, aproximadamente 9 años, aproximadamente 10 años o más, en comparación con la esperanza de vida promedio de uno o más individuos control con ELA sin tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento da como resultado una supervivencia a largo plazo de un paciente. Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión "supervivencia a largo plazo" se refiere a un tiempo de supervivencia o esperanza de vida más largo que aproximadamente 40 años, 45 años, 50 años, 55 años, 60 años o más.

El término "mejorar", "aumentar" o "reducir", tal como se usa en el presente documento, indica valores relativos a un control. En algunas realizaciones, el control adecuado es una medida basal, tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en el presente documento, o una medición en un individuo de control (o individuos múltiples control) en ausencia del tratamiento descrito en el presente documento. Un "individuo control" es un individuo afectado por el ELA, que tiene aproximadamente la misma edad y/o género que la persona que está siendo tratada (para asegurar que las etapas de la enfermedad en el individuo tratado y el individuo o individuos de control son comparables).

El individuo (también conocido como "paciente" o "sujeto") que recibe el tratamiento es un individuo (feto, bebé, niño, adolescente o humano adulto) que tiene ELA o que tiene el potencial de desarrollar ELA. En algunos casos, el sujeto a tratar está genéticamente predispuesto a desarrollar ELA. Por ejemplo, el sujeto a tratar tiene una mutación en un gen ALS2, gen VAPB, gen SETX, gen TDP-43, gen FUS/TLS y/o gen OPTN.

5 Terapia combinada

En algunas realizaciones, el agente NMD descrito en este documento debe administrarse a un sujeto en combinación con una o más terapias adicionales para tratar la ELA o uno o más síntomas de la ELA. Por ejemplo, el agente NMD se puede administrar en combinación con riluzol (Rilutek®, Sanofi-Aventis, Bridgewater, NJ), baclofeno, diazepam, trihexifenidilo o amitriptilina.

10 En algunas realizaciones, la administración combinada del agente NMD y el segundo agente da como resultado una mejora en la ELA o un síntoma de la misma en un grado mayor que el producida por el agente NMD o el segundo agente solo. La diferencia entre el efecto combinado y el efecto de cada agente por sí solo puede ser una diferencia estadísticamente significativa.

15 En algunas realizaciones, la administración combinada del agente NMD y el segundo agente permite la administración del segundo agente a una dosis reducida, a un número menor de dosis, y / o a una menor frecuencia de dosificación en comparación con el régimen de dosificación estándar aprobado para el segundo agente. Por ejemplo, el régimen aprobado estándar para el Rilutek® es 50 mg cada 12 horas. En consecuencia, para la administración en combinación con un agente NMD, la cantidad terapéuticamente eficaz de Rilutek® puede ser una dosis de menos de aproximadamente 50 mg y/o una frecuencia mayor que aproximadamente cada 12 horas.

20 En algunas realizaciones, el agente inmunosupresor conocido por el experto se puede administrar a un sujeto en combinación con un polipéptido UPF1 descrito en este documento. Los agentes inmunosupresores ejemplares incluyen, entre otros, ciclosporina, FK506, rapamicina, CTLA4-Ig, agentes anti-TNF (como el etanercept), daclizumab (p. ej., Zenapax™), agentes anti-CD2, agentes anti-CD4 y agentes anti-CD40.

Métodos de identificación de moduladores de la expresión o actividad de polipéptidos NMD

25 Los polipéptidos NMD descritos en este documento (por ejemplo, los polipéptidos UPF1, UPF2, UPF3, SMG1, SMG5, SMG6 o SMG7) son útiles para identificar agentes que pueden utilizarse potencialmente para tratar la ELA. Por ejemplo, un agente que aumenta la expresión o la actividad de un polipéptido NMD se puede identificar como un agente que se puede utilizar para tratar la ELA. Existen métodos numéricos para evaluar si un agente altera la expresión de polipéptido NMD o la actividad o nivel de los polipéptidos NMD. La capacidad de un agente de prueba
30 para modular (por ejemplo, aumentar o disminuir) la expresión (por ejemplo, de forma permanente o temporal) de un promotor de polinucleótidos NMD puede ser evaluada, por ejemplo, por el ensayo de transcripción de reportero de rutina (por ejemplo, LacZ, luciferasa o GFP). Por ejemplo, puede ponerse en contacto una célula o animal transgénico cuyo genoma comprenda un gen reportero vinculado operativamente a un promotor polinucleótido NMD, con el agente de prueba, de modo que la capacidad del agente de prueba para aumentar o disminuir la actividad del reportero será indicativa de la capacidad del agente para modular el polipéptido NMD.
35

Los efectos del agente de prueba en la expresión del polipéptido NMD o la actividad o el nivel del polipéptido NMD se pueden evaluar en una célula, un lisado celular o un sujeto, preferiblemente un mamífero experimental no humano y, más preferiblemente, un roedor (por ejemplo, una rata, un ratón, un conejo) o un explante del mismo. Los métodos de evaluación de la expresión de polipéptidos NMD son habituales en la técnica, por ejemplo, análisis Northern, ensayo de protección de ribonucleasas, reacción en cadena de polimerasa-transcripción inversa (RT-PCR) o hibridación in situ del ARN (véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª ed. 2001)). El nivel de polipéptido NMD puede ser monitoreado, por ejemplo, por análisis Western, inmunoensayo o hibridación in situ. En algunas realizaciones, se transfecta la construcción de ADN que codifica el polipéptido NMD/proteína de fusión GFP en células, y se determina el nivel de fluorescencia de GFP en presencia o ausencia
40 de un agente de prueba. El aumento de la fluorescencia en presencia del agente de prueba es indicativo de la capacidad del agente de prueba para aumentar el nivel del polipéptido NMD.
45

El efecto del agente de prueba en la expresión del polipéptido NMD o la actividad o nivel del polipéptido NMD puede confirmarse en un segundo ensayo, por ejemplo, se observa como un cambio, en presencia del agente de prueba, en la capacidad del polipéptido NMD para reducir la toxicidad de una célula, por ejemplo, una célula neuronal, que expresa TDP-43 y/o FUS.
50

Los agentes y agentes de ensayo que se utilizarán en los métodos descritos en el presente documento incluyen extractos crudos, o parcial o sustancialmente purificados, de fuentes orgánicas, por ejemplo, extractos botánicos (por ejemplo, hierbas) y algas, elementos inorgánicos o compuestos, así como agentes parcial o sustancialmente purificados o sintéticos, por ejemplo, moléculas pequeñas, polipéptidos, anticuerpos y polinucleótidos, y bibliotecas de estos.
55

En un ejemplo, se pueden producir u obtener bibliotecas químicas combinatorias que muestreen compuestos químicos que están relacionados estructural o químicamente o no. La preparación y el cribado de bibliotecas

- químicas combinatorias es habitual para los expertos en la técnica. Tales bibliotecas químicas combinatorias incluyen, entre otras, bibliotecas de péptidos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5.010.175; Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37:487-493 (1991); y Houghton et al., *Nature* 354:84-88 (1991)). También se pueden utilizar otras farmacias para generar bibliotecas de diversidad química. Tales productos químicos incluyen, entre otros: peptoides (por ejemplo, la Publicación PCT No. WO 91/19735), péptidos codificados (por ejemplo, la Publicación PCT No. WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (por ejemplo, la Publicación PCT No. WO 92/00091), benzodiazepinas (p. ej., la Pat. de EE.UU. No. 5.288.514), diversómeros como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílogos (Hagihara et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114:6568 (1992)), péptido-miméticos no peptídicos con estructuras de glucosa (Hirschmann et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114:9217-9218 (1992)), síntesis orgánicas análogas de pequeñas bibliotecas de compuestos (Chen et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 116:2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho et al., *Science* 261:1303 (1993)), y/o fosfonatos de peptidilo (Campbell et al., *J. Org. Chem.* 59:658 (1994)), bibliotecas de ácidos nucleicos, bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicas (véase, por ejemplo, Pat. de EE.UU. No. 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn et al., *Nature Biotechnology*, 14(3):309-314 (1996) y el documento PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (véase, p. ej., Liang et al., *Science*, 274:1520-1522 (1996) y la Pat. de EE.UU. No. 5.593.853) y bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum C&EN, 18 de enero, página 33 (1993); isoprenoides, Pat. de EE.UU. No. 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, Pat. de Estados Unidos No. 5.549.974; pirrolidinas, Pat. de Estados Unidos No. 5.525.735 y 5.519.134; compuestos de morfolino, Pat. de EE.UU. No. 5.506.337; benzodiazepinas, Pat. de EE.UU. No. 5.288.514, etc.).
- La invención se ilustrará a continuación con los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos. No deben interpretarse como que limitan el alcance o el contenido de la invención de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1: La expresión de UPF1 en neuronas elimina la toxicidad de FUS o TDP-43

- El presente ejemplo describe la reducción de la toxicidad neuronal mediada por TDP-43 o FUS por UPF1.
- Se utilizó un modelo de levadura de ELA para identificar un gen humano, UPF1, que suprimió la toxicidad del FUS/TLS en levadura (Ju et al., *PLoS Biol.* 9:e1001052 (2011)). Además, la UPF1 fue capaz de suprimir la citotoxicidad de las mutaciones de TDP-43 asociadas a ELA en levadura.
- Para probar la eficacia de UPF1 en la reducción de la citotoxicidad mediada por TDP-43 o FUS en neuronas, UPF1 se expresó en neuronas motoras que expresaban FUS o TDP-43 asociados a la enfermedad. Las neuronas motoras fueron aisladas de ratones o creadas a partir de fibroblastos tomados de pacientes con ELA humana utilizando técnicas de células iPS (descritas en Yamanaka et al., *Cell* 126:663-676 (2006)). FUS o TDP-43 fueron marcados con EGFP (Proteína Verde Fluorescente Potenciada) y fueron expresados en neuronas motoras, que fueron visualizadas por microscopia fluorescente usando mApple.
- Las neuronas motoras murieron a los pocos días de la expresión de FUS o TDP-43 debido a la toxicidad de estas proteínas relacionadas con la ELA. La UPF1 se expresó en las neuronas motoras y se determinaron las curvas de supervivencia de Kaplan-Meyer. Como se muestra en la Figura 1A, la expresión de UPF1 no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia de las neuronas naturales, lo que indica que UPF1 no era un factor de supervivencia genérico. Sin embargo, como se muestra en la Figura 1B, UPF1 fue capaz de eliminar completamente la toxicidad de TDP-43 de una manera dependiente de la dosis. UPF1 tuvo un efecto similar en las células que expresaban FUS (datos no mostrados). Además, la expresión de UPF1 no pudo recuperar la toxicidad de los mutantes asociados a la ELA de SOD1, demostrando por primera vez que los ELA dependientes de SOD1 son una enfermedad distinta mecanísticamente.

Ejemplo 2: Ensayo de selección en levadura para compuestos que recuperan la toxicidad de FUS

- Se desarrolló una selección de fármaco basada en el modelo de levadura descrito en el Ejemplo 1 para identificar compuestos que recuperaban la toxicidad resultante de la expresión de FUS. Debido a que el fenotipo fue recuperado de la muerte celular, la selección mostró una señal excepcionalmente buena con respecto al ruido, con una puntuación de Z' de aproximadamente 0,8.
- Brevemente, se diseñaron dos cepas de levadura: "1XFUS", en la que un gen FUS se integró establemente en el locus HIS; y "1XVec", en el que se integró un vector vacío en el mismo locus. Los medios utilizados fueron YPRafinosa y 2XYPGalactosa (2X concentrado). Las células de levadura se cultivaron inoculando una sola colonia de la cepa 1XFUS o la cepa 1XVec en 2 ml de un medio de YPRafinosa y se cultivaron durante la noche a 30°C. Los cultivos nocturnos se utilizaron entonces para inocular 50 ml de medio YPRafinosa a una OD₆₀₀=0,2 y se cultivaron durante 24 horas a 30°C.
- Los cultivos se diluyeron entonces en 500 ml de medio YPGalactosa 2X a OD₆₀₀=0,2. Se rellenaron placas de 384 pocillos previamente con 25 µl de cada compuesto de ensayo a una concentración de 30 µM. Se utilizó un Multidrop para añadir 25 µl de la suspensión de 1XFUS a cada pocillo en las columnas 1-23 de la placa; se añadió 1XVec a

cada pocillo en la columna 24 como control. La levadura y los compuestos se mezclaron a fondo. Las placas se mantuvieron en una incubadora humidificada a 30°C. El OD600 de cada placa fue monitoreado a las 24 h y 48 horas.

- 5 El compuesto o compuestos que rescataron el crecimiento de 1XFUS fueron seleccionados y reevaluados. Los compuestos que pasaron la reevaluación se comprobaron en un experimento de respuesta de 10 dosis. Los compuestos que mostraron buenas respuestas de la dosis fueron reordenados, y reevaluados.

Secuencias

Secuencia de nucleótidos UPF1 (No. de entrada del GenBank U59323.1, nt 176-3532) (SEQ ID NO:1)

```

176                                     atgag
181 cgtggaggcg tacgggcccc gctcgagac tctcactttc ctggacacgg aggaggccga
241 gctgcttggc gccgacacac agggctccga gtctgagttc accgacttta ctcttcctag
301 ccagacgcag acgccccccg gcggccccgg cggccccggc ggtggcgggc cgggaagccc
361 gggcgggcgc ggcgcgggcg ctgcggcggg acagctcgac gcgcaggttg ggcccgaagg
421 catcctgcag aacgggggctg tggacgacag tgtagccaag accagccagt tgttggtga
481 gttgaacttc gaggaagatg aagaagacac ctattacacg aaggacctcc ccatacacgc
541 ctgcagttac tgtggaatac acgatcctgc ctgcgtggtt tactgtaata ccagcaagaa
601 gtggttctgc aacggacgtg gaaataacttc tggcagccac attgtaaate acctgtgag
661 ggcaaaatgc aaagaggtga cctgcacaa ggacggggccc ctgggggaga cagtcctgga
721 gtgctacaac tgcggctgtc gcaacgtctt cctcctcggc ttcattcccg ccaaagctga
781 ctgagtggcg gtgctgctgt gcaggcagcc ctgtgccagc cagagcagcc tcaaggacat
841 caactgggac agctcgagct ggcagccgct gatccaggac cgctgcttcc tgtcctggct
901 ggtcaagatc cctccgagc aggagcagct gcgggcacgc cagatcacgg cacagcagat
961 caacaagctg gaggagctgt ggaaggaaaa cccttctgcc acgctggagg acctggagaa
1021 gccgggggtg gacgaggagc cgcagcatgt cctcctcggc tacgaggagc cctaccagta
1081 ccagaacata ttcgggcccc tggtaagctt ggaggccgac tacgacaaga agctgaagga
1141 gtcccagact caagataaca tctctgtcag gtgggacctg ggccttaaca agaagagaat
1201 cgcctacttc actttgcccc agactgactc tgacatgcgg ctcatgcagg gggatgagat
1261 atgcctgcgg tacaaagggg accttgccgc cctgtggaaa gggatcggcc acgtcatcaa
1321 ggtccctgat aattatggcg atgagatcgc cattgagctg cggagcagcg tgggtgcacc
1381 tgtggagggt actcacaact tccaggtgga ttttgtgtgg aagtcgacct cctttgacag
1441 gatgcagagc gcattgaaaa cgtttgcggt ggatgagacc tcggtgtctg gctacatcta
1501 ccacaagctg ttggggccac aggtggagga cgtaatcacc aagtgccagc tgcccgaagc
1561 cttcacggcg cagggcctcc ccgacctcaa ccaactccag gtttatgcgc tgaagactgt
1621 gctgcaaaga ccactgagcc tgatccaggg cccgccaggc acggggaaga cggtgacgtc
1681 ggccaccatc gtctaccacc tggcccggca aggcaacggg ccggtgctgg tgtgtgctcc
1741 gagcaacatc gccgtggacc agctaacgga gaagatccac cagacggggc taaaggtcgt
1801 gcgcctctgc gccaaagacc gtgaggccat cgactccccg gtgtcttttc tggccctgca
1861 caaccagatc aggaacatgg acagcatgcc tgagctgcag aagctgcagc agctgaaaga
1921 cgagactggg gagctgtcgt ctgccgacga gaagcggtac cgggccttga agcgcaccgc
1981 agagagagag ctgctgatga acgcagatgt catctgctgc acatgtgtgg gcgcgggtga
2041 cccgaggctg gccaaagatgc agttccgctc cattttaatc gacgaaagca cccaggccac
2101 cgagccggag tgcattggtt ccgtggctct cggggccaag cagctgatcc ttgtaggcga
2161 ccaactgccg ctgggcccag tggatgatgt caagaaggcg gccaaaggcg ggctgtcaca
2221 gtcgctcttc gagcgcttgg tggatgtggg catccggccc atccgcctgc aggtccagta
2281 ccgatgcac cctgcactca gcgccttccc atccaacatc ttctacgagg gctccctcca
2341 gaatggtgtc actgcagcgg atcgtgtgaa gaagggattt gacttccagt ggccccaaac
2401 cgataaaccg atgttcttct acgtgaccca gggccaagag gagattgcca gctcggggac
2461 ctctacctg aacaggaccg aggtgcgaaa cgtggagaag atcaccacga agttgctgaa
2521 ggcaggcgcc aagccggacc agattggcat catcacgcc taagagggcc agcgtccta
2581 cctggtgcag tacatgcagt tcagcggctc cctgcacacc aagctctacc aggaagtgga
2641 gatcgccagt gtggacgcct ttcaggagcg cgagaaggac ttcattatcc tgtcctgtgt
2701 gcgggccaac gagcaccaag gcattggctt tttaaatgac cccaggcgctc tgaacgtggc
2761 cctgaccaga gcaaggtatg gcgtcatcat tgtgggcaac ccgaaggcac tatcaaagca

```

```

2821 gccgctctgg aaccacctgc tgaactacta taaggagcag aaggtgctgg tggagggggcc
2881 gctcaacaac ctgctgagga gcctcatgca gttcagcaag ccacggaagc tgggtcaaac
2941 tatcaaccgg ggagcccgtc tcatgaccac agccatgtat gatgcccggg aggccatcat
3001 cccaggctcc gtctatgate ggagcagcca gggccggcct tccagcatgt acttccagac
3061 ccatgaccag attggcatga tcagtgcggg ccctagccac gtggctgcca tgaacattcc
3121 catccccctc aacctgggtc tgccacccat gccaccgcct ggctattttt gacaagccaa
3181 cgggcctgct gcagggcgag gcaccccgaa aggcaagact ggctgtgggg gacgccagaa
3241 gaaccgcttt gggcttcctg gaccagcca gactaacctc cccaacagcc aagccagcca
3301 ggatgtggcg tcacagccct tctctcaggg cgccctgacg cagggtaca tctccatgag
3361 ccagccttcc cagatgagcc agcccgccct ctcccagccg gagctgtccc aggacagtta
3421 ccttggtgac gagtttaaat cacaaatcga cgtggcgctc tcacaggact ccacgtacca
3481 gggagagcgg gcttaccagc atggcggggg gacggggctg tcccagtatt aa

```

Secuencia de aminoácidos UPF1 (No. de entrada del GenBank AAC51140.1) (SEQ ID NO:2)

```

1 msveaygpss qtlftldtee aellgadtgg sefefdftl psqtqtppgg pggpgggggag
61 spggagagaa agqldaqvgp egilqngavd dsvaktsqll aelnfeedee dtyytkdlpi
121 hacscygihd pacvvynts kkwfcngrgn tsgshivnhl vrakckevtl hkdgplgetv
181 lecynogcrn vlllgfipak adsvvllcr qpccasqsslk dinwdssqwq pliqdrcfls
241 wlvkipsege qlrarqitaq qinkleelwk enpsatledl ekpgvdeepq hvllryeday
301 qyqnifgplv kleadydkkl kesqtqdnit vrwdlglk nk riayftlpkt dsdmrlmqgd
361 eiclrykgdl aplwkghhv ikvpdnygde iaiehrssvg apvevthnfg vdfvkwstsf
421 drmqsalktf avdetsvsgy iyhklhghev edvitkcqlp krftaqglpd lnhsqvyavk
481 tvlqrplsli qgppgtgktv tsativyhla rggngpvlvc apsniavdql tekihqtglk
541 vvrllcaksre aidspvsfla lhnqirnm ds mpelqklqql kdetgelssa dekryralkr
601 taerellmna dvicctcvga gdprlakmqf rsilidestq atepecmvpv vlgakqlilv
661 gdhcqlgpvv mckkaakagl sqslferlvv lgirpirlqv qyrmhpalsa fpsnifyegs
721 lqngvtaadr vkkgfdqwp qpdkpmffyv tggqeeiass gtsylnrtea anvekittkl
781 lkagakpdqi giitpyegqr sylvqymqfs gslhtklyqe veiasvdafq grekdfiils
841 cvranehqgi gflndprrln valtrarygv iivgnpkals kqplwnhlln yykeqkvlye
901 gplnnlresl mqfskprklv ntinpgarf m ttamydarea iipgsvydrs sqgrpssmyf
961 qthdqigmis agpshvaamn ipipfnlvmp pmpppgyfgq angpaagrgt pkgktgrggr
1021 qknrfglpgp sqtnlpnsqa sqdvasqpf s qgaltqgyis msqpsqmsqp glsqpelsqd
1081 sylgdefksq idvalsqdst yqgerayqhg gvtglslqy

```

Secuencia de nucleótidos UPF2 (No. de entrada del GenBank AF318574.1, nt 76-3894) (SEQ ID NO:3)

```

76 atgcc agctgagcgt aaaaagccag caagtatgga agaaaaagac
121 tctttaccaa acaacaagga aaaagactgc agtgaaaggc ggacagttag cagcaaggag
181 aggccaaaag acgatatcaa gctcactgcc aagaaggagg tcagcaaggc ccctgaagac
241 aagaagaaga gactggaaga tgataagaga aaaaaggaag acaaggaacg caagaaaaaa
301 gacgaagaaa aggtgaaggc agaggaagaa tcaaagaaaa aagaagagga agaaaaaaag
361 aaacatcaag aggaagagag aaagaagcaa gaagagcagg ccaaactgca gcaagaagaa
421 gaagcagctg ctcatagtaa agaaaaagaa gaatccattc agcttcatca ggaagcttgg
481 gaacgacatc atttaagaaa ggaacttcgt agcaaaaacc aaaatgctcc ggacagccga
541 ccagaggaaa acttcttcag ccgcctcgac tcaagtttga agaaaaatac tgctttttgtc
601 aagaaactaa aaactattac agaacaacag agagactcct tgtcccatga ttttaattggc
661 cttaaatttaa gcaaatacat tgcagaagct gtagcttcca tcgtggaagc aaaactaaaa
721 atctctgatg tgaactgtgc tgtgcacctc tgctctctct ttcaccagcg ttatgctgac

```

```

781 tttgccccat cacttcttca ggtctggaaa aaacattttg aagcaaggaa agaggagaaa
841 acacctaaca tcaccaagtt aagaactgat ttgcgtttta ttgcagaatt gacaatagtt
901 gggattttca ctgacaagga aggtctttcc ttaatctatg aacagctaaa aaatattatt
961 aatgctgata gggagtccca cactcatgtc tctgtagtga ttagtttctg tcgacattgt
1021 ggagatgata ttgctggact tgtaccaagg aaagtaaaga gtgctgcaga gaagtttaat
1081 ttgagttttc ctctagtgta gataattagt ccagagaaac aacagccctt ccagaatctt
1141 ttaaaagagt actttacgtc tttgaccaa cactgaaaaa gggaccacag ggagctccag
1201 aatactgaga gacaaaacag gcgcattcta cattctaaag gggagctcag tgaagataga
1261 cataaacagt atgaggaatt tgctatgtct taccagaagc tgctggcaaa ttctcaatcc
1321 ttagcagacc ttttgatga aaatatgcca gatcttcctc aagacaaacc cacaccagaa
1381 gaacatgggc ctggaattga tatattcaca cctggtaaac ctggagaata tgacttgga
1441 ggtggtatat gggaagatga agatgctcgg aatttttatg agaacctcat tgatttgaag
1501 gcttttgtcc cagccatctt gtttaaagac aatgaaaaaa gttgtcagaa taaagagtc
1561 aacaaagatg ataccaaaga ggcaaaagaa tctaaggaga ataaggaggt atcaagtccc
1621 gatgattttg aacttgagtt ggagaatcta gaaattaatg atgacacctt agaattagag
1681 ggtggagatg aagctgaaga tcttacaag aaacttcttg atgaacaaga acaagaagat
1741 gaggaagcca gcactggatc tcatctcaag ctcatagtag atgctttcct acagcagtta
1801 cccaactgtg tcaaccgaga tctgatagac aaggcagcaa tggatttttg catgaacatg
1861 aacacaaaag caaacaggaa gaagttggta cgggcactct tcatagttcc tagacaaagg
1921 ttggattttg taccatttta tgcaagattg gttgctacat tgcattccctg catgtctgat
1981 gtagcagagg atctttgttc catgctgagg ggggatttca gatttcatgt acggaaaaag
2041 gaccagatca atattgaaac aaagaataaa actgttcggt ttataggaga actaactaag
2101 ttaagatgt tcacaaaaaa tgacacactg cattgtttta agatgcttct gtcagacttc
2161 tctcatcacc atattgaaat ggcattgcacc ctgctggaga catgtggacg gtttcttttc
2221 agatctccag aatctcacct gaggaccagt gtacttttgg agcaaatgat gagaaagaag
2281 caagcaatgc atcttgatgc gagatacgtc acaatggtag agaatgcata ttactactgc
2341 aaccacctc cagctgaaaa aaccgtgaaa aagaaacgtc ctctctcca ggaatatgtc
2401 cggaaacttt tgtacaaaga tctctctaag gttaccaccg agaaggtttt gagacagatg
2461 cgaaagctgc cctggcagga ccaagaagtg aaagactatg ttatttgttg tatgataaac
2521 atctggaatg tgaaatataa tagtattcat tgtgtagcca acctcttagc aggactagt
2581 ctctaccaag aggatgttgg gatccacgtt gtggatggag tgttagaaga tattcgatta
2641 ggaatggagg ttaatcaacc taaatttaaa cagaggcgca tcagcagtg ccaagttctta
2701 ggagaacttt acaattaccg aatggtggaa tcagctgtta ttttcagaac tctgtattct
2761 tttacctcat ttggtgttaa tcctgatggc tctccaagtt ccctggaccc acctgagcat
2821 cttttcagaa ttagactcgt atgcactatt ctggacacat gtggccagta ctttgacaga
2881 gggtccagta aacgaaaact tgattgtttc ctgtatatatt ttcagcgtta tgtttggtgg
2941 aagaaaagtt tggaggtttg gacaaaagac catccatttc ctattgatat agattacatg
3001 atcagtgata cactagaact gctaagacca aagatcaaac tctgtaattc tctggaagaa
3061 tccatcaggg aggtacaaga cttggaacga gaattcttaa taaaactagg cctagtaaat
3121 gacaaagact caaaagattc tatgacagaa ggagaaaatc ttgaagagga tgaagaagaa
3181 gaagaaggtg gggctgaaac agaagaacaa tctggaaatg aaagtgaagt aaatgagcca
3241 gaagaagagg aggttctga taatgatgat gatgaggag aagaagagga ggaagagaat
3301 acagattacc ttacagattc caataaggaa aatgaaaccg atgaagagaa tactgaggt
3361 atgattaaag gcggtggact taagcatgta cttgtgttag aagatgagga cttcattcaa
3421 gctctggata aaatgatgct agaaaatcta cagcaacgaa gtggtgaatc tgttaaagt
3481 caccaactag atgtggccat tcctttgcat ctcaaaagcc agctgaggaa agggcccca
3541 ctgggaggtg gggaaggaga ggctgagtc gcagacacaa tgccgtttgt catgttaaca
3601 agaaaaggca ataaacagca gtttaagatc cttaatgtac ccatgtctc tcaacttgct
3661 gcaaatcact ggaaccagca acaggcagaa caagaagaga ggatgagaat gaagaagctc
3721 acactagata tcaatgaacg gcaagaacaa gaagattatc aagaaatgt gcagtctctt

3781 gcacagcgcc cagctccagc aaacaccaat cgtgagaggc ggcctcgcta ccaacatccg
3841 aaggagacac ctaatgcaga tctaattctt aagactggtg ggaggagacg ttga

```

Secuencia de aminoácidos UPF2 (No. de entrada del GenBank AAG60689.1) (SEQ ID NO:4)

```

1   mpaerkkpas meekdslpnn kekdcserrr vsskerpkdd ikltakkevs kapedkkkrl
61  eddkrkkedk erkkkdeekv kaeeeskkke eeekkkhgee erkkqeeqak rqqeaaaaaq
121 mkekeesiql hqeawerhhl rkelrsknqn apdsrpeenf fsrldsslkk ntafvkklkt
181 iteqqrdsls hdfnglnlsk yiaaeavasiv eaklkisdvn cavhlcslfh qryadfapsl
241 lqvwwkhfea rkeektpnit klrtldlrfa eltivgift d keglsllyeq lkniinadre
301 shthvsvvis fcrhcgddia glvprkvksa aekfnlsfpp seiispekqq pfqnllkeyf
361 tsltkhlkrd hrelqnterq nrrilhskge lsdhrhkqye efamsyqkll ansqsladll
421 denmpdlpqd kptpeehgpg idiftpgkpg eydleggiwe dedarnfyen lidlkafvpa
481 ilfkdnksc qnkesnkddt keakeskenk evsspddlel elenleindd tleleggdea
541 edltkkllde qeqedeeast gshlklivda flqqplncvn rdlidkaamd fcmnmntkan
601 rkkvlralfi vprqrlldll fyarlvatlh pcmsdvaedl csmlrgdfrf hvrkkdqini
661 etknktvrfi geltkfkmft kndtlhclkm llsdflshhhi emactlletc grflfrspes
721 hlrtsvlleg mmrkkqamhl daryvtmven ayyycnpppa ektvkkkrpp lqeyvrkllly
781 kdlskvttk vlrqmrklpw qdqvkydyvi ccminiwnvk ynsihcvanl laglvlyqed
841 vgihvvdgvl edirlgmevn qpknfqrri sakflgelyn yrmvesavif rtlysftsfg
901 vnpdgspsl dppehlfrir lvctildtcg qyfdrgsskr kldcflvyfq ryvwwksle
961 vwtkdhpfi didymisdtl ellrpkielc nsleesirqv qdlereflik lglvndkds
1021 dsmtegenle edeeeeeegga eteeqsgnes evnepeeeeeg sdndddegee eeeentdylt
1081 dsnkenetde entevmikgg glkhvpcved edfiqaldkm mlenlqqrsg esvkvhqldv
1141 aiplhlksql rkgpplggge geaesadtmp fvmltrkgnk qqfkiinlvp ssqlaanhwn
1201 qqqaeqeerm rmkkltldin erqeqedyqe mlqslaqrpa pantnrerrp ryqhpkgapn
1261 adlifktgrr rr

```

Secuencia de nucleótidos UPF3 (No. de entrada del GenBank AF318575_1, nt 22-1380) (SEQ ID NO:5)

```

22      atgctgtcgc gccctagaag tgcagttcca ccgcgactcg
61  cagcagcagg aggcctgagac gccgccaact tcgtcctccg gttgcggggg cgggtgcgggc
121 aaacctcgcg aggagaagag gacggccctg agcaagggtg tcatccgccg cctgcctccg
181 ggctcacca aggagcagct ggaggagcag ctgcgcccgc tgccagcaca cgactacttc
241 gagttcttcg ccgcccacct gaggctttat cctcatctct actcaagagc atacattaat
301 tttaggaatc ctgatgacat ccttcttttt agagatcggt ttgatggata tatcttccct
361 gacagcaaag gcctagaata tcctgcagtg gtagagtttg ctccattcca gaagatagcc
421 aaaaagaagc tgagaaaaaa agatgccaaag actggaagca tcgaagatga tccagaatat
481 aagaagtgtt tagaaaccta ctgtgtggag gaagagaaga ccagtgccaa ccctgagact
541 ctgctggggg agatggaggc gaagacaaga gagctcattg ctagaagaac cacacctctt
601 ttggaatata ttaaaaatag aaaattagaa aagcagagaa ttcgagaaga gaagcgagaa
661 gaacggagga ggagagagtt agaaaagaaa cgtttgcggg aagaggaaaa aagaagaaga
721 agagaagaag aaagatgcaa aaaaaaagag acagataaac agaagaaaat tgcagagaaa
781 gaagtaagga ttaagcttct taagaaacca gaaaaggagag aggaaccaac cacagagaaa
841 ccaaaagaaa gaggagagga gattgatact ggaggtggca agcaggaatc ctgtgcccc
901 ggtgcagtcg taaaagccag gcccatggaa ggctcgctgg aggagcccca ggagacgtca
961 cacagcggca gtgataaaga gcacagggat gtggagagat ctcaagaaca agaattctgaa

1021 gcacaaagat accatgtgga tgacggcagg aggcacagag ctaccacga gcctgaacgg
1081 ctttccagaa ggagtgagga tgagcagaga tgggggaaag gacctggcca agacagaggg
1141 aagaagggga gccaggacag cggggctccg ggggaggcca tggagagact gggaagagcg
1201 caaaggtgtg acgacagtcc agcaccaga aaagagcgac tggcaaacaa ggaccggcca
1261 gccttgagc tgtatgatcc aggagctcgc ttccgagcgc gagagtgtgg cggaaacagg
1321 aggatctgca aggcagaagg ttcggggact ggtcctgaga agagggaaga ggcagagtga

```

5 Secuencia de nucleótidos UPF3 (No. de entrada del GenBank AAG60690.1) (SEQ ID NO:6)

```

1   mlsalevqfh rdsqqqeaet pptsssgcgg gagkpreekr talskvvirr lppgltkeql
61  eeqlrplpah dyfeffaadl slyphlysra yinfrnpddi llfrdrfdgy ifldskgley
121 pavvefapfq kiakkkkrkk daktgsiedd peykkflety cveeektsan petllgemea
181 ktreliaarrt tplleyiknr klekqriree kreerrrel ekkrlreeek rrrreeerck
241 kketdkqkki aekevrikll kkpekgeept tekpkergee idtgggkqes capgavvkar
301 pmegsleepq etshsgsdke hrdversseq eseaqryhvd dgrrrrahhe perlsrrsed
361 eqrwgkgpgg drgkksqds gapgeamerl graqrddsp aprkerlank drpalqlydp
421 garfrarecg gnrrickaeg sgtgpekree ae

```

Secuencia de nucleótidos SMG1 (No. de entrada del GenBank NM_015092.4, nt 364-11349) (SEQ ID NO:7)

```

364      atgagcc gcagagcccc ggggtctcgg ctgagcagcg gggcgggcgg cggcggcacc
421      aagtatccgc ggagctggaa tgactggcaa cccagaactg atagtgcacg agccgaccca
481      gataatttaa aatattcttc atccagagat agaggtgggt cttcctctta tggactgcaa
541      ccttcaaatt cagctgtggt gtctcggcaa aggcacgatg ataccagagt ccacgctgac
601      atacagaatg acgaaaaggg tggctacagt gtcaatggag gatctgggga aaatacttat
661      ggtcggaagt cgttggggca agagctgagg gttacaatg tgaccagccc tgagttcacc
721      agtggtcagc atggcagtcg tgctttagcc accaaagaca tgaggaaatc acaggagaga
781      tcgatgtctt attctgatga gtctcgactg tcgaatcttc ttcgaggagt caccgaggaa
841      gacgacagag accgaagatt ggctactgta aagcagttga aagaatttat tcagcaacca
901      gaaaataagc tggtagtagt taaacaattg gataatatct tggctgctgt acatgacgtg
961      cttaatgaaa gtagcaaat gcttcaggag ttgagacagg agggagcttg ctgtcttggc
1021     cttctttgtg cttctctgag ctatgaggct gagaagatct tcaagtggat ttttagcaaa
1081     tttagctcat ctgcaaaaaga tgaagttaaa ctctctact tatgtgccac ctacaaagca
1141     ctagagactg taggagaaaa gaaagccttt tcatctgtaa tgcagcttgt aatgaccagc
1201     ctgcagtcta ttcttgaaaa tgtggataca ccagaattgc tttgtaaatg tgtaagtgc
1261     attcttttgg tggctcgatg ttaccctcat attttcagca ctaatttttag ggatacagtt
1321     gatataattag ttggatggca tatagatcat actcagaaac cttogetcac gcagcaggtg
1381     tctgggtggt tgcagagttt ggagccattt tgggtagctg atcttgcat tttactact
1441     cttcttggtc agtttctgga agacatggaa gcatatgctg aggacctcag ccatgtggcc
1501     tctggggaat cagtggatga agatgtccct cctccatcag tgtcattacc aaagctggct
1561     gcacttctcc gggatatttag tactgtggtg aggagcattg gggaaacgct cagcccaatt
1621     cggggtcttc caattactga ggcataatga acagatgttc tgtacagagt aatgagatgt
1681     gtgacggctg caaaccaggt gtttttttct gaggctgtgt tgacagctgc taatgagtg
1741     gttggtgttt tgctcggcag cttggatcct agcatgacta tacattgtga catggtcatt
1801     acatatggat tagaccaact ggagaattgc cagacttgtg gtaccgatta tatcatctca
1861     gtcttgaatt tactcacgct gattgttgaa cagataaata cgaaactgcc atcatcattt
1921     gtagaaaaac tgtttatacc atcatctaaa ctactattct tgcgttatca taaagaaaaa
1981     gaggttggtg ctgtagccca tgctgtttat caagcagtcg tcagcttgaa gaatattcct
2041     gtttttgaga ctgcctataa gttaatatgt ggagaaatga cttgtgccct aaacaacctc
2101     ctacacagtc tacaacttcc tgaggcctgt tctgaaataa aacatgaggc ttttaagaat

```

2161 catgtgttca atgtagacaa tgcaaaatth gtagttatat ttgacctcag tgccctgact
 2221 acaattggaa atgccccaaa ctcactaata gggatgtggg cgctatctcc aactgtcttt
 2281 gcacttctga gtaagaatct gatgattgtg cacagtgacc tggctgttca cttccctgcc
 2341 attcagtatg ctgtgctcta cacattgtat tctcattgta ccaggcatga tcactttatc
 2401 tctagtagcc tcagttcttc ctctccttct ttgtttgatg gagctgtgat tagcactgta
 2461 actacggcta caaagaaaca tttctcaatt atattaaatc ttctgggaat attacttaag
 2521 aaagataacc ttaaccagga cagcaggaaa ctgttaatga cttgggcttt ggaagcagct
 2581 gttttaatga agaagtctga aacatacgca cttttattct ctcttccgtc tttccataaa
 2641 ttttgcaaa gcttttttagc caacactctc gttgaagatg tgaatatctg tctgcaggca
 2701 tgcagcagtc tacatgctct gtcctcttcc ttgccagatg atcttttaca gagatgtgtc
 2761 gatgtttgcc gtgttcaact agtgcacagt ggaactcgtc ttcgacaagc atttggaaaa
 2821 ctgttgaaat caattccttt agatgttgtc ctaagcaata acaatcacac agaaattcaa
 2881 gaaatttctt tagcattaag aagtcacatg agtaaagcac caagtaatac attccacccc
 2941 caagatttct ctgatgttat tagttttatt ttgtatggga actctcatag aacagggaag
 3001 gacaattggt tggaaagact gttctatagc tgccagagac tggataagcg tgaccagtca
 3061 acaattccac gcaatctcct gaagacagat gctgtccttt ggcagtgggc catatgggaa
 3121 gctgcacaat tcactgttct ttctaagctg agaacccac tgggcagagc tcaagacacc
 3181 ttccagacaa ttgaaggatc cattcgaagt ctgcagctc acacattaaa ccctgatcag
 3241 gatgttagtc agtggacaac tgcagacaat gatgaaggcc atggttaacaa ccaacttaga
 3301 cttgttcttc ttctgcagta tctggaaaat ctggagaaat taatgtataa tgcatacgag
 3361 ggatgtgcta atgcattaac ttcacctccc aaggctatta gaactttttt ctataccaat
 3421 cgccaaactt gtcaggactg gctaacgcgg attcgactct ccatcatgag ggtaggattg
 3481 ttggcaggcc agcctgcagt gacagtgaga catggctttg acttgcttac agagatgaaa
 3541 acaaccagcc tatctcaggg gaatgaattg gaagtaacca ttatgatggt ggtagaagca
 3601 ttatgtgaac ttcattgtcc tgaagctata cagggaattg ctgtctggtc atcatctatt
 3661 gttggaaaaa atcttctgtg gattaactca gtggctcaac aggtgaagg gaggtttgaa
 3721 aaggcctctg tggagtacca ggaacacctg tgtgccatga cagggttga ttgctgcac
 3781 tccagctttg acaaatcggg gctcacctta gccaatgctg ggcgtaacag tgccagcccg
 3841 aaacattctc tgaatggtga atccagaaaa actgtgctgt ccaaaccgac tgactcttcc
 3901 cctgaggtta taaattattt aggaataaaa gcatgtgagt gctacatctc aattgccgat
 3961 tgggctgctg tgcaggaatg gcagaacgct atccatgact tgaaaaagag taccagttagc
 4021 acttccctca acctgaaagc tgacttcaac tatataaaat cattaagcag ctttgagtct
 4081 ggaaaatttg ttgaatgtac cgagcagtta gaattgttac caggagaaaa tatcaatcta
 4141 cttgctggag gatcaaaaaga aaaaatagac atgaaaaaac tgcttcttaa catgttaagt
 4201 ccggtaccga gggaacttca gaaatccatt gaagtccaat tgttaagaag ttctgtttgt
 4261 ttggcaactg ctttaaaccg gatagaacaa gatcagaagt ggcagtctat aactgaaaat
 4321 gtggtaaagt acttgaagca aacatcccgc atcgctattg gacctctgag acttttctact
 4381 ttaacagttt cacagtcttt gccagttcta agtaccttgc agctgtattg ctcatctgct
 4441 ttggagaaca cagtttctaa cagactttca acagaggact gtcttattcc actcttcagt
 4501 gaagctttac gttcatgtaa acagcatgac gtgaggccat ggatgcaggc attaaggat
 4561 actatgtacc agaatcagtt gttggagaaa attaaagaac aaacagtcct aattagaagc
 4621 catctcatgg aattaggtct aacagcagca aaatttgcta gaaaacgagg gaatgtgtcc
 4681 cttgcaacaa gactgctggc acagtgcagt gaagttcagc tgggaaagac caccactgca
 4741 caggatttag tccaacattt taaaaaacta tcaacccaag gtcaagtgga tgaaaaatgg
 4801 gggcccgaac ttgatattga aaaaaccaa ttgtctttata cagcaggcca gtcaacacat
 4861 gcaatggaaa tgttgagttc ttgtgccata tctttctgca agtctgtgaa agctgaatat
 4921 gcagttgcta aatcaattct gacactggct aaatggatcc aggcagaatg gaaagagatt
 4981 tcaggacagc tgaacaggt ttacagagct cagcaccac acgaacttcac aggtctttct
 5041 actttgtcta aaaacatact cactctaata gaactgccat ctgttaatac gatggaagaa
 5101 gagtatctc ggatcgagag tgaatctaca gtgcatattg gagttggaga acctgacttc
 5161 attttgggac agttgtatca cctgtcttca gtacaggcac ctgaagtagc caaatcttgg
 5221 gcagcgttgg ccagctgggc ttataggtgg ggcagaaagg tggttgacaa tgccagttag
 5281 ggagaagggt ttctgtctgt gcctagagaa aaatctgaag ttcagaatct acttccagac
 5341 actataactg aggaagagaa agagagaata tatggtattc ttggacaggc tgtgtgtcgg
 5401 ccggcgggga ttcaggatga agatataaca cttcagataa ctgagagtga agacaacgaa

5461 gaagatgaca tgggtgatgt tatctggcgt cagttgatat caagctgccc atggccttca
 5521 gaacttgatg aaagtgcaac tgaaggagtt attaaagtgt ggaggaaagt tgtagataga
 5581 atattcagcc tgtacaaact ctcttgcaat gcatacttta ctttccttaa actcaacgct
 5641 ggtcaaattc ctttagatga ggatgaccct aggtgcatt taagtcacag agtggaaacag
 5701 agcactgatg acatgattgt gatggccaca ttgcgctgc tgcggttgc cgtgaagcat
 5761 gctggtgagc ttccgcaact tctggagcac ggcttggaga caacacccac tgcaccatgg
 5821 agaggaatta ttccgcaact tttctcacgc ttaaaccacc ctgaagtgtg tgtgcgcca
 5881 agtatttgta accttctctg ccgtgtggct caagattccc cacatctcat attgtatcct
 5941 gcaatagtgg gtaccatata gcttagtagt gaatcccagg cttcaggaaa taaattttcc
 6001 actgcaattc caactttact tggcaatatt caaggagaag aattgctggt ttctgaatgt
 6061 gagggaggaa gtccctcctg atctcaggat agcaataagg atgaacctaa aagtggatta
 6121 aatgaagacc aagccatgat gcaggattgt tacagcaaaa ttgtagataa gctgtcctct
 6181 gcaaacccca ccatggtatt acaggttcag atgctcgtgg ctgaactgcg cagggtcact
 6241 gtgctctggg atgagctctg gctgggagtt ttgctgcaac aacacatgta tgcctgaga
 6301 cgaattcagc agcttgaaga tgagggtgaag agagtccaga acaacaacac cttacgcaaa
 6361 gaagagaaaa ttgcaatcat gagggagaag cacacagctt tgatgaagcc catcgtatct
 6421 gctttggagc atgtgaggag tatcacagcg gctcctgcag aaacacctca tgaaaaatgg
 6481 tttcaggata actatggtga tgccattgaa aatgccctag aaaaactgaa gactccattg
 6541 aaccctgcaa agcctgggag cagctggatt ccattttaaag agataatgct aagtttgcaa
 6601 cagagagcac agaaacgtgc aagttacatc ttgcgtcttg aagaaatcag tccatggttg
 6661 gctgccatga ctaacactga aattgctctt cctggggaag tctcagccag agacactgtc
 6721 acaatccata gtgtgggagg aaccatcaca atcttaccga ctaaaaccaaa gccaaagaaa
 6781 cttctctttc ttggatcaga tgggaagagc tatccttata ttttcaaagg actggaggat
 6841 ttacatctgg atgagagaat aatgcagttc ctatctattg tgaataccat gtttgctaca
 6901 attaatcgcc aagaaacacc ccggttccat gctcgacact attctgtaac accactagga
 6961 acaagatcag gactaatcca gtgggtagat ggagccacac ccttatttgg tctttacaaa
 7021 cgatggcaac aacgggaagc tgccttaca gacaaaagg cccaagattc ctaccaaact
 7081 cctcagaatc ctggaattgt acccgtcct tagcctggat agtgaacttt attacagtaa aattggcctt
 7141 gctttgaaaa cagttgggct tagcctggat gtgtccgctc gggattggcc tcttcattga
 7201 atgaaggcag tattggaaga gttaatggag gccacacccc cgaatctcct tgccaaagag
 7261 ctctggtcat cttgcacaac acctgatgaa tgggtggagag ttacgcagtc ttatgcaaga
 7321 tctactgcag tcatgtctat ggttggatac ataattggcc ttggagacag acatctggat
 7381 aatgttctta tagatatgac gactggagaa gttgttcaca tagattacaa tgtttgcttt
 7441 gaaaaaggta aaagccttag agttcctgag aaagtaacct ttcgaatgac acaaaacatt
 7501 gaaacagcac tgggtgtaac tggagtagaa ggtgtattta ggctttcatg tgagcaggtt
 7561 ttacacatta tgcggcgtgg cagagagacc ctgctgaagc tgctggaggc ctttgtgtac
 7621 gaccctctgg tggactggac agcaggaggc gaggtgggt ttgctggtgc tgtctatggt
 7681 ggaggtggcc agcaggccga gagcaagcag agcaagagag agatggagcg agagatcacc
 7741 cgcagcctgt tttcttctag agtagctgag attaaggtga actggtttta gaatagagat
 7801 gagatgctgg ttgtgcttcc caagttggac ggtagcttag atgaatacct aagcttgcaa
 7861 gagcaactga cagatgtgga aaaactgcag ggcaaaactac tggaggaaat agagtttcta
 7921 gaaggagctg aaggggtgga tcatccttct catactctgc aacacaggta ttctgagcac
 7981 acccaactac agactcagca aagagctgtt caggaagcaa tccaggtgaa gctgaatgaa
 8041 tttgaacaat ggataacaca ttatcaggct gcattcaata attagaagc aacacagctt
 8101 gcaagcttgc ttcaagagat aagcacacaa atggaccttg gtcctccaag ttacgtgcca
 8161 gcaacagcct ttctgcagaa tgctggtcag gccacttga ttagccagtg cgagcagctg
 8221 gagggggagg ttggtgctct cctgcagcag aggcgctccg tgctccgtgg ctgtctggag
 8281 caactgcatc actatgcaac cgtggccctg cagtatccga aggccatatt tcagaaacat
 8341 cgaattgaac agtggaagac ctggatggaa gagctcatct gtaacaccac agtagagcgt
 8401 tgtcaagagc tctataggaa atatgaaatg caatatgtct cccagccacc cccaacagt
 8461 tgtcagttca tcaactgccac tgaaatgacc ctgcagcgat acgcagcaga catcaacagc
 8521 agacttatta gacaagtgga acgcttgaaa caggaagctg tcaactgtgc agtttgtgaa
 8581 gatcagttga aagaaattga acgcttgcat aaagttttcc ttcattgagaa tggagaagaa
 8641 ggatctttga gtctagcaag tggtattatt tctgcccttt gtacccttac aaggcgtaac
 8701 ctgatgatgg aaggtgcagc gtcaagtgtc ggagaacagc tgggtgatct gacttctcgg

8761 gatggagcct ggttcttggg ggaactctgc agtatgagcg gaaacgtcac ctgcttggtt
8821 cagttactga agcagtgcc cctgggtgcca caggacttag atatcccgaa ccccatggaa
8881 gcgtctgaga cagttcactt agccaatgga gtgtatacct cacttcagga attgaattcg
8941 aatttccggc aaatcatatt tccagaagca cttcgatggt taatgaaagg ggaatacacg
9001 ttagaaagta tgctgcatga actggacggg cttattgagc agaccaccga tggcgttccc
9061 ctgcagactc tagtggaatc tcttcaggcc tacttaagaa acgcagctat gggactggaa
9121 gaagaaacac atgctcatta catcgatggt gccagactac tacatgctca gtacggtgaa
9181 ttaatccaac cgagaaatgg ttcagttgat gaaacaccca aaatgtcagc tggccagatg
9241 cttttggtag cattcgatgg catgtttgct caagttgaaa ctgctttcag cttattagtt
9301 gaaaagttga acaagatgga aattcccata gcttggcgaa agattgacat cataagggaa
9361 gccaggagta ctcaagttaa tttttttgat gatgataatc accggcaggt gctagaagag
9421 attttctttc taaaaagact acagactatt aaggagttct tcaggctctg tggtagcttt
9481 tctaaaacat tgtcaggatc aagttcactt gaagatcaga atactgtgaa tgggcctgta
9541 cagattgtca atgtgaaaac cttttttaga aactcttggt tcagtgaaga ccaaattggc
9601 aaacctatca aggcattcac agctgacttt gtgaggcagc tcttgatagg gctaccaaac
9661 caagccctcg gactcacact gtgcagtttt atcagtgtct tgggtgtaga catcattgct
9721 caagtagagg caaaggactt tgggtgccga agcaaagttt ctggtgatga tctctgtaag
9781 aaagcggtag aacataacat ccagataggg aagttctctc agctggttat gaacagggca
9841 actgtgttag caagttctta cgacactgcc tggagaagac atgacttggg gcgaaggcta
9901 gaaaccagta tttcttcttg taagacaagc ctgcagcggg ttcagctgca tattgccatg
9961 tttcagtggc aacatgaaga tctacttatc aatagaccac aagccatgtc agtcacacct
10021 cccccacggt ctgctatcct aaccagcatg aaaaagaagc tgcataccct gagccagatt
10081 gaaacttcta ttgcaacagt tcaggagaag ctagctgcac ttgaatcaag tattgaacag
10141 cgactcaagt gggcaggtgg tgccaaccct gcattggccc ctgtactaca agattttgaa
10201 gcaacgatag ctgaaagaag aaatcttgtc cttaaagaga gccaaagagc aagtcaggtc
10261 acatttctct gcagcaatat cattcatttt gaaagtttac gaacaagaac tgcagaagcc
10321 ttaaaccctg atgcgcggtt atttgaacta atcaagcgat gtcagcagat gtgttcgttt
10381 gcatcacagt ttaacagttc agtgtctgag ttagagcttc gtttattaca gagagtggac
10441 actggtcttg aacatcctat tggcagctct gaatggcttt tgtcagcaca caaacagttg
10501 acccaggata tgtctactca gagggcaatt cagacagaga aagagcagca gatagaaacg
10561 gtctgtgaaa caattcagaa tctggttgat aatataaaga ctgtgtcac tggtcataac
10621 cgacagcttg gagatgtcaa acatctcttg aaagctatgg ctaaggatga agaagctgct
10681 ctggcagatg gtgaagatgt tccctatgag aacagtgtta ggcagttttt ggggtgaatat
10741 aaatcatggc aagacaacat tcaaacagtt ctatttacat tagtccaggc tatgggtcag
10801 gttcgaagtc aagaacacgt tgaaatgtc caggaaatca ctcccacct gaaagaactg
10861 aaaacacaaa gtcagagtat ctataataat ttagtgagtt ttgcatcacc cttagtacc
10921 gatgcaacaa atgaatgttc gagtccaacg tcatctgcta cttatcagcc atccttcgct
10981 gcagcagtc ggagtaacac tggccagaag actcagcctg atgtcatgtc acagaatgct
11041 agaaagctga tccagaaaaa tcttgctaca tcagctgata ctccaccaag caccgttcca
11101 ggaactggca agagtgttgc ttgtagtctt aaaaaggcag tcagagaccc taaaactggg
11161 aaagcggtag aagagagaaa ctccatgtca gtgagtgtgt ggaagagagt gaaagccaag
11221 ttagagggcc gagatgttga tccgaatagg aggatgtcag ttgctgaaca ggttgactat
11281 gtcattaagg aagcaactaa tctagataac ttggctcagc tgtatgaagg ttggacagcc
11341 tgggtgtga

Secuencia de aminoácidos SMG1 (No. de entrada del GenBank NP_055907.3) (SEQ ID NO:8)

1 msrrapgsrl ssgggggggtk yprswndwqp rtdsasadpd nlkysssrdr ggsssyglqp
61 snsavvsrqr hddtrvhadi qndekggysv ngsggentyg rkslgqelrv nnvtspefts
121 vqhgsralat kdmrksqers msysdesrls nllrritred drdrllatvk qlkefiqqpe
181 nklvlvkqld nilaavhdvl nesskllqel rgegacclgl lcaslsyeae kifkwifskf
241 sssakdevkl lylcatykal etvgekkafs svmqlvmtsl qsilenvdtp ellckcvkci
301 llvarcyphi fstnfrdtvd ilvgwhidht qkpsltqqvs gwlqslepfw vadlafsttl
361 lgqfledmea yaedlshvas gesvdedvpp psvslpklaa llrvfstvvr sigerfspir

421 gppiteayvt dvlyrvmrcv taanqvffse avltaanecv gvllgslgps mtihcdmvit
 481 ygldqlencq tcgtdyiisv lnlltliveq intklpssfv eklfipsskl lflryhkeke
 541 vvavahavyq avlslnkipv letayklilg emtcalnnll hslqlpeacs eikheafknh
 601 vfnvdnakfv vifdlsaltt ignaknsliq mwalsptvfa llsknlmivh sdlavhfpai
 661 qyavlytlys hctrhdhfis sslsssspsl fdgavistvt tatkkhfsii lnllgillkk
 721 dnlnqdrkl lmtwaleaav lmkksetyap lfsllpsfhkf ckglantlv edvniclqac
 781 sslhalsssl pddllqrcvd vcrvqlvhsq trirqafgkl lksipldvvl snnnhteige
 841 islalrshms kapsntfhpq dfsdvisfil ygnshrtgkd nwlerlfyyc qrlldkrdqst
 901 iprnllktda vlwqwaiwea aqftvlsklr tplgraqdtf qtiegiirsl aahtlnpdqd
 961 vsqwttadnd eghggnqlrl vlllqylenl eklmynayeg canaltsppk virtffyttr
 1021 qtcqdwlrtri rlsimrvgl agqpavtvrh gfdlltemkt tsllsqgnele vtimmvveal
 1081 celhcpeaiq giavwsssi v gknllwinsv aqqaegrfek asveyqehlc amtgvdccis
 1141 sfdksvltla nagrnasaspk hslngesrkt vlskptdssp evinylnka cecyisiadw
 1201 aavqewqnai hdlkkstsst slnlkadfnv iksllssfesg kfvecteqle llpgenlnll
 1261 aggskekidm kklpnmlsp dprelqksie vqllrsvcl atalnpiqd qkwqsitenv
 1321 vkylkqtsri aigplrlstl tvsqslpvl tlqlycssal entvsnrst edcliplfse
 1381 alrsckqhdv rpwmqalryt myqnllleki keqtpirsh lmelgltaak farkrgnsvl
 1441 atrllaqcse vqlgktttaq dlvgfhkkl tgqgvdekqg peldiektl lytaggstha
 1501 memlsscais fcksvkaeya vaksiltak wigaeweis gqllqvraq hqqnftglst
 1561 lskniltlie lpsvntmee ypriesestv higvgpdfi lgqlyhlssv qapevakswa
 1621 alaswayrwg rkvdndasqg egvllprek sevqnllpdt iteekeriy gilgqavcrp
 1681 agiqdeditl qitesednee ddmvdviwrq lisscpwse ldesategvi kvwrkvvdri
 1741 fslyklscsa yftflklng qipldeddpr lhlshrveqs tddmivmatl rllrllvka
 1801 gelrqylehg lettptapwr giipqlfsrl nhpevyvrqs icnllcrvaq dsphlilypa
 1861 ivgtislse sqasgnkfst aiptllgni geellvsece ggsppasqds nkdepksqgn
 1921 edqammqdcy skivdklssa nptmvlqvqm lvaelrrvtv lwdelwlgvl lqghmyvlrr
 1981 iqqldevkr vqnnntlrke ekiaimrekx talmpkivfa lehvrstiaa paetphekwf
 2041 qdnygdaien aleklktpln pakpgsswip fkeimlslq raqkrasyil rleeisplwa
 2101 amtnteialp gevsardvt ihsvgtiti lptktkpkkl lflgsdgksy pylfkgledl
 2161 hlderimqfl sivntmfati nrqetprfha rhysvtplgt rsgliqwdg atplfglykr
 2221 wqgreaalqa qkaqdsyqtp qnpgivprps elyyskigpa lktvqlsldv srrdwplhvm
 2281 kavleelmea tppnllakel wsscttpdew wrvtqsyars tavmsmvgyi iglgrhldn
 2341 vldmttgev vhidynvcfe kgkslrpvek vpfrmtqnie talgvtgveg vfrlsceqvl
 2401 himrrgretl ltllleafvyd plvdwtage agfagavygg gggqaesqks kremereitr
 2461 slfssrvaie kvnwfknrde mlvvlpkldg sldeylslqe qltdveklqg kleeiefle
 2521 gaegvdhpsl tlqhryseht qlqtqqravq eaiqvklnef eqwithyqaa fnnleatqla
 2581 sllqeistqm dlqpsysvpa taflqnaqga hlisqceqle gevqallqqr rsvlrgcleq
 2641 lhhyatvalq ypkafqkhr ieqwktwme licnttverc qelyrkyemq yapqppptvc
 2701 qfitatentl qryaadinsr lirqverlkq eavtvpvced qlkeiercik vflhengeeg
 2761 slslasviis alctltrnl mmegaassag eqlvdltsrd gawfleelcs msgnvtclvq
 2821 llkqchlvpq dldipnpmea setvlangv ytslqelnsn frqiifpeal rclmkgeytl
 2881 esmlheldgl ieqtdgvpq qltveslqay lrnaamglee ethahyidva rllhaqygel
 2941 iqprngsvde tpkmsagqml lvafdgmafa vetafslve klnkmeipia wrkidiirea
 3001 rstqvnffdd dnhrqvleei fflkrlqtik effrlcgtfs ktlsqssle dqntvngpvq
 3061 invvktlfrn scfsedqmak pikaftadv rqliglpnq algtlcsfi salgvdiiaq
 3121 veakdfgaes kvsvddlckk avehniqigk fsqvlmnrat vlassydtaw kkhdlvrle
 3181 tsisscktsl qrvqlhiamf qwghedlln rpqamsvtp prsailtsmk kklhtlsqie
 3241 tsiatvqekl aalessieqr lkagganpa lapvlqdfea tiaerrnlvl kesqrasqvt
 3301 flcsniihfe slrttrtaeal nlldaalfeli krcqqmcsfa sqfnssvsel elrllqrvdt
 3361 glehpigsse wllsahkqlt qdmstqraiq tekeqqietv cetiqnlvnd iktvltghnr

3421 qlgdvkhllk amakdeeaal adgedvpyen svrqflgeyk swqdnictvl ftlvqamgqv
 3481 rsqehvemlq eitptlkelk tqsqsiynnl vsfasplvtd atnecsspts satyqpsfaa
 3541 avrsntgqkt qpdvmsqnar kliqknlats adtppstvpq tgksvacspk kavrdpktgk
 3601 avqernsyav svwkrvkakl egrdvdpnrr msvaeqvdyv ikeatnldnl aqlyegwtaw
 3661 v

Secuencia de nucleótidos SMG5 (No. de entrada del GenBank NM_015327.2, nt 150-3200) (SEQ ID NO:9)

150 a tgagccaagg cccccccaca ggggagagca
 181 gcgagcccga agcaaaagtc ctccacacta agcggcttta cggggtgtg gtggaggctg
 241 tgcacgcact tgacctcatc ctttgcaaca aaactgctta tcaagaagta ttcaaaccag
 301 aaaacattag cctgaggaac aagctgcgtg agctctgcgt caagcttatg ttctgcacc
 361 cagtggacta tgggagaaag gctgaggagc tgctgtggag aaaggtatac tatgaagtta
 421 tccagcttat caagactaac aaaaagcaca tccacagccg gagcactttg gaatgtgcct
 481 acaggacgca cctggttgct ggtattggct tctaccagca tctccttctc tatatccagt
 541 cccactacca gctggaactg cagtgtgca tgcactggac ccatgtcact gacccccctca
 601 taggatgcaa gaagccagtg tctgcctcag ggaaggagat ggattgggca cagatggcat
 661 gtcaccgatg tctggtgtat ctgggggatt tgtcccgata tcagaatgaa ttagctggcg
 721 tagataccga gctgctagcc gagagatttt actaccaagc cctgtcagta gctcctcaga
 781 ttggaatgcc cttcaatcag ctgggcaccc tggcaggcag caagtactat aatgtggaag
 841 ccatgtattg ctacctgcgc tgcactcagt cagaagtgtc ctttgaggga gcctatggga
 901 acctcaagcg gctgtatgac aaggcagcca aaatgtacca ccaactgaag aagtgtgaga
 961 ctcggaact gtctcctggc aaaaagcgat gtaaagacat taaaagggtg ctagtgaact
 1021 ttatgtatct gcaaagcctc ctacagccca aaagcagctc cgtggactca gagctgacct
 1081 cactttgcca gtcagtctg gaggacttca acctctgct cttctacctg cctcctcac
 1141 ccaacctcag cctggccagt gaggatgagg aggagtatga gagtggatat gctttcctcc
 1201 cggaccttct catctttcaa atggtcatca tctgccttat gtgtgtgcac agcttgagga
 1261 gagcaggatc caagcagtac agtgcagcca ttgccttcac cctggccctc ttttcccacc
 1321 tcgtcaatca tgtcaacata cggctgcagg ctgagctgga agagggcgag aatcccgtcc
 1381 cggcattcca gagtgatggc acagatgaac cagagtccaa ggaacctgtg gagaaagagg
 1441 aggagccaga tcttgagcct cctcctgtaa caccccaagt gggtaggggc agaaagagcc
 1501 gtaagtcttc tcgcctctcc tgtctccgcc gtccgcgcca cccacccaaa gttggtgatg
 1561 acagtgaact gagtgaaggc tttgaatcgg actcaagcca tgactcagcc cgggccaagt
 1621 agggctcaga cagtggctct gacaagagtc ttgaagggtg gggaaaggcc tttgatgctg
 1681 aaacagactc ggaaatgaat agccaggagt cccgatcaga cttggaagat atggaggaag
 1741 aggaggggac acggtcacca acctggagc cccctcgggg cagatcagag gctcccgatt
 1801 cctcaatgg cccactgggc cccagtggag ctagcattgc cagcaatcta caagccatgt
 1861 ccaccagat gttccagact aagcgtgct tccgactggc cccacacctt agcaacctgc
 1921 tctccagcc caccaccaac cctcatacct cggccagcca caggccttgc gtcaatgggg
 1981 atgtagacaa gccttcagag ccagcctctg aggagggctc tgagtggag gggagtgagt
 2041 ccagtggacg ctctgtcgg aatgagcgca gcatccagga gaagcttcag gtctgatgg
 2101 ccgaaggctc gcttctgct gtgaaagtct tctggactg gcttcggacc aaccccgacc
 2161 tcatcatcgt gtgtgcgcag agctctcaaa gtctgtggaa ccgcctgtct gtgttgctga
 2221 atctgttgcc tgctgctggt gaactccagg agtctggcct ggccttgtgt cctgaggtcc
 2281 aagatcttct tgaagggtgt gaactgcctg acctcccctc tagccttctg ctcccagagg
 2341 acatggctct tcgtaacctg ccccgctcc gagctgcca cagacgctt aactttgaca
 2401 cggatcggcc cctgctcagc accttagagg agtcagtggg gcgcatctgc tgcacccgca
 2461 gctttggtca tttcatcgcc cgctgcaag gcagcatcct gcagttcaac ccagaggttg

```

2521 gcattcttcgt cagcattgcc cagtctgagc aggagagcct gctgcagcag gccaggcac
2581 agttccgaat ggcacaggag gaagctcgtc ggaacaggct catgagagac atggctcagc
2641 tacgacttca gctcgaagtg tctcagctgg agggcagcct gcagcagccc aaggcccagt
2701 cagccatgtc tccctacctc gtccctgaca cccaggccct ctgccaccat ctccctgtca
2761 tccgccaaact ggccaccagt ggccgcttca ttgtcatcat cccaaggaca gtgatcgatg
2821 gcttgatttt gctgaagaag gaacacccag gggcccgga tgggattcgg tacctggagg
2881 cagagtttaa aaaaggaaac aggtacattc gctgccagaa agaggtggga aagagctttg
2941 agcggcataa gctgaagagg caggatgcag atgcctggac tctctataag atcctagaca
3001 gctgcaaaca gctgactctg gccaggggg caggtgagga ggatccgagt ggcattggtga
3061 ccatcatcac aggccttcca ctggacaacc ccagcgtgct ttcaggcccc atgcaggcag
3121 ccctgcaggc cgtgccccac gccagtgtgg acatcaagaa tgttctggac ttctacaagc
3181 agtgggaagga aattggttga

```

Secuencia de aminoácidos SMG5 (No. de entrada del GenBank NP_056142.2) (SEQ ID NO:10)

```

1  msqgppptges sepeakvlht krlyravvea vhrldlilcn ktaygevfkp enislrnklr
61  elcvklmflh pvdylgrkaee llwrkvyev iqliktnkkh ihsrstleca yrthlvagig
121 fyqhlllyiq shyqlqlqcc idwthvtdpl igckkpvsas gkemdwaqma chrclvylgd
181 lsryqnelag vdtellaerf yyqalsvapq igmpfnqlgt lagskyynve amycylrciq
241 sevsfegayg nlkrlydkaa kmyhqlkkce trklspgkkr ckdikrllvn fmylqslqpp
301 ksssvdselt slcqsuledf nlclfylpss pnslslasede eeyesgyafl pdllifqmvi
361 iclmcvhsle ragskqysaa iaftlalfsh lvnhvnlrlq aeleeenpv pafqsdgtde
421 peskepveke eepdpepppv tpqvgegrks rkfsrlsclr rrrhpkvgd dsdlsegfes
481 dsshsaras egdsdgsdks legggtafda etdsemnsqe srsdledmee eegtrsptle
541 pprgrseapd slngplgpse asiasnlqam stqmfqtkrc frlaptfsnl llqpttnpht
601 sashrpcvng dvdkpsepas eegsesegse ssgrscerner siqeklqvlm aegllpavkv
661 fldwlrtndp liivcaqssq slwnrlsvll nllpaagelq esglalcpev qdllegcelp
721 dlpsslllpe dmalrnlppl raahrrfnfd tdrpllstle esvvrircir sfghfiarlq
781 gsilqfnpev gifvsiaqse gesllqqaqa qfrmaqeear rnrlmrmaq lrlglevsq
841 egslqqpkaq samspylvpd tqalchhlpv irqlatsgrf iviiprtvid gldllkkehp
901 gardgiryle aefkknryi rcqkevgsf erhklkrqda dawtlykild sckqltlaag
961 ageedpsgmv tiitglpldn psvlsgpmqa alqaaahasv diknvlfdyk qwkeig

```

Secuencia de nucleótidos SMG6 (No. de entrada del GenBank BC064916.1, nt 296-1831) (SEQ ID NO:11)

```

296                                     atgga
301  gacattccct gcagtggctg agaaggtcct caaggagttc caggtgttac tgcagcacag
361  cccctctccc attggaagta cccgcatgct gcagcttatg accatcaata tgtttgcagt
421  acacaactcc cagctgaaag actgcttctc ggaggagtgc cgctctgtga tccaggaaca
481  agccgcagct ctgggcttgg ccatgttttc tctactggc cgccgctgca cctgcttact
541  taaggagtcc gccaaagctc agctgtcctc tctgaggac caggatgacc aagacgacat
601  caagggtgtc tcctttgtcc cggacctgaa ggagctgctc cccagtgtca aagtctggtc
661  agattggatg ctcggtacc cggacacctg gaatcctcct cccacatccc tggatctgcc
721  ctgcgatgtt gctgtggatg tatggctgac gctggctgat ttctgtaaca tactgactgc
781  agtgaatcag tctgaggtgc cactgtacaa ggaccggat gatgacctca cccttcttat
841  cctggaagag gatcggtctc tctcggtctt tgtccccttg ctggctgccc ctgaggaccc
901  ctgctacgtg gagaaaacct cggataaggt tattgcagct gactgcaaaa gggtcacagt
961  gctgaagtat tttctggaag ccctttgtgg acaagaagag cctctgctgg cattcaaggg

```

```

1021 tggaaagtat gtgtcagtg caccgcgtccc agacaccatg ggaaaggaaa tgggaagcca
1081 agaggggaaca cgactggaag atgaggagga ggatgtggtg attgaagact ttgaggaaga
1141 ttcagaggct gaaggcagcg gaggcgagga tgacatcagg gagcttcggg ccaagaagct
1201 ggctctggcc aggaagatag ctgagcagca gcgtcgccag gaaaagatcc aggctgtcct
1261 ggaggaccac agtcagatga ggcagatgga gctcgaaatc agacctttgt tctcgtacc
1321 agacaccaac ggcttcattg accacctggc cagtctggcg cggctgctgg agagcaggaa
1381 gtacatcctg gtggtgcccc tcatcgtgat caatgagctg gacggcctgg ccaaggggca
1441 ggagacagac caccgggctg ggggctacgc ccgtgtggtg caagagaagg cccgcaagtc
1501 catcgagttc ctgcagcagc gattcgagag tcgggactct tgccctgcgag cctgaccag
1561 ccgtggcaat gaactcgaat ccatcgccct ccgcagtgag gacatcactg gccagctggg
1621 taacaacgat gatctcatcc tgtcctgctg cctccactac tgcaaagaca aggctaagga
1681 cttcatgccc gccagcaaag aggagccaat ccggctactg cgggaggtgg tgctgttgac
1741 ggatgaccgg aacctgcgtg tgaaggcgct cacaaggaat gttcctgtac gggacatccc
1801 agccttcctc acgtgggccc aggtgggctg a

```

Secuencia de nucleótidos SMG6 (No. de entrada del GenBank AAH64916.1) (SEQ ID NO:12)

```

1 metfpavaek vlkefqvllq hspspigstr mlqlmtinmf avhnsqkdc fseecrsviq
61 eqaaalglam fsllvrrctc llkesakaql sspedqddqd dikvssfvpd lkellpsvk
121 wsdwmlgypd twnppptsld lpshvavdvw stladfcnil tavnqsevpl ykdpdddltl
181 lileedrlls gfvpllaapq dpcyvekted kviaadckrv tvlkyfleal cgqeepllaf
241 kggkyvsvap vpdmgkemg sqegtrlede eedvviedfe edseaegsgg eddirelrak
301 klalarkiae qrrrgekiga vledhsqmrq meleirplfl vpdtnghfidh laslarlles
361 rkyilvvppl vineldglak ggetdhragg yarvvqekar ksiefleqrf esrdsclral
421 tsrgnelesi afrseditgq lgnnddlils cclhyckdka kdfmpaskee pirllelrevl
481 ltddrnrlrvk altrnvpvrd ipafiltwaqv g

```

Secuencia de nucleótidos SMG7 (No. de entrada del GenBank BC036381.1, nt 119-3655) (SEQ ID NO:13)

```

119 at
121 gagcctgcag agcgcgcagt acctccggca ggcagaagtc ctgaaggctg acatgacaga
181 ttctaagctg ggtccagctg aagtctggac atccaggcag gctctgcagg acctgtacca
241 gaaaatgcta gttaccgatt tggaatacgc tttagacaag aaagtagaac aggatctctg
301 gaatcacgcc tttaagaatc agatcacaac actacaaggc caggcaaaga atcgagcaaa
361 tccgaatcgg agtgaagttc aggcaaacct ttctctgttc ctgagaggcag ctagtggctt
421 ctatactcag ttattacaag aactgtgtac agtatttaac gtagatttac catgccgtgt
481 gaagtcttcc caattgggaa ttatcagcaa taaacagacg cataccagcg ccatagtga
541 gccacagtct agctcctgtt cctatatctg ccagcactgc ctgctccacc ttggagacat
601 tgctcgatac agaaaccaga ccagccaggc agagtcctac tataggcatg cagctcagct
661 tgtcccctcc aatggtcagc cttataatca gttggctatc ttagcttctt ccaaaggaga
721 ccactctgacc acaattttct actactgcag aagcattgct gtgaagttcc ctttcccagc
781 tgccctcact aatctgcaaa aagcactttc taaagcactg gaaagccgag atgaggtgaa
841 aaccaagtgg ggtgtttctg acttcatcaa ggcttttatt aaattccacg gtcattgtga
901 cctgagtaag agcttggaag agttgagccc tcttcgagag aaattggaag aacagtttaa
961 gaggtctgta ttccaaaaag ctttcaactc tcagcagtta gttcatgtca ctgtcattaa
1021 cctgtttcaa cttcatcacc ttcgtgactt tagcaatgaa accgagcagc acacttatag
1081 ccaagatgag cagctatggt ggacacagtt gctggccctc tttatgtctt ttctcggcat
1141 cctgtgcaag tgcctctac agaattgagtc tcaggaggag tcctacaatg cctatcctct
1201 tccagcagtc aaggtctcca tggactggct aagactcaga cccagggtct ttcaggaggc
1261 agtggtggat gaaagacagt acatttggcc ctggttgatt tctcttctga atagtttcca

```

5

```

1321 tccccatgaa gaggacctct caagtattag tgcgacacca cttccagagg agtttgaatt
1381 acaaggatttt ttggcattga gaccttcttt caggaacttg gatttttcca aaggtcacca
1441 ggggtattaca ggggacaaaag aaggccagca acgacgaata cgacagcaac gcttgatctc
1501 tataggcaaa tggattgctg ataatcagcc aaggctgatt cagtgtgaaa atgaggtagg
1561 gaaattgttg tttatcacag aaatcccaga attaatactg gaagacccca gtgaagccaa
1621 agagaacctc attctgcaag aaacatctgt gatagagtcg ctggctgcag atgggagccc
1681 agggctaaaa tcagtgttat ctacaagccg aaatttaagc aacaactgtg acacaggaga
1741 gaagccagtg gttaccttca aagaaaacat taagacacga gaagtgaaca gagaccaagg
1801 aagaagtttt cctcccaaag aggtaaaatc ccagacagaa ctaagaaaga ctccagtgtc
1861 tgaagccaga aaaacacctg taactcaaac cccaactcaa gcaagtaact ccagttcat
1921 ccccatcat caccctggag ccttccctcc tcttcccagc aggccagggt ttccgcccc
1981 aacatatgtt atccccccgc ctgtggcatt ttctatgggc tcaggttaca ccttcccagc
2041 tgggtgtttct gtcccaggaa cctttcttca gcctacagct cactctccag caggaaacca
2101 ggtgcaagct gggaaacagt cccacattcc ttacagccag caacggccct ctggaccagg
2161 gccaatgaac cagggacctc aacaatcaca gccaccttcc cagcaacccc ttacatcttt
2221 accagctcag ccaacagcac agtctacaag ccagctgcag gttcaagctc taactcagca
2281 acaacaatcc cctacaaaag ctgtgccggc tttggggaaa agcccgcctc accactctgg
2341 attccagcag tatcaacagg cagatgcctc caaacagctg tggaatcccc ctcaggttca
2401 agggccatta gggaaaatta tgctgtgtaa acagccctac taccttcaga cccaagacct
2461 cataaaactg tttgagccgt cattgcaacc tctgtaatg cagcagcagc ctctagaaaa
2521 aaaaatgaag ccttttccca tggagccata taaccataat cctcagaag tcaaggtccc
2581 agaattctac tgggattctt cctacagcat ggctgataac agatctgtaa tggcacagca
2641 agcaaacata gaccgcaggg gcaaacggtc accaggaatc ttccgtccag agcaggatcc
2701 tgtaccacga atgccgtttg aggaccccaa gagctccctc ctgcttctc cggacctgtt
2761 aaagagtctg gctgccttgg aggaagagga agagctgatt ttttctaaca ctctgatct
2821 ttaccgggct ctgctggggc ctctgcctc tcttcttggg cgaagccttt ttaaactcct
2881 attggagaag cctcagagc tcatgtcaca ttcatcctct ttctgtccc tcaccggatt
2941 ctctctcaat caggaaagat acccaaataa tagtatgttc aatgaggtat atgggaaaaa
3001 cctgacatcc agctccaaag cagaactcag tccctcaatg gccccccagg aaacatctct
3061 gtattccctt tttgaaggga ctccgtggtc tccatcactt cctgccagtt cagatcattc
3121 aacaccagcc agccagtctc ctcatctctc taaccaagc agcctacca gctctcctcc
3181 aacacacaac cataattctg ttccattctc caattttgga cccattggga ctccagataa
3241 cagggataga aggactgcag atcgggtgaa aactgataag ccagccatgg gtgggtttgg
3301 cattgattat ctctcagcaa cgtcatcctc tgagagcagt tggcatcagg ccagcactcc
3361 gagtggcacc tggacaggcc atggcccttc catggaggat tctctgtctg tctcatgga
3421 aagcctaaag aagcaacagc atgggggtcca gcagttgggg cccaaaagac agtctgaaga
3481 ggaaggaagc agcagtatct gcgtagccca cagagggcc agggccctgc ccagctgcag
3541 tctcccagcc tccactttca gagtgaat caaggcagca cggacatgtg cccatcaggc
3601 acagaagaaa acacgacgtc gtccattttg gaagagacga aagaaaggaa aataa

```

Secuencia de aminoácidos SMG7 (No. de entrada del GenBank AAH36381.1) (SEQ ID NO:14)

```

1   mslqsaqylr qaevlkadmt dsklgaevw tsrqalqdly qkmlvtdley aldkkveqdl
61  wnhafknqit tlqggaknra nprnsevqan lsflleaasg fytqllqelc tvfnvdlpcr
121 vkssqlgiis nkqthtsaiv kpgssscsyi cqhclvhlgd iaryrnqtsq aesyyrhaaq
181 lvpsngqpyn qlailasskg dhlttifyyc rsiavkfpfp aastnlqkal skalesrdev
241 ktkwgvsdfi kafikfhghv ylskslekls plrekleeqf krllfqkafn sqqlvhvtvi
301 nlfqlhhldr fsneteqhty sqdeqlcwtq llalfmsflg ilckcplqne squeesynayp
361 lpavkvsmdw lrlrprvfqe avvderqyiw pwllslslnsf hpheedlssi satplpeefe
421 lqgflalrps frnldfskgh qgitgdkegq qrrirqrli sigkwiadnq prliqcenev

```

```

481  gkllfiteip  eliledpsea  kenlilqets  vieslaadgs  pglksvlsts  rnlsnncdtg
541  ekpvvtfken  iktrevnrdq  grsfppkevk  sqtelrktpv  searktpvtq  tptqasnsqf
601  ipihhpgafp  plpsrpgfpp  ptyvipppva  fsmgsgytfp  agvsvpgtfl  qptahspagn
661  qvqagkqshi  pysqqrpsgp  gpmnqgpqqs  qppsqqplts  lpaqptaqtst  sqlqvqaltq
721  qqqspstkavp  algkspphhs  gfqqyqqada  skqlwnppqv  qgplgkimpv  kqpyylqtqd
781  piklfepslq  ppvmqqqple  kkmkpfpmep  ynnpsevk  pefywdssys  madnrsvmaq
841  qanidrrgkr  spgifrpeqd  pvprmpfedp  ksspllpdl  lkslaaleee  eelifsntpd
901  lypallgpla  slpgrslfks  llekpselms  hsssflsltg  fslnqerypn  nsmfnevygk
961  nltssskael  spsmapqets  lyslfegtpw  spslpassdh  stpasqsphs  snpsslpssp
1021  pthnhnsvpf  snfgpigtpd  nrdrtradrw  ktdkpamggf  gidylsatss  sesswhqast
1081  psgtwtghgp  smedssavlm  eslkkqqhgv  qqlgpkqrse  eegsssicva  hrgprplpsc
1141  slpastfrvk  fkaartcahq  aqkktrrrpf  wkrrkkgk

```

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para reducir la toxicidad de TDP-43 en una célula neuronal humana o en una célula glial humana que padece o es susceptible de padecer dicha toxicidad, que comprende:
5 proporcionar a la célula una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido UPF1, reduciendo así la toxicidad de TDP-43 en la célula.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad que se correlaciona con una probabilidad estadísticamente significativa de reducir la toxicidad de TDP-43 en la célula.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de proporcionar comprende administrar una composición que comprende el polipéptido UPF1; o
10 donde la etapa de proporcionar comprende administrar una composición que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido UPF1.
4. Un polipéptido UPF1 para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en un sujeto humano, en el que el polipéptido UPF1 se administrará a un sujeto que padece o es susceptible de padecer ELA, y en el que
15 (i) la ELA está asociada con la toxicidad de TDP-43; o
(ii) el sujeto no tiene ninguna mutación en el gen SOD1.
5. El polipéptido UPF1 para su uso de la reivindicación 4, en el que debe administrarse una composición que comprende el polipéptido UPF1; o
en el que debe administrarse una composición que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido UPF1.
6. El polipéptido UPF1 para su uso de la reivindicación 5, en el que el polipéptido UPF1 o el ácido nucleico debe
20 administrarse en el SNC del sujeto.
7. El polipéptido UPF1 para su uso de la reivindicación 5 o 6, en el que el polipéptido UPF1 o el ácido nucleico debe administrarse al sujeto mediante inyección intratecal.
8. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido UPF1 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido UPF1, y un excipiente farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de la ELA, en el que
25 (i) la ELA está asociada con la toxicidad de TDP-43; o
(ii) el sujeto que tiene ELA no tiene ninguna mutación en el gen SOD1.
9. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 8, que comprende además un agente de reconocimiento.
10. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 8 o 9, en la que el polipéptido UPF1 comprende o
30 consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
11. El polipéptido UPF1 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que el polipéptido UPF1
35 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
12. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido UPF1 para su uso en el tratamiento de ELA en un sujeto humano que padece o es susceptible de padecer ELA, en el que
(i) la ELA está asociada con la toxicidad de TDP-43; o
40 (ii) el sujeto no tiene ninguna mutación en el gen SOD1.
13. El ácido nucleico que codifica el polipéptido UPF1 para su uso de la reivindicación 12, en el que el ácido nucleico codifica un polipéptido UPF1 que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
14. El polipéptido UPF1 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, la composición farmacéutica para el
45 uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 o el ácido nucleico que codifica UPF1 para el uso de la reivindicación 12 o 13, en donde la ELA está asociada con la toxicidad de TDP-43.

15. El polipéptido UPF1 para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, la composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 o el ácido nucleico que codifica UPF1 para el uso de la reivindicación 12 o 13, en donde el sujeto no tiene ninguna mutación en el gen SOD1.

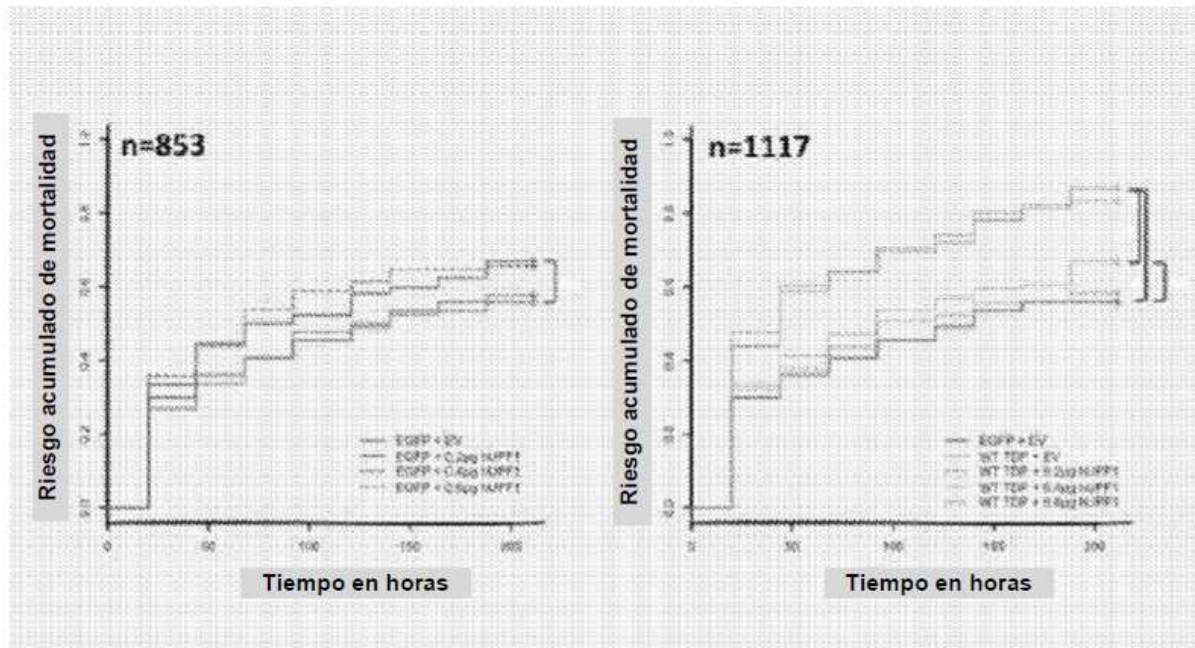


FIG. 1A

FIG. 1B