

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 087**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2015 PCT/EP2015/067722**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16016449**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2015 E 15750315 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3174981**

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

30 Prioridad:

31.07.2014 EP 14306228

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

16.02.2021

73 Titular/es:

**ASSOCIATION INSTITUT DE MYOLOGIE (25.0%)
47, boulevard de l'Hôpital
75013 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%);
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (25.0%) y
SORBONNE UNIVERSITÉ (25.0%)**

72 Inventor/es:

**BARKATS, MARTINE;
BIFERI, MARIA-GRAZIA y
VOIT, THOMAS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 806 087 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 de la esclerosis lateral amiotrófica

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un método para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). De manera específica, la invención implementa el uso de una secuencia antisentido adaptada para afectar al corte y empalme alternativo en un pre-mARN de SOD1 humana, y de ese modo conducir a la destrucción del mARN omitido mediante la maquinaria celular.

Antecedentes de la invención

10 La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se clasifica epidemiológicamente en las formas esporádica (90%-95%) y familiar (5%-10%) (Rosen et al., 1993). El veinte por ciento de las formas familiares (ELAf) están provocadas por mutaciones en el gen de la Superóxido Dismutasa 1 (SOD1). La función de la metaloenzima SOD1 es convertir el superóxido, un subproducto tóxico de la fosforilación oxidativa mitocondrial, en oxígeno molecular o peróxido de hidrógeno. La SOD1 mutante posee una propiedad neurotóxica (aumento tóxico de la función) que es responsable del mecanismo patogénico de la enfermedad. De hecho, los ratones transgénicos que sobreexpresan formas mutantes del gen de SOD1 humana (por ejemplo, ratones SOD1^{G93A}) resumen la mayoría de las características patológicas de la ELA, y se usan de manera generalizada en los estudios preclínicos de ELA (Gurney et al., 1994). La disminución de la acumulación de SOD1 se ha presentado, por tanto, como una estrategia lógica para tratar las formas asociadas a SOD1 de ELAf. Se han desarrollado aproximaciones moleculares atractivas para inhibir casi cualquier gen del sistema nervioso central (SNC), principalmente basándose en el uso de oligonucleótidos antisentido (AONs) (Crooke, 2004) o la interferencia del ARN con siARN (Dorn et al., 2004) o microARN sintético (Boudreau et al., 2011).

15 La inhibición de la expresión de SOD1 mutante mediante el uso de siARN ha mostrado primero una eficacia terapéutica significativa en ratones con ELA asociada a SOD1. Raoul et al. mostró que la inyección intraespinal de vectores lentivirales que codificaban ARNs en horquilla cortos (shARNs) hacia SOD1 humana retrasó el inicio y la progresión de la enfermedad en ratones SOD1^{G93A} (Raoul et al., 2005). Independientemente, Ralph et al. demostró que las inyecciones intramusculares de lentivirus que mediaban en la expresión de ARNi hacia la SOD1 humana previnieron la neurodegeneración y prolongaron la supervivencia en el mismo modelo de ratón con ELA, lo que condujo a un incremento máximo de la esperanza de vida del 77% (Ralph et al., 2005).

20 También se ha informado que la infusión continua de un AON que induce una degradación mediada por enzimas en los ventrículos cerebrales permite una reducción eficaz y generalizada de los niveles de mARN y proteína SOD1 en todo el cerebro y la médula espinal, lo que retrasa significativamente la progresión de la enfermedad en un modelo de ELA en ratas provocada por la mutación SOD1^{G93A} (Smith et al., 2006).

25 Sin embargo, este método requiere la implantación quirúrgica de un catéter a través del cráneo conectado a una bomba osmótica, y su eficacia terapéutica fue limitada (prolongación de la supervivencia del 9,1% con un tratamiento que comenzó a los 65 días de edad) (Smith et al., 2006). Basándose en este descubrimiento, Isis Pharmaceuticals inició un ensayo clínico multicéntrico de infusión de AONs en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes de ELA, que mostró la viabilidad y la ausencia de efectos adversos del tratamiento (Miller et al., 2013). Más recientemente, también se usaron AONs de bloqueo estérico para estimular la omisión de exones anormales (y la generación de mARNs que contienen codones de parada prematuros), como método alternativo para disminuir los niveles de *Sod1* de ratón en el SNC de ratones de tipo natural (Ward et al., 2014). Sin embargo, la inyección intracerebroventricular (ICV) de AONs 2'-MOE que seleccionan como objetivo el pre-mARN de *Sod1* de ratón provocó solamente una omisión débil de los exones 2 y 3 de *Sod1* en el cerebro y la médula espinal, que condujo a una reducción del 25-50% de los niveles de *Sod1*, de forma similar al nivel conseguido con la misma dosis de los AONs gámperos 2'-MOE dependientes de RNasa H usados previamente en ratas SOD1^{G93A} (Smith et al., 2006). A partir de estos resultados, se habría esperado que la mejora de la esperanza de vida fuera, como máximo, equivalente a la obtenida con las estrategias mediadas por enzimas, tales como las estrategias con ARNi o gámperos.

30 Además, el desafío inmediato que afrontan las terapias de ELAf basadas en la inhibición de SOD1 es la administración generalizada de las instrucciones de silenciamiento a todas las células afectadas. En 2007 se descubrió que, a pesar de la barrera hematoencefálica, la administración sistémica de vectores de virus adenoasociados autocomplementarios de serotipo 9 (scAAV9) permitió la transducción de células del SNC y periféricas en ratones y gatos, que incluyeron los tipos de células que se sospecha que están implicadas en la ELA (neuronas, astrocitos, y células musculares) (Duque et al., 2009) (documento EP2212424). Más recientemente, también se descubrió que el serotipo rh10 (AAV10) es eficaz para la transducción sistémica de tejidos del SNC y periféricos tras la inyección IV en ratones y títies (Hu et al., 2010; Yang et al., 2014; Zhang et al., 2011).

35 Recientemente, se ha demostrado la eficacia de las estrategias de terapias génicas basadas en AAV para la ELA en dos estudios mediante el uso de la interferencia del ARN para reducir los niveles de SOD1. Foust et al. obtuvo primero una prolongación de la supervivencia del 38% en ratones con ELA tras la inyección intravenosa (IV) en neonatos con un AAV9-shARN que seleccionaba como objetivo SOD1 (Foust et al., 2013). Además, la inyección intratecal (IT) de un AAV10-shRNA-SOD1 en ratones SOD1 de 55 días de edad post-sintomáticos dio como resultado un incremento

de la supervivencia del 22% en los ratones con ELA (Wang et al., 2013).

En vista de los logros terapéuticos limitados informados en estos estudios previos, todavía son necesarias mejoras en la tecnología para la bioterapia de la ELA.

Sumario de la invención

5 La presente invención es el resultado del hallazgo inesperado de que la supervivencia de un modelo de ELA en ratones se puede mejorar enormemente, en comparación con las estrategias terapéuticas de la ELA de la técnica anterior, cuando se administra a los ratones un oligonucleótido antisentido que está adaptado para inducir la omisión de exones en el pre-mARN de la SOD1 humana.

10 Ward et al. (citado anteriormente) informó que la disminución en la expresión de SOD1 mediante el uso de una estrategia de omisión de exones sería equivalente como máximo a la disminución obtenida con un gámpmero, es decir, con un oligonucleótido antisentido que disminuye el nivel de SOD1 no mediante una degradación de mARN mediada por una secuencia antisentido, sino a través de un mecanismo asociado a la RNasa H. La disminución de los niveles de mARN y de proteína SOD1 informados en Ward et al. también fue equivalente a la obtenida con las estrategias que implicaron el mecanismo RISC (tales como las estrategias que usaron ARNi y shARNs). Por tanto, un experto en la
15 técnica habría esperado que la mejora de la esperanza de vida resultante de usar una estrategia de omisión de exones de SOD1 fuese equivalente a la informada en los estudios previos. Los presentes inventores han mostrado inesperadamente que se puede obtener una prolongación de la supervivencia de hasta un 134%, e incluso más, a partir de la administración de un oligonucleótido antisentido que está adaptado para inducir la omisión de exones en el pre-mARN de SOD1 humana. Esta prolongación de la supervivencia es la más alta informada hasta la fecha en
20 ratones con ELA asociada a SOD1, y es mucho más eficaz que las estrategias de silenciamiento de SOD1 previas (que informan de un máximo del 38% de prolongación de la supervivencia), lo que muestra la originalidad y superioridad de esta aproximación molecular, que no se esperaba a partir de los estudios informados previamente.

Por lo tanto, en la presente memoria se describe un método para el tratamiento de la ELA, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita un oligonucleótido antisentido adaptado para inducir la omisión de exones en un pre-mARN
25 de SOD1 humana, y de ese modo induce la degradación del mARN omitido resultante que codifica la SOD1 humana.

Otro objetivo descrito en la presente memoria es un oligonucleótido antisentido específico de una secuencia de un pre-mARN de SOD1 humana, y dicho oligonucleótido antisentido está adaptado para inducir la omisión de un exón en dicho pre-mARN.

30 Otro objetivo descrito en la presente memoria es un oligonucleótido antisentido específico de un pre-mARN de SOD1 humana, para el uso en un método para el tratamiento de la ELA, en el que dicho oligonucleótido antisentido está adaptado para inducir la omisión de un exón en dicho pre-mARN.

Por lo tanto, la invención proporciona, en un primer aspecto, un oligonucleótido antisentido que selecciona como objetivo un pre-mARN de SOD1 humana, en el que dicho oligonucleótido antisentido incluye la SEQ ID N°: 1 y/o la SEQ ID N°: 4, y en el que dicho oligonucleótido está adaptado para inducir la omisión de exones en dicho pre-mARN.

35 En un segundo aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que comprende la secuencia como se muestra en SEQ ID N°: 11 o 12.

Descripción detallada de la invención

40 La presente descripción se refiere a oligonucleótidos antisentido (AONs) útiles para tratar a sujetos humanos que padecen ELA. El sujeto padece las formas esporádicas o familiares de ELA provocadas por mutaciones en el gen de SOD1 o en otros genes asociados a ELA, por ejemplo en los genes asociados a ELA que dan como resultado un incremento de los niveles de mARN de SOD1 (*base de datos de ELA en línea ALSod*, <http://alsod.iop.kcl.ac.uk>, abril de 2014). El sujeto puede estar en la etapa pre-sintomática o sintomática de la enfermedad.

45 En la presente solicitud, "oligonucleótido antisentido", o "AON" indica una secuencia de ácido nucleico monocatenaria, ADN o ARN (Chan et al., 2006), que es complementaria a una parte de un pre-mARN que codifica la proteína SOD1. En particular, el AON de la presente descripción está diseñado para bloquear un sitio aceptor de corte y empalme (SA) y/o un potenciador de corte y empalme de un exón (ESE) y/o un punto de ramificación en el pre-mARN de SOD1 y/o cualquier secuencia que pudiera modular el corte y empalme del pre-mARN, es decir, está diseñado para que sea complementario a una parte del pre-mARN de SOD1 que comprende un SA, un ESE, una secuencia de punto de ramificación o cualquier secuencia que pudiera modular el corte y empalme del pre-mARN (Cartegni et al., 2002; Reed
50 y Maniatis, 1988).

El AON se usa para inducir la omisión de exones en un pre-mARN de SOD1, y de ese modo conduce a un desplazamiento del marco de lectura que produce un cADN truncado que contiene un codón de parada prematuro en el mARN resultante. Esta estrategia, por tanto, permite la reducción del nivel de una proteína de otra manera neurotóxica que es responsable del mecanismo patógeno de la ELA.

El gen de SOD1 humana (hSOD1) está bien caracterizado. Su secuencia se informa en (ID del Gen: 6647; secuencia de referencia del NCBI, número de acceso NM_000454.4; SEQ ID N°:10).

5 Un AON según la descripción es del tipo que induce la omisión de exones en el pre-mARN de SOD1 humana. Por ejemplo, el AON implementado se puede diseñar para inducir de manera específica la omisión del exón 2, exón 3 o exón 4. En particular, el AON de la presente descripción es capaz de inducir la inclusión de un codón de parada prematuro en el mARN de SOD1 humana. Preferiblemente, el AON está adaptado para inducir la omisión del exón 2. Como se proporciona en los ejemplos, la omisión del exón 2 induce un desplazamiento del marco de lectura que conduce a un codón de parada prematuro en el exón 4.

10 Hay herramientas disponibles para identificar los SA, ESE y las secuencias de los puntos de ramificación en un pre-mARN de interés. Como conocen bien los expertos en la técnica, los SA son secuencias conservadas, están en el extremo 3' del intrón y terminan el intrón con una secuencia AG casi invariable. Además, los motivos ESE se pueden predecir en la secuencia de los exones destinados a la omisión mediante el uso de la herramienta informática ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>). Después se puede llevar a cabo el diseño del AON siguiendo las reglas publicadas en Aartsma-Rus et al. (Aartsma-Rus et al., 2009).

15 El AON de la invención está diseñado para complementar secuencias adecuadas en el pre-mARN de SOD1 humana (hSOD1) que son necesarias para un corte y empalme correcto del exón seleccionado como objetivo, y de ese modo bloquea las reacciones de corte y empalme que incorporarían el exón seleccionado como objetivo en el mARN maduro.

20 El AON de la invención puede ser de cualquier tipo adecuado. Los tipos de AON representativos incluyen oligodesoxirribonucleótidos, oligorribonucleótidos, morfollinos, oligonucleótidos antisentido de triciclo-ADN, oligonucleótidos de triciclo-fosforotioato-ADN, ALN, ARN nuclear pequeño modificado tal como AONs modificados con U7, U1 o U6 (u otros UsnRNPs), o productos conjugados de los mismos, tales como AONs conjugados a péptidos o complejados con nanopartículas.

25 Los AONs empleados en la práctica de la descripción son en general de una longitud de alrededor de 10 a alrededor de 30 nucleótidos, y pueden ser, por ejemplo, de una longitud de alrededor de 10, o alrededor de 15, o alrededor de 20 o alrededor de 30 o alrededor de 40 nucleótidos o más dependiendo de las secuencias seleccionadas como objetivo en el pre-mARN de SOD1 humana y de la química de los AONs.

Los AONs representativos para la práctica de la presente descripción se enumeran en la tabla 1:

AON1	5' CCCACACCUUCACUGGUCCA 3'	SEQ ID N°:1
AON2	5' GGCCUUCAGUCAGUCCUUUA 3'	SEQ ID N°:2
AON3	5' CUGGUCCAUUACUUUCCUUU 3'	SEQ ID N°:3
AON4	5' CCAUGCAGGCCUUCAGUCAG 3'	SEQ ID N°:4

30 En una realización particular, el AON para la práctica de la invención se selecciona de SEQ ID N°:1 y 4. En una realización adicional, las dos secuencias mostradas en SEQ ID N°:1 y 4 están incluidas en el AON de la invención.

35 Para el uso *in vivo*, los AONs se pueden estabilizar, por ejemplo por medio de modificaciones en el esqueleto de fosfato. Por ejemplo, los AONs estabilizados de la presente invención pueden tener un esqueleto modificado, p.ej. tienen uniones de fosforotioato. Otras posibles modificaciones estabilizantes incluyen modificaciones de fosfodiéster, combinaciones de modificaciones de fosfodiéster y fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato, p-etoxi, y combinaciones de las mismas. Las versiones modificadas, químicamente estabilizadas, de los AONs también incluyen "Morfollinos" (oligómeros de fosfordiamidato morfolino, PMOs), oligómeros de 2'-O-Metilo, triciclo-ADNs, moléculas de AONs de triciclo-ADN-fosforotioato (documento WO2013/053928) o ARNs nucleares pequeños (sn) de tipo U. Estas últimas formas de AONs que se pueden usar para este propósito se pueden acoplar a moléculas de ARN nuclear pequeño tales como U1, U6 o U7 (u otros UsnRNPs), en particular en combinación con un método de transferencia viral basado, pero sin limitación, en un lentivirus, retrovirus o virus adenoasociado. En una realización particular, el AON usado en la presente invención comprende la secuencia de SEQ ID N°:1 y de SEQ ID N°:4. Además, en una realización particular adicional, el AON comprende una molécula nuclear pequeña tal como U1, U6 o U7 (u otros UsnRNPs), en particular U7, e incluye la secuencia mostrada en SEQ ID N°:1 y SEQ ID N°:4. Tal AON se representa en SEQ ID N°:9.

45 Para una administración *in vivo* estable y eficaz, en particular a través de la barrera hematoencefálica, los AONs también se pueden fusionar o co-administrar con cualquier péptido de penetración celular y con péptidos señal que median en la secreción de proteínas. Los péptidos de penetración celular pueden ser péptidos RVG (Kumar et al., 2007), PIP (Betts et al., 2012), P28 (Yamada et al., 2013), o dominios de transducción de proteínas como TAT (Malhotra et al., 2013) o VP22 (Lundberg et al., 2003). Los oligonucleótidos antisentido de la invención se pueden administrar *in vivo* solos o junto con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de

facilitar la transferencia de la secuencia antisentido a las células, y preferiblemente a las células que expresan SOD1. Preferiblemente, el vector transporta la secuencia antisentido a las células con una degradación reducida respecto del grado de degradación que ocurriría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero sin limitación, plásmidos, fagómidos, virus, y otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación de las secuencias de AON. Los vectores virales son un tipo preferido de vectores e incluyen, pero sin limitación, las secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: lentivirus tales como VIH-1, retrovirus, tales como virus de la leucemia murina de Moloney, adenovirus, virus adenoasociado (AAV); virus de tipo SV40; Herpes virus tales como HSV-1 y virus vaccinia. Se pueden emplear fácilmente otros vectores que no se han nombrado pero que se conocen en la técnica. Entre los vectores que se han validado para las aplicaciones clínicas y que se pueden usar para administrar las secuencias antisentido, el lentivirus, retrovirus y AAV muestran un mayor potencial para la estrategia de omisión de exones. Los vectores basados en retrovirus y basados en lentivirus que son deficientes de replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis del AON deseado, pero incapaces de producir una partícula infecciosa) se han aprobado para los ensayos de terapia génica en seres humanos. Tienen la propiedad de integrarse en el genoma celular objetivo, y por tanto permiten una expresión persistente de transgenes en las células objetivo y su progenie.

En una realización preferida, el AON se administra mediante el uso de un vector de AAV. El virus adenoasociado (AAV) de parvovirus humano es un dependovirus que de manera natural es defectuoso de replicación, que es capaz de integrarse en el genoma de la célula infectada para establecer una infección latente. Esta última propiedad parece ser única entre los virus de mamíferos, ya que la integración se da en un sitio específico en el genoma humano, denominado AAVS1, localizado en el cromosoma 19 (19q13.3-qter). Los vectores recombinantes basados en AAV carecen de la proteína Rep y se integran con una eficacia baja, y están presentes principalmente en forma de episomas circulares estables que pueden persistir durante meses y tal vez años en las células objetivo. Por lo tanto, el AAV ha suscitado un interés considerable como vector potencial para la terapia génica humana. Entre las propiedades favorables del virus están su carencia de asociación con ninguna enfermedad humana y la amplia variedad de líneas celulares derivadas de diferentes tejidos que se pueden infectar. En la actualidad se conocen 12 serotipos de AAV (AAV1 a 12) y hasta 120 variantes (Gao et al., 2004; Gao et al., 2002), cada una con diferentes tropismos tisulares. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un vector de AAV que comprende el AON descrito anteriormente, que selecciona como objetivo un pre-mARN de SOD1 humana y que está adaptado para inducir la omisión de exones en dicho pre-mARN de SOD1 humana. Según una realización particular, el genoma de AAV deriva de un serotipo AAV1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (p.ej. AAV10 de cinomolgo o AAVrh10 de mono rhesus), 11 o 12. En una realización preferida, la cápside de AAV deriva de un serotipo AAV1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (p.ej. AAV10 de cinomolgo o AAVrh10), 11, 12, o de variantes de AAV. En una realización particular adicional, el vector de AAV es un vector pseudotipado, es decir, su genoma y cápside derivan de AAVs de serotipos diferentes. Por ejemplo, el vector de AAV pseudotipado puede ser un vector cuyo genoma deriva del serotipo AAV2, y cuya cápside deriva del serotipo AAV1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (p.ej. AAV10 de cinomolgo o AAVrh10), 11, 12 o de variantes de AAV. Además, el genoma del vector de AAV puede ser un genoma monocatenario o bicatenario autocomplementario (McCarty et al., 2001). Los vectores de AAV bicatenarios autocomplementarios se generan delecionando el sitio de resolución terminal (trs) de una de las repeticiones terminales de AAV. Estos vectores modificados, cuyo genoma de replicación tiene una longitud que es la mitad de la del genoma de AAV de tipo natural, tienen tendencia a empaquetar dímeros de ADN.

Preferiblemente, el vector de AAV implementado en la práctica de la presente invención es un vector que selecciona como objetivo las neuronas del SNC (que incluyen las neuronas motoras y las células gliales del cerebro, tronco encefálico y médula espinal) y las células musculares (Ilieva et al., 2009). En una realización preferida, el vector de AAV tiene una cápside de AAV1, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh39, AAVrh43, AAV2, AAV5, AAV8, AAV9 o AAV10, y este vector es opcionalmente un vector pseudotipado. En una realización particular, el vector de AAV tiene una cápside de AAV9 o AAV10 (p.ej. AAV10 de cinomolgo o AAVrh10) y es opcionalmente un vector pseudotipado.

En una realización particular, el AON de la invención está unido a una molécula de ARN nuclear pequeño tal como un U1, U2, U6, U7 o cualquier otro ARN nuclear pequeño, o un ARN nuclear pequeño quimérico (Cazzella et al., 2012; De Angelis et al., 2002). En particular, se puede hallar información sobre la modificación con U7 en Goyenvalle, et al. (Goyenvalle et al., 2004); documentos WO11113889; y WO06021724. En una realización particular, se usa el casete de U7 descrito por D. Schumperli (Schumperli y Pillai, 2004). Comprende el promotor de U7 natural (posición -267 a +1), el snARN de U7smOpt y la secuencia posterior a la posición 116. La secuencia natural de 18 nt complementaria a los pre-mARNs de histonas en U7smOpt se sustituye por una o dos (se usa la misma secuencia dos veces, o dos secuencias diferentes) o más repeticiones de las secuencias de AON seleccionadas mediante el uso, por ejemplo, de mutagénesis mediada por PCR, como ya se ha descrito (Goyenvalle et al., 2004).

En una realización particular, los AONs modificados con ARN nuclear pequeño, en particular los AONs modificados con U7, se vectorizan en un vector viral, más en particular en un vector de AAV.

En general, el vector también puede comprender secuencias reguladoras que permiten la expresión de los AONs codificados, tales como, p.ej., un promotor, potenciador, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), secuencias que codifican dominios de transducción de proteínas (PTD), y similares. A este respecto, el vector comprende lo más preferiblemente una región promotora, unida de manera operable a la secuencia codificante, para provocar o mejorar la expresión del AON. Tal promotor puede ser ubicuo, específico de tejido, fuerte, débil, regulado, quimérico, etc., para permitir una producción eficaz y adecuada del AON. El promotor puede ser un promotor celular, viral, fúngico, vegetal

o sintético. Los promotores más preferidos para el uso en la presente invención deben ser funcionales en las células nerviosas y musculares, más preferiblemente en las neuronas motoras y las células gliales. Los promotores se pueden seleccionar de promotores de ARNs nucleares pequeños, tales como U1, U2, U6, U7 u otros promotores de ARNs nucleares pequeños, o promotores de ARNs nucleares pequeños quiméricos. Otros promotores representativos incluyen los promotores dependientes de ARN polimerasa III, tales como el promotor H1, o los promotores dependientes de ARN polimerasa II. Los ejemplos de promotores regulados incluyen, sin limitación, los promotores que contienen un elemento de activación/inactivación de Tet, promotores inducibles por rapamicina y promotores de metalotioneína. Los ejemplos de promotores específicos para las neuronas motoras incluyen el promotor del péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), la colina acetiltransferasa (ChAT), o el Homeobox 9 (HB9). Otros promotores funcionales en las neuronas motoras incluyen promotores específicos de neuronas, tales como los promotores de enolasa específica de neuronas (NSE), sinapsina, o promotores ubicuos que incluyen los elementos silenciadores específicos de neuronas (NRSE). También se pueden usar promotores específicos de las células gliales, tales como el promotor de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Los ejemplos de promotores ubicuos incluyen los promotores virales, en particular el promotor de CMV, el promotor de RSV, el promotor de SV40, el promotor de CBA híbrido (beta actina de pollo / CMV), etc., y promotores celulares, tales como los promotores de PGK (fosfoglicerato quinasa) o EF1alfa (factor de elongación 1alfa).

En una realización particular, el AON usado en la presente invención se vectoriza en un vector viral, en particular un vector de AAV, más en particular un vector de AAV9 o AAV10 (tal como un AAV10 de cinomolgo o AAVrh10), y comprende la secuencia de SEQ ID N°:1 y de SEQ ID N°:4. Además, en una realización particular adicional, el AON vectorizado comprende una molécula nuclear pequeña tal como U1, U6 o U7 (u otros UsnRNPs), en particular U7, e incluye la secuencia mostrada en SEQ ID N°:1 y SEQ ID N°:4. Tal AON se representa en SEQ ID N°:9.

En una realización particular de la invención, denominada "borrado-sustitución" en la sección experimental más adelante, el AON como se describió anteriormente se destina a la administración junto con un casete de expresión que contiene un gen que codifica una proteína SOD1 de tipo natural, en particular una proteína SOD1 humana. Se puede proporcionar la expresión exógena de la proteína SOD1 para compensar opcionalmente la carencia de un mRNA de SOD1 de tipo natural endógeno que resulta de la administración del AON, que no selecciona como objetivo específicamente la forma mutada del mRNA de SOD1 humana, pero puede inducir también el silenciamiento de la proteína de tipo natural. En esta realización, el gen que codifica la proteína SOD1 de tipo natural (preferentemente la proteína humana de tipo natural) está diseñado para comprender mutaciones silenciosas (es decir, mutaciones que no afectan a la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína SOD1) que reducirían la hibridación del AON al mRNA correspondiente, y de ese modo se evitaría la omisión de exones en dicho mRNA de SOD1 exógena. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un gen que codifica una proteína SOD1 de tipo natural, tal como una proteína SOD1 de tipo natural humana, que está diseñado para comprender mutaciones silenciosas que dan como resultado la reducción de la hibridación de un AON de la presente invención a un mRNA codificado por este gen, en el que el gen que codifica la proteína SOD1 de tipo natural comprende la secuencia mostrada en SEQ ID N°:11, que es una secuencia de SOD1 humana modificada con mutaciones silenciosas como se proporcionó anteriormente (obsérvese que esta secuencia no comprende un codón de inicio y de parada). La secuencia de SEQ ID N°:11 puede comprender además un codón de inicio y un codón de parada, tal como en la secuencia mostrada en SEQ ID N°:12. Además, el gen puede codificar una proteína SOD1 de tipo natural marcada, tal como una proteína SOD1 marcada con Flag, y el marcador se proporciona en el extremo N-terminal o C-terminal de la proteína SOD1. Tales genes que codifican Flag-hSOD1 o hSOD1-Flag se muestran en SEQ ID N°:13 y 14. El casete de expresión puede comprender secuencias reguladoras que permiten la expresión de la proteína SOD1 exógena codificada, tales como, p.ej., un promotor, potenciador, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), secuencias que codifican dominios de transducción de proteínas (PTD), y similares. A este respecto, el vector comprende lo más preferiblemente una región promotora, unida de manera operable a la secuencia codificante, para provocar o mejorar la expresión de la proteína. Tal promotor puede ser ubicuo, específico de tejido, fuerte, regulado, quimérico, etc., para permitir una producción eficaz y adecuada de la proteína. El promotor puede ser un promotor celular, viral, fúngico, vegetal o sintético. Los promotores más preferidos para el uso en la presente invención deben ser funcionales en las células nerviosas y musculares, más preferiblemente en las neuronas motoras y las células gliales. Los ejemplos de promotores regulados incluyen, sin limitación, los promotores que contienen un elemento de activación/inactivación de Tet, promotores inducibles por rapamicina y promotores de metalotioneína. Los ejemplos de promotores específicos para las neuronas motoras incluyen el promotor del péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), la colina acetiltransferasa (ChAT), o el Homeobox 9 (HB9). Otros promotores funcionales en las neuronas motoras incluyen promotores específicos de neuronas, tales como los promotores de enolasa específica de neuronas (NSE), sinapsina, o promotores ubicuos que incluyen los elementos silenciadores específicos de neuronas (NRSE). También se pueden usar promotores específicos de las células gliales, tales como el promotor de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Los ejemplos de promotores ubicuos incluyen los promotores virales, en particular el promotor de CMV, el promotor de RSV, el promotor de SV40, el promotor de CBA híbrido (beta actina de pollo / CMV), etc., y promotores celulares, tales como los promotores de PGK (fosfoglicerato quinasa) o EF1alfa (factor de elongación 1alfa). El casete de expresión se puede incluir en un vector adecuado, tal como los vectores descritos anteriormente. En una realización particular, el vector que contiene el casete de expresión es un vector viral, en particular un vector viral capaz de transducir las neuronas motoras y las células musculares, tal como los descritos anteriormente, y en particular tal como un vector de AAV, en particular un vector de AAV que comprende una cápside de AAV9 o AAV10 (p.ej. AAV10 de cinomolgo o AAVrh10). En una variante de esta realización, los casetes que codifican el AON y el gen de SOD1

exógena, en particular la SOD1 humana, están contenidos ambos en el mismo vector, en particular un vector viral, en particular un vector viral capaz de transducir las neuronas motoras y las células musculares, tal como los descritos anteriormente, y en particular tal como un vector de AAV, en particular un vector de AAV que comprende una cápside de AAV9 o AAV10 (p.ej. AAV10 de cinomolgo o AAVrh10).

5 La descripción también se refiere a una composición que comprende un AON, o un vector que comprende el mismo, y/o un cADN de SOD1 exógena, o un vector que comprende un casete de expresión que codifica una proteína SOD1 exógena, como se describió anteriormente, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además del AON o del vector, una composición farmacéutica de la presente invención también puede incluir un vehículo farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable, tal como solución salina, fosfato sódico, etc. La composición estará en general en forma de un líquido, aunque no necesariamente. Los vehículos, excipientes y diluyentes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfatos de calcio, alginato, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metil celulosa, hidroxibenzoatos de metilo y propilo, aceite mineral, etc. La formulación también puede incluir agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, conservantes, agentes tamponadores, etc. En particular, la presente descripción implica la administración de un AON, y por tanto en cierta manera está relacionada con la terapia génica. Los expertos en la técnica reconocerán que los ácidos nucleicos se administran a menudo junto con lípidos (p.ej. lípidos catiónicos o lípidos neutros, o mezclas de estos), con frecuencia en forma de liposomas u otro material micro- o nano-estructurado adecuado (p.ej., micelas, lipocomplejos, dendrímeros, emulsiones, fases cúbicas, etc.).

20 Las composiciones descritas en la presente memoria se administran en general por medio de las vías enteral o parenteral, p.ej. de manera intravenosa (i.v.), intraarterial, subcutánea, intramuscular (i.m.), intracerebral, intracerebroventricular (i.c.v.), intratecal (i.t.), intraperitoneal (i.p.), aunque no se excluyen otros tipos de administración, p.ej. por medio de inhalación, de manera intranasal, tópica, oral, rectal, intraósea, administración mediante colirios, gotas óticas, etc.

25 En una realización particular, se administra un vector de AAV de la invención combinando una administración en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en la sangre del paciente, como se describe en el documento WO2013/190059. En una variante particular de esta realización, la administración del vector viral en el LCR del mamífero se lleva a cabo mediante inyección intracerebroventricular (i.c.v. o ICV), inyección intratecal (i.t. o IT), o inyección intracisternal, y la administración en la sangre se lleva a cabo preferiblemente mediante administración parenteral, tal como inyección i.v. (o IV), inyección i.m., inyección intraarterial, inyección i.p., inyección subcutánea, inyección intradérmica, administración nasal, administración transdérmica (parches, por ejemplo), o mediante administración enteral (oral o rectal). En una realización particular, el vector de AAV se administra por medio de las vías i.c.v. (o i.t.) e i.v. (o i.m.).

35 Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, se pueden formular según la técnica conocida mediante el uso de agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable atóxico, por ejemplo, una disolución en 1,3-butanodiol. Aunque la administración puede ser local (es decir, in situ, directamente en un tejido tal como el tejido muscular) o sistémica, normalmente la administración será local en el tejido muscular afectado, p.ej. en el músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, etc. Dependiendo de la forma de los AONs que se administran y del tipo de tejido o célula que se selecciona como objetivo, se pueden emplear técnicas tales como electroporación, sonoporación, una "pistola de genes" (que administra partículas de oro revestidas de ácidos nucleicos), etc.

40 Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad de un AON o de un vector que contiene o que expresa el AON y/o la proteína SOD1 exógena a administrar será una cantidad que es suficiente para inducir una mejora de síntomas indeseados de ELA. Tal cantidad puede variar dependiendo, entre otros, de factores tales como el sexo, la edad, el peso, el estado físico general del paciente, etc., y se pueden determinar caso por caso. La cantidad también puede variar según otros componentes de un protocolo de tratamiento (p.ej., la administración de otros medicamentos, etc.). En general, una dosis adecuada está en el intervalo de alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 100 mg/kg, y más normalmente de alrededor de 2 mg/kg/día a alrededor de 10 mg/kg. Si se elige una administración de AON basada en virus, las dosis adecuadas dependerán de diferentes factores tales como el virus que se emplea, la vía de administración (intramuscular, intravenosa, intraarterial, u otra), pero puede oscilar en general de 10^9 a 10^{15} partículas virales/kg. Los expertos en la técnica reconocerán que tales parámetros se determinan normalmente durante los ensayos clínicos. Además, los expertos en la técnica reconocerán que, aunque los síntomas de la enfermedad se pueden aliviar completamente mediante los tratamientos descritos en la presente memoria, esto no siempre es así. Incluso un alivio parcial o intermitente de los síntomas puede ser muy beneficioso para el receptor. Además, el tratamiento del paciente puede ser en una única vez (con AONs modificados o vectores de AAV), o al paciente se le administra el AON en múltiples ocasiones, que pueden tener, dependiendo de los resultados obtenidos, una separación de varios días, varias semanas, o varios meses, o incluso varios años.

60 Los métodos descritos en la presente memoria se pueden implementar de cualquiera de varias maneras diferentes. Por ejemplo, los AONs de la presente invención se pueden administrar junto con AONs diseñados para eliminar otros exones, o siARNs, o miARNs (p.ej. en una única mezcla, o en mezclas diferentes pero administradas en un corto intervalo de tiempo, tal como una directamente después de la otra, en cualquier orden, con solamente unos pocos minutos u horas entre administraciones). También se pueden administrar, como se describió anteriormente, junto con

un vector que codifica una proteína SOD1 exógena, preferentemente una proteína SOD1 humana, cuya secuencia codificante se ha diseñado para hacer que su mRNA codificado sea resistente a la omisión de exones inducida por el AON.

En un aspecto adicional, la descripción se refiere a un kit de partes, que comprende:

- 5 - un AON de la presente invención, o un vector que codifica dicho AON, como se describió anteriormente; y
- un vector que codifica una proteína SOD1 de tipo natural (tal como una proteína SOD1 humana de tipo natural, cuya secuencia codificante está diseñada para hacer que el mRNA codificado sea resistente a la omisión de exones inducida por el AON;

para su uso simultáneo, separado o secuencial en una terapia citostática.

- 10 Los aspectos y ventajas adicionales de la presente invención se describirán en la siguiente sección experimental, que se considerará ilustrativa solamente, y no limitante del alcance de esta solicitud.

Leyendas de las figuras

- 15 Figura 1: Representación gráfica de un motivo ESE potencial predicho mediante ESEfinder en el exón 2-hSOD1. Los valores umbrales se definen por defecto mediante el programa informático. SRF1 (SF2/ASF): 1,956; SRF1 (IgM-BRCA1): 1,867; SRF2 (SC35): 2,382; SRF5 (SRp40): 2,67; SRF6 (SRp55): 2,676.

Figura 2: RT-PCR de células 293T transfectadas con AON.

Figura 3: Secuenciación de la forma omitida.

- 20 Figura 4: Expresión de mRNA de hSOD1 de longitud completa en las células transfectadas. Porcentaje de reducción de hSOD1 de cada AON, en comparación con las células sin tratar: AON1: 85%; AON2: 55%; AON3: 75%; AON4: 81%. Los datos son la media +/- EEM (n = 3). **P < 0,01, ***P < 0,005, determinados mediante la prueba t de Student en comparación con las células sin tratar.

Figura 5: RT-PCR de extractos de médula espinal (ME) de ratones SOD1^{G93A} a los que se inyectaron directamente en la médula espinal (ME) 4,7x10¹² gv/kg de AAV10-U7-hSOD1 o AAV10-U7-CTR.

- 25 Figura 6: Q-RT-PCR de mRNA de hSOD1 de longitud completa en extractos de ME de ratones SOD1^{G93A} a los que se inyectó directamente en la ME. A dos ratones se les inyectaron 4,7x10¹² gv/kg de AAV10-U7-CTR: n.2 y n.5; a tres ratones se les inyectó la misma dosis de AAV10-U7-hSOD1: n.6, n.8 y n.9.

- 30 Figura 7: (a) Análisis de transferencia de Western de la expresión de la proteína hSOD1 en ratones SOD1^{G93A} a los que se inyectaron en la ME 4,7x10¹² gv/kg de AAV10-U7-hSOD1 (n=3) y la misma dosis de AAV10-U7-CTR (n=3). Se usó alfa-tubulina como control de carga. (b) Análisis densitométrico de los niveles de proteína. Los datos son la media +/- EEM (n = 3). **P < 0,01, determinado mediante la prueba t de Student en comparación con la médula espinal infectada con AAV10-U7-CTR.

Figura 8: Fotografía representativa de ratones SOD1^{G93A} a los que se inyectaron en el momento del parto en el ventrículo lateral (ICV) y la vena temporal (IV) 6x10¹⁴ gv/kg de AAV10-U7-hSOD1. Se muestra un ratón de tipo natural (TN) de igual edad (191 días) como control.

- 35 Figura 9: (a) Representación esquemática de un vector de AAV de "borrado-sustitución" que expresa simultáneamente el oligonucleótido antisentido U7-hSOD1 (bajo control del promotor de U7), y el Flag-hSOD1opt o el hSOD1opt-Flag (bajo control del promotor de PGK): AAV-U7-hSOD1-Flag-hSOD1opt o AAV-U7-hSOD1-hSOD1opt-Flag

- 40 (b) Células HEK-293T cultivadas representativas tratadas mediante GFP-inmunofluorescencia 48 horas tras la transfección con el vector de control de AAV-U7-hSOD1-GFP (derecha). El panel izquierdo representa una imagen de contraste de fases de las células. (c) Análisis de transferencia de Western del marcador Flag en células HEK-293 48 horas tras la transfección con el AAV-U7-CTR-Flag-hSOD1opt, el AAV-U7-hSOD1-Flag-hSOD1opt, o el vector de control AAV-U7-hSOD1-GFP, y en células sin transfectar. Se usó actina como control de carga.

Ejemplos

Ejemplo 1: Silenciamiento de hSOD1 y mejora de la supervivencia en ratones con ELA

- 45 Materiales y métodos

Cepas de ratones (animales), electroporación in vivo y vectores de virus adenoasociados (AAV)

El cuidado de los animales siguió las directrices europeas para el cuidado y uso de animales experimentales. Se adquirieron ratones SOD1^{G93A} con un alto número de copias, B6SJL-Tg (SOD1*G93A)1Gur/J (JACKSON n° SN 2726) de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME).

Células

Se cultivaron células HEK-293T en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contuvo un 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% de penicilina/estreptomina a 37 °C en un 5% de CO₂. Se adquirieron AONs de fosforotioato de 2'-O-metilo (2'OMePS) de Eurogentec y se resuspendieron en agua exenta de RNAsa a una concentración final de 1 µg/µl. Se transfectaron 5 µg de cada AON con Oligofectamina (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. 48 horas tras la transfección se recogieron las células para la extracción del ARN.

Extracción de ARN, transcripción inversa, RT-PCR y qRT-PCR

Se extrajo el ARN total de las células o de médulas espinales recién congeladas con el kit de extracción de ARN NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel), según el protocolo del fabricante. Se sintetizó cADN a partir de 1 µg de ARN total mediante el uso de oligo (dT) y cebadores hexaméricos aleatorios, según el protocolo del kit de síntesis de cADN iScript (Biorad). Para investigar la presencia del exón 2 en el mRNA de SOD1 humana, se llevó a cabo un análisis mediante RT-PCR de 200 ng de cADN, mediante el uso de los siguientes cebadores:

Cebador Fw1, que coincide con el exón 1 de SOD1 humana: 5'-CTAGCGAGTTATGGCGAC-3' (SEQ ID N°:5); Cebador Rev 4/5, que coincide con el (límite del exón 4 - exón 5) de la SOD1 humana : 5'-GCCAATGATGCAATGGTCTC-3' (SEQ ID N°:6).

Se llevó a cabo una PCR en tiempo real TaqMan (Q-RT-PCR) mediante el uso del sistema DNA Engine Opticon 2 (Biorad). Se amplificaron 100 ng de cADN en 10 µl de la Mezcla Maestra de PCR Universal TaqMan 2X (Life Technologies), con 1 µl del ensayo de expresión génica FAM TaqMan para SOD1 humana (Hs00533490m1, Life Technologies) y 1 µl del ensayo de expresión génica VIC TaqMan para GAPDH humana (Hs03929097_g1, Life Technologies) o para el análisis in vivo de Ipo8 de ratón (Mm01255158_m1, Life Technologies) como control endógeno. Las reacciones se incubaron 1 min a 60 °C, 10 min a 95 °C, seguido de 39 ciclos de 15 min a 95 °C y 1 min a 60 °C. Se calculó el número de copias de hSOD1 mediante el uso del método delta Ct/delta Ct. Los análisis se llevaron a cabo con el sistema DNA Engine Opticon® 2 (Biorad).

Vectores

Las secuencias de ADN que corresponden a los dos AONs de mejor rendimiento se clonaron en el pAAVsc_U7DTEX23 (amablemente proporcionado por GENETHON, Evry, Francia), mediante el uso de mutagénesis mediada por PCR, como ya se describió (Goyenvalle et al., 2004). Las partículas virales, scAAV de serotipo 10, se han producido mediante el uso del método de tri-transfección, como se describió previamente en Domínguez et al. (Domínguez et al., 2011). Los títulos del vector se determinaron mediante Q-RT-PCR de los ITRs; los títulos se expresaron como el genoma viral (gv)/ml.

Inyecciones

Para la inyección en la médula espinal de ratones adultos, se usaron ratones de 50 días de edad. Los ratones se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina/xilazina (100 mg/kg de Ketamina, 16 mg/kg de Xilazina; 0,1 ml por 10 gramos de peso corporal). Las inyecciones se llevaron a cabo como se informó en Raoul et al. 2005 (Raoul et al., 2005). Se inyectó un volumen total de 10 µl (5 µl por sitio) que contenía 9,5x10¹⁰ de gv (4,7x10¹² de gv/Kg) de cada vector en cada ratón.

Para la inyección en ratones recién nacidos, se utilizaron crías del día postnatal 1. Las inyecciones se llevaron a cabo combinando inyecciones intracerebroventriculares (ICV) e intravenosas (IV) (como se describe en Barkats, Voit, Patente WO2013190059 (A1) - 27-12-2013). Se ha inyectado un volumen total de 80 µl que contenía 7,6x10¹¹ de gv (6x10¹⁴ de gv/kg) en cada ratón. Se inyectaron 10 µl de disolución viral directamente en los ventrículos laterales, y se administraron 70 µl en la vena frontotemporal.

Análisis de transferencia de Western

Se homogeneizaron médulas espinales recién congeladas y se prepararon lisados de proteínas mediante el uso del tampón de lisis (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, 0,5% de desoxicolato sódico, 1% de NP40, 1% de SDS) suministrado con el cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche Diagnostics). Los extractos de proteínas se cuantificaron mediante un ensayo de proteínas DC (BioRad). Se separaron 30 µg en un gel de poliacrilamida del 12% (Criterion XT 10% bis-Tris, Biorad), y se analizó mediante transferencia de Western con los siguientes anticuerpos: anti-α-tubulina (T5168, Sigma Aldrich); anti-SOD1 humana (sc-8636, Santa Cruz Biotechnology). Los antisueros conjugados a peroxidasa hacia Igs de ratón y conejo se adquirieron de Amersham Pharmacia Biotech. Las transferencias de Western se revelaron mediante el uso del kit SuperSignal West Dura (ThermoScientific). El análisis densitométrico se llevó a cabo mediante el uso del programa informático Image J.

Resultados

1) *Diseño de AONs*

Para inducir la omisión de exones en el gen de SOD1 humana, se diseñaron ARN-AONs para interferir con el sitio

5
10
15
20
25
30

aceptor de corte y empalme (SA) o con las secuencias potenciadoras del corte y empalme de exones (ESE) del pre-mARN de SOD1 humana. El gen de SOD1 humana está compuesto de 5 exones, y se planeó inducir la omisión del exón 2. De hecho, la omisión del exón 2 del pre-mARN de SOD1 induce un desplazamiento del marco de lectura que produce un cADN truncado que da como resultado un codón de parada prematuro (TGA) en el exón 4. Para optimizar la omisión del exón 2, se diseñaron secuencias de AON que seleccionaban como objetivo la secuencia del SA en el intrón 1 y, debido a que se ha informado que seleccionar como objetivo las secuencias ESE puede representar una ventaja respecto de SA (Goyenvalle et al., 2004), también se diseñaron AONs que seleccionaban como objetivo las secuencias ESE del exón 2. Los ESEs son secuencias internas en los exones que facilitan el corte y empalme uniendo proteínas ricas en Ser-Arg (SR) (Cartegni et al., 2002). Para determinar estas secuencias se usó el programa informático ESEfinder, que predice los sitios de unión para las cuatro proteínas SR más abundantes (SF2/ASF, SC35, SRp40, y SRp55). En la Fig. 1 se muestran las secuencias ESE potenciales en el exón 2.

Una vez que se identificaron las supuestas secuencias objetivo, se diseñaron 4 AONs para omitir de manera específica el exón 2 de la SOD1 humana, siguiendo las reglas específicas publicadas por Aartsma-Rus et al. (Aartsma-Rus et al., 2009). Por lo tanto, cada AON (Tabla 1) se diseñó para que tuviera una longitud de 20 nucleótidos, se seleccionaron los AONs con la Tm más alta y se determinó la energía libre de la estructura secundaria predicha de los AONs y el exón objetivo, mediante el uso del programa informático RNAstructure 5.3. También se seleccionó una secuencia de AONs aleatorizada como control negativo (AON-CTR). Control de secuencia: 5' GCUCAUUCGCUUUCAUUCUU 3'(SEQ ID N°:7).

2) Selección *in vitro* de los AONs

20
25
30

Se seleccionaron los AONs óptimos basándose en su eficacia para reducir los niveles de mARN de hSOD1 tras la transfección en células HEK-293T. Para optimizar la transfección celular, se usaron AONs modificados químicamente con fosforotioato de 2'-O-metilo (2'OMePS) (Eurogentec), ya que esta modificación confiere una resistencia considerable a la degradación por nucleasas y RNasa H (Aartsma-Rus et al., 2009). Como control se usó el AON marcado con fluorescencia (FAM) aleatorizado que también se ha usado como control de la eficacia de la transfección en cada experimento. Tras el análisis mediante RT-PCR se observó el producto de PCR que correspondió a la longitud completa (355 pb) del mARN de SOD1 humana en todas las muestras. En las células transfectadas con los AONs de SOD1 se observó un producto de 258 pb adicionales, que correspondió a la forma con omisión del Exón 2 (Fig. 2). Después de secuenciar los productos de PCR, se confirmó la omisión del exón 2 en el mARN de SOD1 humana que correspondió a la banda pequeña de 258 pb (Fig. 3), con la producción de un codón de parada prematuro en el exón 4. Se concluyó que los AONs seleccionados fueron capaces de inducir la omisión del exón 2 de SOD1 humana.

Para identificar la secuencia más eficaz desde el punto de vista de la reducción de los niveles de mARN de SOD1 humana, se ha cuantificado la expresión del mARN de SOD1 de longitud completa mediante PCR en tiempo real mediante el uso del método TaqMan (Fig. 4).

35

Los AON1 y AON4 mostraron la eficacia más alta desde el punto de vista de la reducción del mARN de SOD1 humana (85% y 81%, respectivamente). Por lo tanto, se seleccionaron estos dos AONs para clonarlos juntos en una fusión con la secuencia U7snRNA en el esqueleto de scAAV. La secuencia añadida al promotor U7 es: CCCACACCTTCACTGGTCCACCATGCAGGCCTTCAGTCAG (SEQ ID N°:8)

La secuencia completa, U7+Antisentido es:

TAACAACATAGGAGCTGTGATTGGCTGTTTTTCAGCCAATCAGCACTGACTCATT
GCATAGCCTTTACAAGCGGTCAAACTCAAGAAACGAGCGGTTTTAATAGTCTT
TTAGAATATTGTTTATCGAACCGAATAAGGAACTGTGCTTTGTGATTCACATATC
AGTGGAGGGGTGTGGAAATGGCACCTTGATCTCACCCCTCATCGAAAGTGGAGTTG
ATGTCCTTCCCTGGCTCGCTACAGACGCACTTCCGCAAGCCCACACCTTCACTGGT
CCACCATGCAGGCCTTCACTGAGCAATTTTTGGAGCAGGTTTTCTGACTTCGGTCCG
GAAAACCCCTCCCAATTTCACTGGTCTACAATGAAAGCAAACAGTTCTCTTCCC
CGCTCCCCGGTGTGTGAGAGGGGCTTTGATCCTTCTCTGGTTTCCTAGGAAACGC
GTATGTG (SEQ ID NO:9).

3) Producción de scAAV10-U7-hSOD1

40

El U7snRNA normalmente está implicado en el procesamiento del extremo 3' del pre-mARN de las histonas, pero se puede convertir en una herramienta versátil para la modulación del corte y empalme mediante un pequeño cambio en el sitio de unión para las proteínas Sm/Lsm (U7 smOpt) (Schumperli y Pillai, 2004). La secuencia antisentido, incrustada en una partícula de snRNP, se protege por tanto de la degradación y se acumula en el núcleo, donde se

da el corte y empalme. Para administrar AONs a ratones SOD1^{G93A}, se ha usado el casete U7 descrito por D. Schumperli (Schumperli y Pillai, 2004). Consiste en el promotor de U7 natural (posición -267 a +1), el snARN de U7 smOpt y la secuencia posterior a la posición 116. Este casete se ha colocado entre las repeticiones terminales invertidas (ITR) de un esqueleto de scAAV, y la secuencia natural de 18 nt complementaria a los pre-mARNs de histonas en U7smOpt se ha sustituido por las dos secuencias de AONs de 20 nt seleccionadas (y una secuencia de control, CTR; descrita en Pietri-Rouxel, 2009 et al.), y se produjeron las partículas virales correspondientes (concretamente AAV10-U7-CTR y AAV10-U7-hSOD1).

4) *Omisión de exones de hSOD1 in vivo en ratones SOD1^{G93A}*

Para analizar su eficacia en la reducción de los niveles de ARN de hSOD1, AAV10-U7-CTL y AAV10-U7-hSOD1 se inyectaron directamente en la médula espinal de ratones SOD^{G93A} de 50 días de edad ($n=3$ para AAV10-U7-hSOD1 y $n=2$ para AAV10-U7-CTR). Cuatro semanas tras la inyección, se extrajeron las médulas espinales y se analizó la omisión del exón 2 en los mARNs de SOD mediante el uso de RT-PCR (Fig. 5). También se estudió la expresión de SOD1 humana mediante análisis de PCR en tiempo real como se describió en los experimentos *in vitro* previos (Fig. 6). Como se esperaba, la forma con omisión del exón 2 se observó solamente en las médulas espinales de los animales a los que se inyectó AAV10-U7-hSOD1 (Fig. 5), con una reducción de más del 80% del mARN de hSOD1 de longitud completa (Fig. 6).

De forma similar a los análisis de ARN, el efecto de la omisión del exón 2 se analizó adicionalmente a nivel de proteínas un mes tras la inyección del control y los vectores de AAV de U7-hSOD1 en la médula espinal de ratones SOD^{G93A} ($n=3$ en cada grupo). El análisis mediante transferencia de Western mostró una reducción del 70% de la proteína hSOD1 en la médula espinal de los 3 ratones a los que se inyectó AAV10-U7-hSOD1 en comparación con los controles (Fig. 7).

Después se investigó el efecto terapéutico potencial del vector AAV10-U7-hSOD1 en ratones con ELA mediante inyecciones combinadas intravenosas (IV) e intracerebroventriculares (ICV) en ratones SOD^{G93A} presintomáticos para conseguir una reducción de hSOD1 tanto central como sistémica (inyecciones en P1; $n=4$ con 6×10^6 de gv/kg de AAV10-U7-hSOD1 y $n=3$ con la misma dosis de AAV10-U7-CTR).

La supervivencia de los cuatro ratones a los que se inyectó AAV10-U7-hSOD1 se incrementó significativamente en comparación con los ratones a los que se inyectó el control, y la supervivencia media fue de 260 días, frente a 128 días en los controles sin inyección (Fig. 7). Esta prolongación de la supervivencia (de hasta un 134%) es la más alta informada hasta la fecha en ratones con ELA asociada a SOD1, lo que sugiere la originalidad y superioridad de esta aproximación molecular.

Conclusión

Este estudio es un proyecto traslacional dirigido a identificar los tratamientos de terapia génica más eficaces para la ELA familiar. La coadministración de scAAV10 en el torrente sanguíneo y el SNC (Co-IV/ICV) es una aproximación potente para la administración génica generalizada en la médula espinal y en todo el cuerpo. La combinación de la transferencia génica de AAV10 Co-IV/ICV con la estrategia de omisión de exones eficaz permite un silenciamiento intenso de hSOD1 y media en la prolongación de la supervivencia más alta informada hasta la fecha en roedores con ELA. Como comparación, el ensayo clínico Cleveland/ISIS que usa la infusión cerebral de ASOs se basa en una prolongación del 9,1% de la supervivencia de ratas (Smith et al., 2006), y recientemente el equipo de Kaspar ha publicado una supervivencia incrementada en un 38% mediante el uso de AAV9-shRNA (Foust et al., 2013).

Estos resultados preliminares ofrecen nuevas posibilidades realistas incluso para incrementar adicionalmente la supervivencia de ratones con ELA, y se podrían trasladar directamente al desarrollo clínico en un futuro próximo.

Los resultados presentados en el Ejemplo 1 mostraron que la inyección de AAV10-U7-hSOD1 proporcionó un beneficio terapéutico considerable en ratones SOD1^{G93A} silenciando hSOD1.

Ejemplo 2: Estrategia de "borrado-sustitución"

El beneficio terapéutico de la administración de AAV10-U7-hSOD1 se podría mejorar mediante la expresión adicional de la proteína hSOD1 de tipo natural. De hecho, la administración de AAV10-U7-hSOD1, que no selecciona como objetivo específicamente la forma mutada del mARN de SOD1 humana, también podría inducir el silenciamiento de la proteína SOD1 de tipo natural endógena, y de ese modo se desencadenarían efectos secundarios potenciales. El silenciamiento de la SOD1 de tipo natural endógena mediante AAV10-U7-hSOD1 se podría compensar introduciendo en este vector una secuencia de SOD1 de tipo natural que comprendiese mutaciones "silenciosas" para evitar la omisión de exones.

La siguiente sección presenta datos a este respecto.

Materiales y Métodos

Vectores

- 5 Las secuencias de ADN que codifican el hSOD1opt con el marcador Flag en el extremo N terminal o C terminal se sintetizaron mediante GeneArt (Life Technologies), y se clonaron inicialmente mediante digestión enzimática en un vector pAAV vacío disponible en el laboratorio que portaba el promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK), un intrón de β -globina quimérica, un único sitio de restricción de Nhe I, y la señal de terminación del virus simio 40 (SV40). El casete que contenía el hSOD1opt bajo control del promotor de PGK se clonó mediante PCR en el vector pAAV-U7-SOD1 o el pAAV-U7-CTR, antes del promotor de U7 y en dos direcciones. Con el mismo método se insertó la PGK-GFP, amplificada a partir de un plásmido disponible en el laboratorio, en cada pAAV-U7, como control.

Se proporciona la nomenclatura de los vectores en la siguiente tabla:

Nombre del vector	Descripción
Vectores para la estrategia de borrado/sustitución	
pAAV-U7-hSOD 1-Flag-hSOD1opt	AAV-U7-hSDO1 que co-expresa PGK-hSOD1opt con Flag en el extremo N-terminal
pAAV-U7-hSOD1-hSOD1opt-Flag	AAV-U7-hSOD1 que co-expresa PGK-hSOD1opt con Flag en el extremo C-terminal
Vectores de control	
pAAV-U7-CTR-Flag-hSOD1opt	AAV-U7-CTR que co-expresa PGK-hSOD1opt con Flag en el extremo N-terminal
pAAV-U7-CTR-hSOD1opt-Flag	AAV-U7-CTR que co-expresa PGK-hSOD1opt con Flag en el extremo C-terminal
pAAV-U7-hSOD1-GFP	AAV-U7-hSDO1 que co-expresa PGK-GFP
pAAV-U7-hSOD1-GFP	AAV-U7-CTR que co-expresa PGK-GFP

10 Células

Se transfectaron 2 μ g de cada plásmido con Lipofectamina y Reactivo Plus (Life Technologies) en medio OPTIMEM (Life Technologies) sin FBS (según las instrucciones del fabricante). Después de 3 horas a 37 °C en un 5% de CO₂, la transfección se paró con la adición de DMEM con un 10% de FBS.

Análisis de transferencia de Western

- 15 Las células se recogieron 48 h tras la transfección; se prepararon lisados de proteínas como se describe en el Ejemplo 1. Se llevó a cabo la transferencia de Western con los siguientes anticuerpos: anti-Flag M2 (Sigma) y anti-actina (Sigma). Los antisueros conjugados a peroxidasa hacia Igs de ratón y conejo se adquirieron de Amersham Pharmacia Biotech. Las transferencias de Western se revelaron mediante el uso del kit SuperSignal West Dura (Thermoscientific).

Resultados

- 20 Para obtener tanto la inhibición de la hSOD1 mutada tóxica como la expresión de una proteína hSOD1 funcional, se concibió una estrategia de "borrado-sustitución", en la que al vector pAAV-U7-hSOD1 de silenciamiento se le proporcionó un cADN de hSOD1 exógena para la expresión de la SOD1 de tipo natural. La secuencia codificante de hSOD1 de tipo natural (hSOD1opt) se diseñó para que portase un número máximo de emparejamientos incorrectos con la secuencia antisentido para que fuera resistente a la acción de U7-antisentido (GeneArt, Life Technologies).
- 25 Para permitir la identificación de la proteína hSOD1 exógena, se fusionó un péptido marcador Flag al cADN. Debido a que la posición C- o N-terminal de Flag podría tener efectos sobre la expresión y/o función de hSOD1opt, se añadió en el extremo N-terminal (Flag-hSOD1opt) o C-terminal (hSOD1opt-Flag) de la proteína. La secuencia se colocó bajo control del promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK), en la misma dirección que el promotor de U7 o en la dirección opuesta. Los vectores de AAV terapéuticos finales, AAV-U7-hSOD1-Flag-hSOD1opt y AAV-U7-hSOD1-Flag, se muestran en la Fig. 9. Una secuencia que codificaba la proteína fluorescente verde (GFP), colocada bajo control del promotor de PGK, también se insertó en los vectores pAAV-U7 como control (pAAV-U7-hSOD1-GFP).
- 30

- Para investigar si estos nuevos vectores de silenciamiento de AAV-U7 podrían inducir simultáneamente la expresión de hSOD1, primero se transfectaron células renales embrionarias humanas (HEK-293T) con pAAV-U7-hSOD1-GFP y se investigó la expresión de GFP 48 horas más tarde mediante imagenología en vivo con un microscopio de epifluorescencia (Fig. 9b). Los resultados de fluorescencia de GFP indicaron que los dos vectores que portaban tanto la molécula U7 (U7-SOD1 o U7-CTR) como el casete de expresión de GFP fueron eficaces para la producción de la proteína. Además, la expresión de hSOD1opt se estudió mediante análisis de transferencia de Western del marcador Flag en lisados celulares 48 h tras la transfección (Fig. 9c), lo que reveló la síntesis eficaz de la proteína hSOD1opt
- 35

marcada.

En conjunto, estos datos mostraron que se pueden diseñar AONs que inducen la omisión de exones en una forma mutada del mRNA de hSOD1 para disminuir intensamente los niveles de la proteína hSOD1, y que la expresión concomitante de una proteína hSOD1 exógena se puede llevar a cabo mediante el uso de una secuencia codificante optimizada.

Referencias

- Aartsma-Rus, A., van Vliet, L., Hirschi, M., Janson, A.A., Heemskerk, H., de Winter, C.L., de Kimpe, S., van Deutekom, J.C., t Hoen, P.A., y van Ommen, G.J. (2009). Guidelines for antisense oligonucleotide design and insight into splice-modulating mechanisms. *Mol Ther* 17, 548-553.
- 10 Betts, C., Saleh, A.F., Arzumanov, A.A., Hammond, S.M., Godfrey, C., Coursindel, T., Gait, M.J., y Wood, M.J. (2012). Pip6-PMO, A New Generation of Peptide-oligonucleotide Conjugates With Improved Cardiac Exon Skipping Activity for DMD Treatment. *Molecular Therapy Nucleic Acids* 1, e38.
- Boudreau, R.L., Rodríguez-Lebron, E., y Davidson, B.L. (2011). RNAi medicine for the brain: progresses and challenges. *Hum Mol Genet* 20, R21-27.
- 15 Cartegni, L., Chew, S.L., y Krainer, A.R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3, 285-298.
- Cazzella, V., Martone, J., Pinnaro, C., Santini, T., Twayana, S.S., Sthandier, O., D'Amico, A., Ricotti, V., Bertini, E., Muntoni, F., et al. (2012). Exon 45 skipping through U1-snRNA antisense molecules recovers the Dys-nNOS pathway and muscle differentiation in human DMD myoblasts. *Mol Ther* 20, 2134-2142.
- 20 Chan, J.H., Lim, S., y Wong, W.S. (2006). Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 33, 533-540. Crooke, S.T. (2004). Antisense strategies. *Current Molecular Medicine* 4, 465-487.
- De Angelis, F.G., Sthandier, O., Berarducci, B., Toso, S., Galluzzi, G., Ricci, E., Cossu, G., y Bozzoni, I. (2002). Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9456-9461.
- 25 Domínguez, E., Marais, T., Chatauret, N., Benkhalifa-Ziyyat, S., Duque, S., Ravassard, P., Carcenac, R., Astord, S., Pereira de Moura, A., Voit, T., et al. (2011). Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice. *Hum Mol Genet* 20, 681-693.
- 30 Dorn, G., Patel, S., Wotherspoon, G., Hemmings-Mieszczyk, M., Barclay, J., Natt, F.J., Martin, P., Bevan, S., Fox, A., Ganju, P., et al. (2004). siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic Acids Res* 32, e49.
- Duque, S., Joussemet, B., Riviere, C., Marais, T., Dubreil, L., Douar, A.M., Fyfe, J., Moullier, P., Colle, M.A., y Barkats, M. (2009). Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther* 17, 1187-1196.
- 35 Foust, K.D., Salazar, D.L., Likhite, S., Ferraiuolo, L., Ditsworth, D., Ilieva, H., Meyer, K., Schmelzer, L., Braun, L., Cleveland, D.W., et al. (2013). Therapeutic AAV9-mediated Suppression of Mutant SOD1 Slows Disease Progression and Extends Survival in Models of Inherited ALS. *Mol Ther*.
- Gao, G., Vandenberghe, L.H., Alvira, M.R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X., y Wilson, J.M. (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 78, 6381-6388.
- 40 Gao, G.P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., y Wilson, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11854-11859.
- Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougereuse, F., Leturcq, F., Kaplan, J.C., García, L., y Danos, O. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 306, 1796-1799.
- 45 Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., et al. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772-1775.
- Hu, C., Busuttill, R.W., y Lipshutz, G.S. (2010). RH10 provides superior transgene expression in mice when compared with natural AAV serotypes for neonatal gene therapy. *The Journal of Gene Medicine* 12, 766-778.
- 50 Ilieva, H., Polymenidou, M., y Cleveland, D.W. (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 187, 761-772.

- Kumar, P., Wu, H., McBride, J.L., Jung, K.E., Kim, M.H., Davidson, B.L., Lee, S.K., Shankar, P., y Manjunath, N. (2007). Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448, 39-43.
- Lundberg, M., Wikstrom, S., y Johansson, M. (2003). Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol Ther* 8, 143-150.
- 5 Malhotra, M., Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., Kahouli, I., y Prakash, S. (2013). Development and characterization of chitosan-PEG-TAT nanoparticles for the intracellular delivery of siRNA. *International Journal of Nanomedicine* 8, 2041-2052.
- McCarty, D.M., Monahan, P.E., y Samulski, R.J. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 8, 1248-1254.
- 10 Miller, T.M., Pestronk, A., David, W., Rothstein, J., Simpson, E., Appel, S.H., Andres, P.L., Mahoney, K., Allred, P., Alexander, K., et al. (2013). An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *Lancet Neurology* 12, 435-442.
- Pietri-Rouxel F., Gentil C, Vassilopoulos S, Baas D, Mouisel E, Ferry A, Vignaud A, Hourdé C, Marty I, Schaeffer L, Voit T, García L. et al. (2009) DHPH alphaS subunit controls skeletal muscle mass and morphogenesis. *EMBO J* 29, 643-654.
- 15 Ralph, G.S., Radcliffe, P.A., Day, D.M., Carthy, J.M., Leroux, M.A., Lee, D.C., Wong, L.F., Bilsland, L.G., Greensmith, L., Kingsman, S.M., et al. (2005). Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11, 429-433.
- Raoul, C., Abbas-Terki, T., Bensadoun, J.C., Guillot, S., Haase, G., Szulc, J., Henderson, C.E., y Aebischer, P. (2005). Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med* 11, 423-428.
- 20 Reed, R., y Maniatis, T. (1988). The role of the mammalian branchpoint sequence in pre-mRNA splicing. *Genes & Development* 2, 1268-1276.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59-62.
- 25 Schumperli, D., y Pillai, R.S. (2004). The special Sm core structure of the U7 snRNP: far-reaching significance of a small nuclear ribonucleoprotein. *Cell Mol Life Sci* 61, 2560-2570.
- Smith, R.A., Miller, T.M., Yamanaka, K., Monia, B.P., Condon, T.P., Hung, G., Lobsiger, C.S., Ward, C.M., McAlonis-Downes, M., Wei, H., et al. (2006). Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 116, 2290-2296.
- 30 Wang, H., Yang, B., Qiu, L., Yang, C., Kramer, J., Su, Q., Guo, Y., Brown, R.H., Jr., Gao, G., y Xu, Z. (2013). Widespread spinal cord transduction by intrathecal injection of rAAV delivers efficacious RNAi therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*.
- 35 Ward, A.J., Norrbom, M., Chun, S., Bennett, C.F., y Rigo, F. (2014). Nonsense-mediated decay as a terminating mechanism for antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 42, 5871-5879.
- Yamada, T., Das Gupta, T.K., y Beattie, C.W. (2013). p28, an anionic cell-penetrating peptide, increases the activity of wild type and mutated p53 without altering its conformation. *Molecular Pharmaceutics* 10, 3375-3383.
- 40 Yang, B., Li, S., Wang, H., Guo, Y., Gessler, D.J., Cao, C., Su, Q., Kramer, J., Zhong, L., Seher Ahmed, S., et al. (2014). Global CNS Transduction of Adult Mice by Intravenously Delivered rAAVrh.8 and rAAVrh.10 and Nonhuman Primates by rAAVrh.10. *Mol Ther*.
- Zhang, H., Yang, B., Mu, X., Ahmed, S.S., Su, Q., He, R., Wang, H., Mueller, C., Sena-Esteves, M., Brown, R., et al. (2011). Several rAAV vectors efficiently cross the blood-brain barrier and transduce neurons and astrocytes in the neonatal mouse central nervous system. *Mol Ther* 19, 1440-1448.
- 45

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ASSOCIATION INSTITUT DE MYOLOGIE ET AL.

5 <120> TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTROFICA
 <130> B1849PC00
 <160> 14

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 20
 15 <212> ARN
 <213> artificial

<220>
 <223> AON1

20 <400> 1
 cccacacuuu cacuggucca 20

<210> 2
 25 <211> 20
 <212> ARN
 <213> artificial

<220>
 30 <223> AON2

<400> 2
 ggccuucagu caguccuuua 20

35 <210> 3
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> artificial

40 <220>
 <223> AON3

<400> 3
 45 cugguccauu acuuuccuuu 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> artificial

50 <220>
 <223> AON4

<400> 4
 55 ccaugcaggc cuucagucag 20

<210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 60 <213> artificial

<220>
 <223> cebador

ES 2 806 087 T3

<400> 5
ctagcgagtt atggcgac 18

5 <210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 6
gccaatgatg caatggtctc 20

15 <210> 7
<211> 20
<212> ARN
<213> artificial

20 <220>
<223> AON de control

<400> 7
gcucauucgc uuucauucuu 20

25 <210> 8
<211> 40
<212> ADN
<213> artificial

30 <220>
<223> fusión de AON

<400> 8
cccacacctt cactggtcca ccatgcaggc cttcagtcag 40

40 <210> 9
<211> 448
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> U7 + AON

45 <400> 9
taacaacata ggagctgtga ttggctgttt tcagccaatc agcactgact catttgcata 60
gcctttacaa gcggtcacia actcaagaaa cgagcggttt taatagtctt ttagaatatt 120
gtttatcgaa ccgaataagg aactgtgctt tgtgattcac atatcagtgagg aggggtgtgg 180
aaatggcacc ttgatctcac cctcatcgaa agtggagttg atgtccttcc ctggctcgct 240
acagacgcac ttccgcaagc ccacaccttc actggtccac catgcaggcc ttcagtcaga 300
atTTTTggag caggTTTTct gacttcggtc ggaaaacccc tccaatttc actggtctac 360
aatgaaagca aacagttct cttccccgct ccccggtgtg tgagaggggc tttgatcctt 420
ctctggtttc ctaggaaacg cgtatgtg 448

50 <210> 10
<211> 465
<212> ADN
<213> homo sapiens

55 <400> 10

ES 2 806 087 T3

atggcgacga aggccgtgtg cgtgctgaag ggcgacggcc cagtgcaggg catcatcaat 60
 ttcgagcaga aggaaagtaa tggaccagtg aaggtgtggg gaagcattaa aggactgact 120
 gaaggcctgc atggattcca tgttcagtga tttggagata atacagcagg ctgtaccagt 180
 gcaggtcctc actttaatcc tctatccaga aaacacgggtg ggccaaagga tgaagagagg 240
 catgttgag acttgggcaa tgtgactgct gacaaagatg gtgtggccga tgtgtctatt 300
 gaagattctg tgatctcact ctcaggagac cattgcatca ttggccgcac actggtggtc 360
 catgaaaaag cagatgactt gggcaaagggt ggaaatgaag aaagtacaaa gacaggaaac 420
 gctggaagt c gtttggttg tgggtgaatt gggatcgccc aataa 465

5 <210> 11
 <211> 459
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> gen que codifica hSOD1 con mutaciones silenciosas

<400> 11
 gccaccaagg ccgtgtgctg gctgaagggg gatggacctg tgcagggcat catcaacttc 60
 gagcagaaaag aaagcaacgg ccctgtcaaa gtctggggca gcatcaaggg cctcacagag 120
 ggactccacg gcttccacgt gcacgagttc ggcgataata ccgccggctg tacctctgcc 180
 ggccctcact tcaaccccct gtccagaaaa cacggcggac ccaaggacga ggaacggcac 240
 gtgggcgatc tgggcaatgt gaccgccgac aaagatggcg tggccgacgt gtccatcgag 300
 gacagcgtga tcagcctgag cggcgaccac tgcatcatcg gcagaaccct ggtggtgcac 360
 gagaaggccg atgacctggg caagggcggc aacgagggaa gcaccaagac aggcaacgcc 420
 ggcagcagac tggcctgtgg cgtgatcgga atcgctcaa 459

15 <210> 12
 <211> 468
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> secuencia que codifica hSOD1 con mutaciones silenciosas + codones de inicio y parada

<400> 12
 atggccacca aggccgtgtg cgtgctgaag ggggatggac ctgtgcaggg catcatcaac 60
 ttcgagcaga aagaaagcaa cggccctgtc aaagtctggg gcagcatcaa gggcctcaca 120
 gagggactcc acggcttcca cgtgcacgag ttcggcgata ataccgccgg ctgtacctct 180
 gccggccctc acttcaaccc cctgtccaga aaacacggcg gaccaagga cgaggaacgg 240
 cacgtgggag atctgggcaa tgtgaccgcc gacaaagatg gcgtggccga cgtgtccatc 300
 gaggacagcg tgatcagcct gagcggcgac cactgcatca tcggcagaac cctggtggtg 360
 cacgagaagg ccgatgacct gggcaagggc ggcaacgagg aaagcaccaa gacaggcaac 420
 gccggcagca gactggcctg tggcgtgatc ggaatcgctc aatgatga 468

25 <210> 13
 <211> 489
 <212> ADN

ES 2 806 087 T3

<213> artificial

<220>

<223> Flag-hSODlopt

5

<400> 13

```

atggactaca aagacgatga cgacaaggcc accaaggccg tgtgcgtgct gaagggggat      60
ggacctgtgc agggcatcat caacttcgag cagaaagaaa gcaacggccc tgtcaaagtc      120
tggggcagca tcaagggcct cacagaggga ctccacggct tccacgtgca cgagttcggc      180
gataataacc cggctgttac ctctgccggc cctcaacttca accccctgtc cagaaaacac      240
ggcggaccca aggacgagga acggcacgtg ggcgatctgg gcaatgtgac cgccgacaaa      300
gatggcgtgg ccgacgtgtc catcgaggac agcgtgatca gcctgagcgg cgaccactgc      360
atcatcggca gaaccctggt ggtgcacgag aaggccgatg acctgggcaa gggcggcaac      420
gaggaaagca ccaagacagc caacgccggc agcagactgg cctgtggcgt gatcggaatc      480
gctcaatga                                     489
  
```

<210> 14

<211> 489

<212> ADN

<213> artificial

10

<220>

<223> hSODlopt-Flag

15

<400> 14

```

atggccacca aggccgtgtg cgtgctgaag ggggatggac ctgtgcaggg catcatcaac      60
ttcgagcaga aagaaagcaa cggccctgtc aaagtctggg gcagcatcaa gggcctcaca      120
gagggactcc acggcttcca cgtgcacgag ttcggcgata ataccgccgg ctgtacctct      180
gccggccctc acttcaacct cctgtccaga aaacacggcg gacccaagga cgaggaacgg      240
cacgtgggag atctgggcaa tgtgaccgcc gacaaagatg gcgtggccga cgtgtccatc      300
gaggacagcg tgatcagcct gagcggcgac cactgcatca tcggcagaac cctggtggtg      360
cacgagaagg ccgatgacct gggcaagggc ggcaacgagg aaagcaccaa gacaggcaac      420
gccggcagca gactggcctg tggcgtgatc ggaatcgctc aagactacaa agacgatgac      480
gacaagtga                                     489
  
```

20

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido que selecciona como objetivo un pre-mARN de SOD1 humana, en el que dicho oligonucleótido antisentido incluye la SEQ ID N°:1 y/o la SEQ ID N°:4, y en el que dicho oligonucleótido está adaptado para inducir la omisión de exones en dicho pre-mARN.
- 5 2. El oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que dicho oligonucleótido antisentido incluye la SEQ ID N°:1 y la SEQ ID N°:4.
3. El oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho oligonucleótido antisentido está modificado con un ARN nuclear pequeño tal como el ARN nuclear pequeño de U7.
4. Un vector que comprende el oligonucleótido antisentido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 10 5. Un vector viral que codifica el oligonucleótido antisentido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, tal como un vector de AAV, en particular un vector de AAV9 o AAV10.
6. El vector según la reivindicación 4 o 5, en el que dicho vector comprende además un casete de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína SOD1 humana, en el que la secuencia de nucleótidos está diseñada de forma que el oligonucleótido antisentido no puede inducir la omisión de exones en el pre-mARN codificado por dicha secuencia de nucleótidos.
- 15 7. El oligonucleótido antisentido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el vector según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, para el uso en un método para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica, en particular en el que dicho oligonucleótido antisentido o dicho vector se destina a la administración por medio de las vías intravenosa y/o intracerebroventricular.
- 20 8. Un ácido nucleico que comprende la secuencia como se muestra en SEQ ID N°:11 o 12.
9. Un casete de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8.
10. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8 o el casete de expresión de la reivindicación 9, en particular en el que dicho vector es un plásmido o un vector viral.
- 25 11. Una célula hospedadora transformada con un vector según la reivindicación 10, en particular en la que dicha célula es una célula eucariótica o procariótica.
12. La célula hospedadora según la reivindicación 11, que es una célula de mamífero, humano o no humano, con la condición de que cuando la célula es una célula humana, dicha célula no es una célula madre embrionaria humana y no es parte del cuerpo humano.

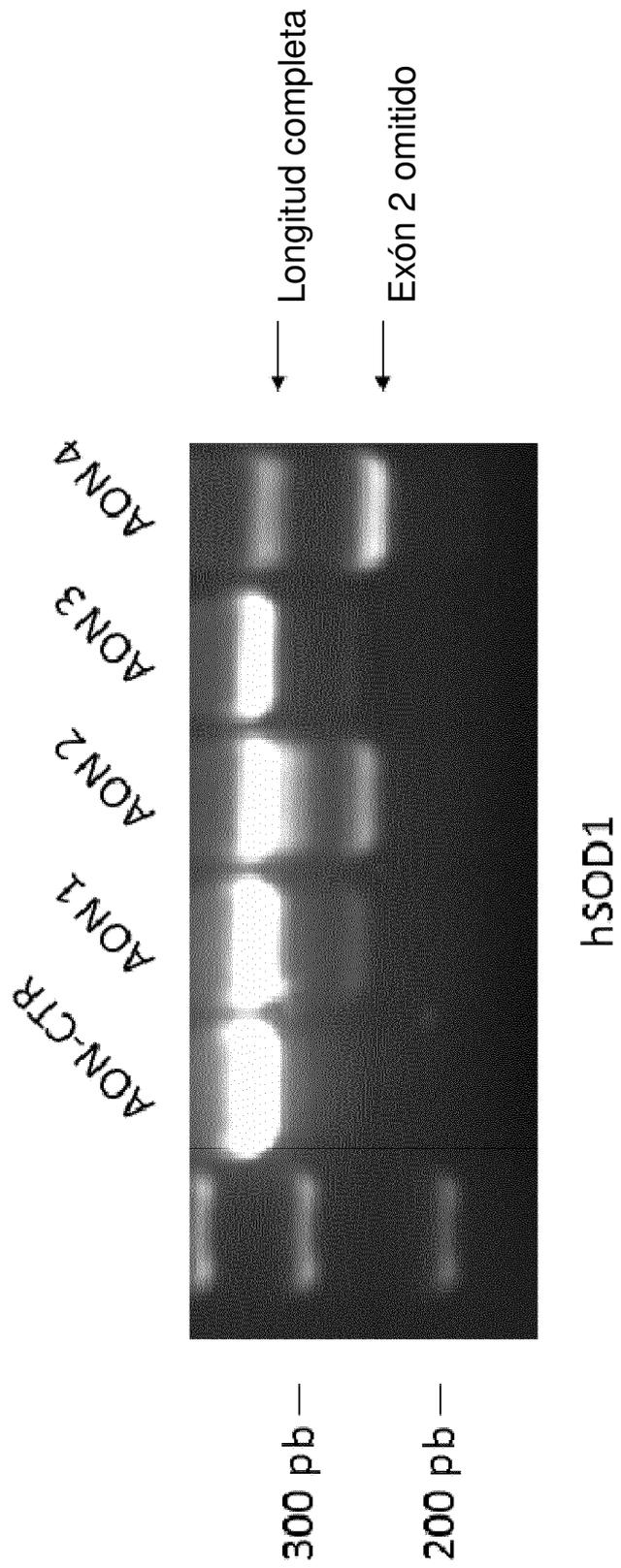
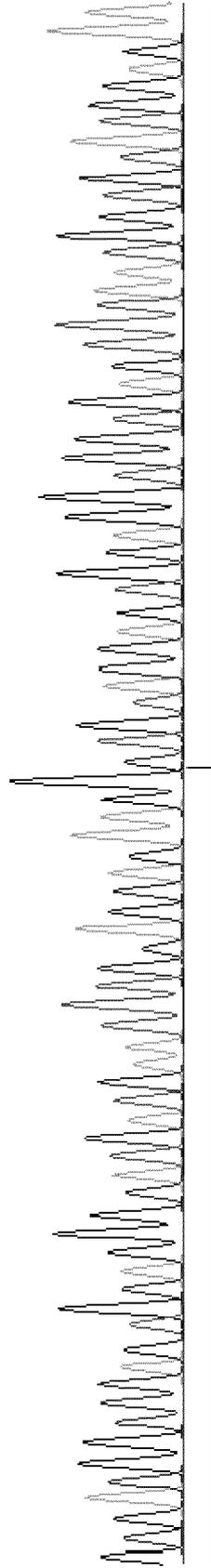


Figura 2

100 GCGACGGGCCCCAGTGCAGGGCATCATCAA TTTTCGAGCAG AAGGC TG TACCAGTGCAGG TCCCTCAC TTTTAA TCCCTCTATCCAGAAA
110
120
130
140
150
160
170
180



Exón 1

Exón 3

Figura 3

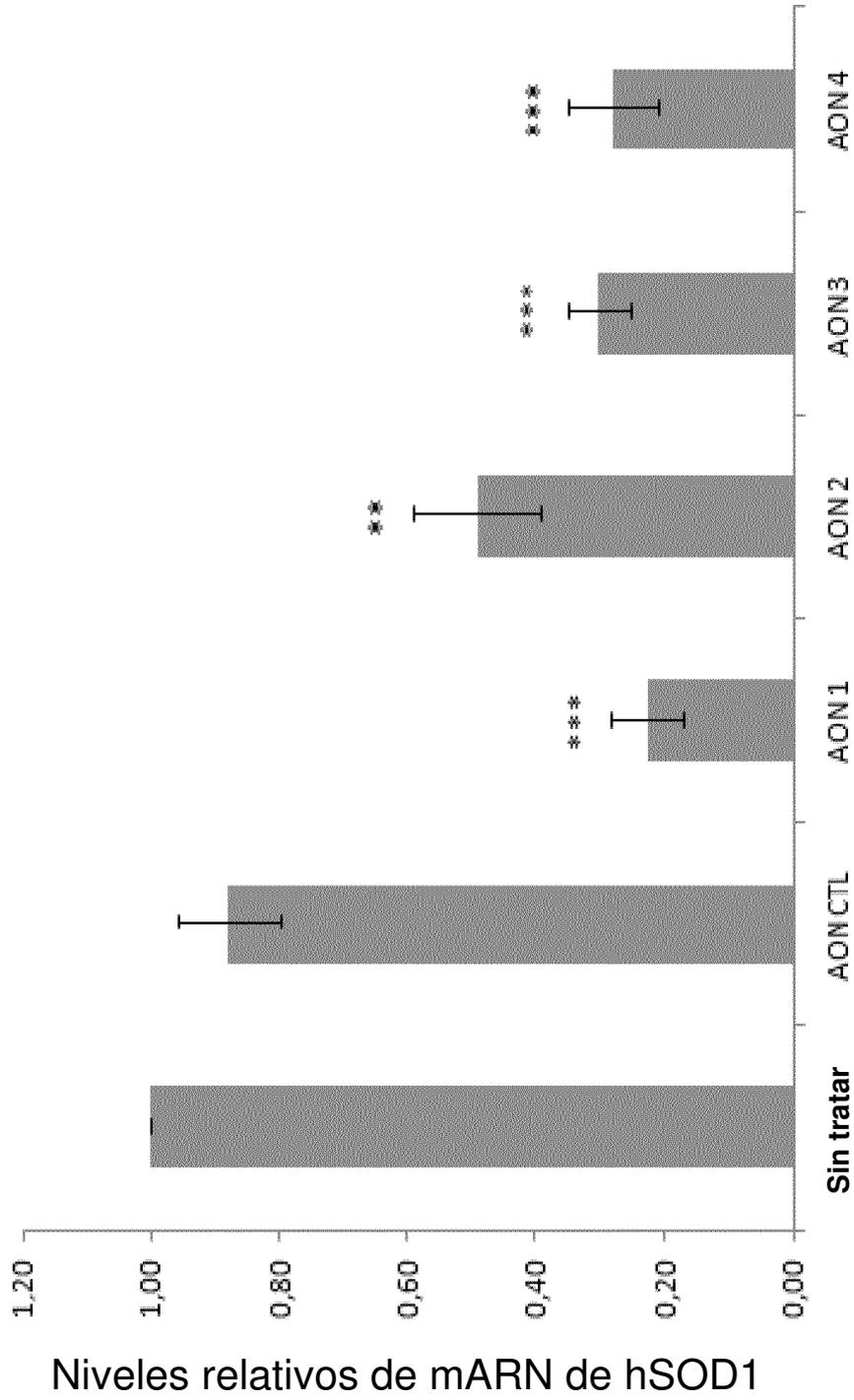


Figura 4

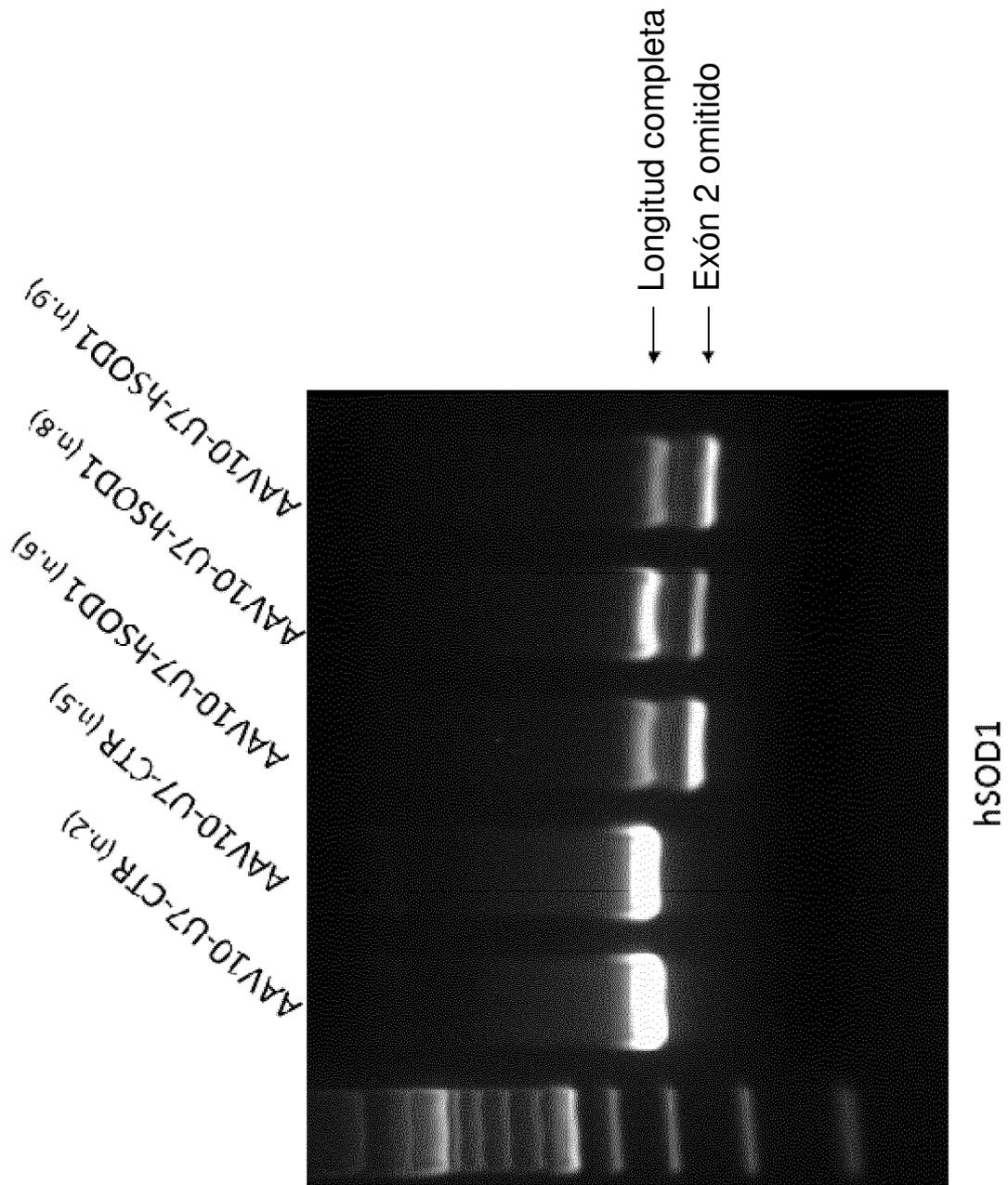


Figura 5

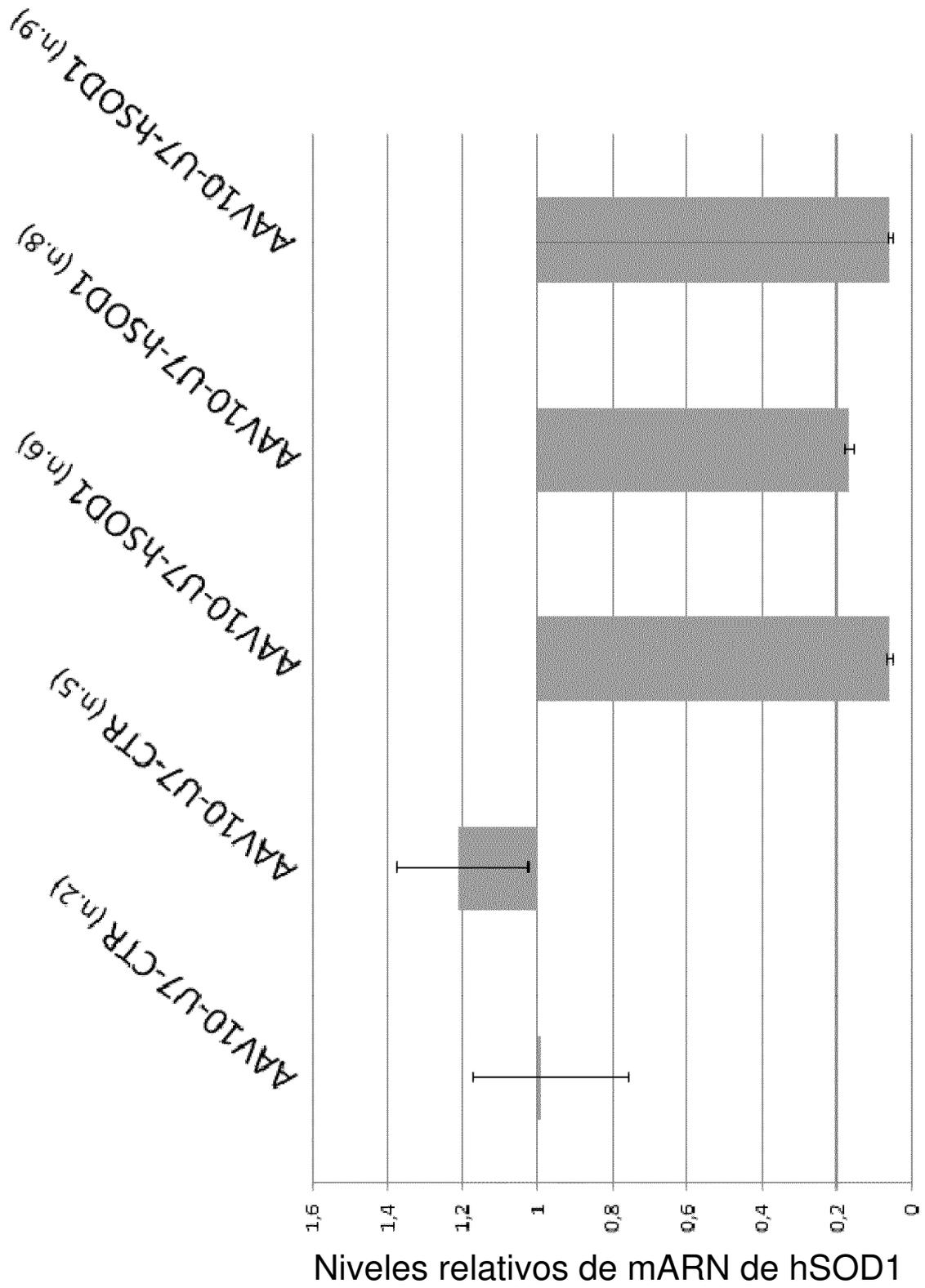
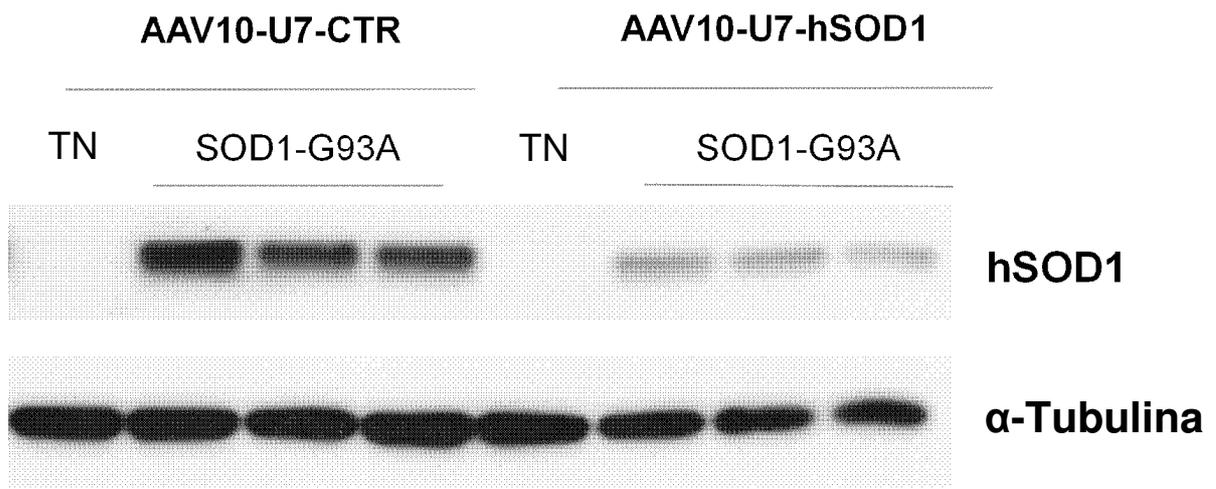


Figura 6

a)



b)

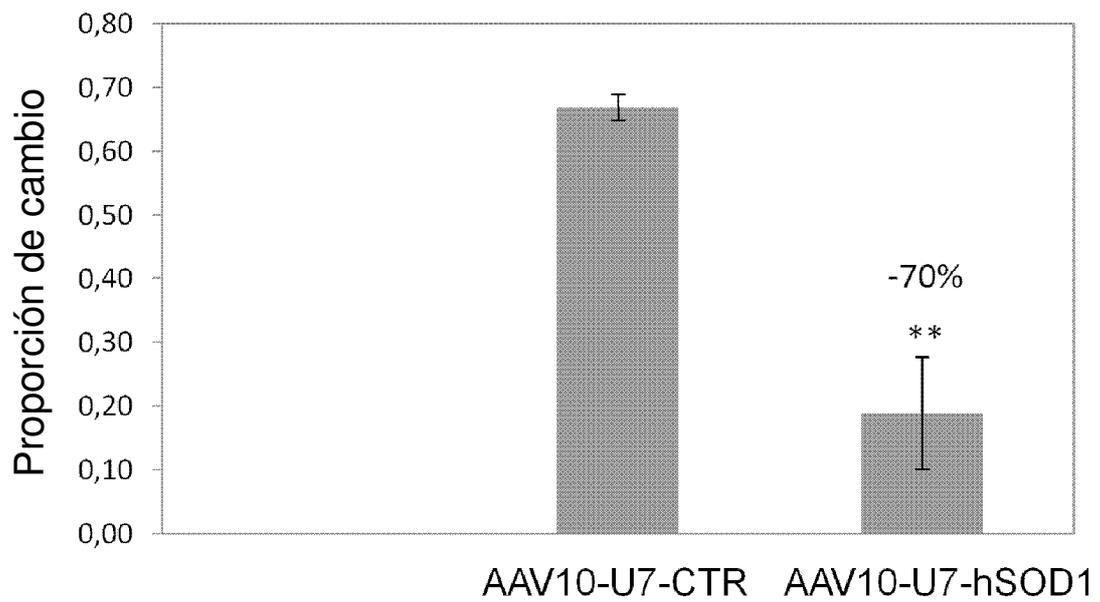


Figura 7

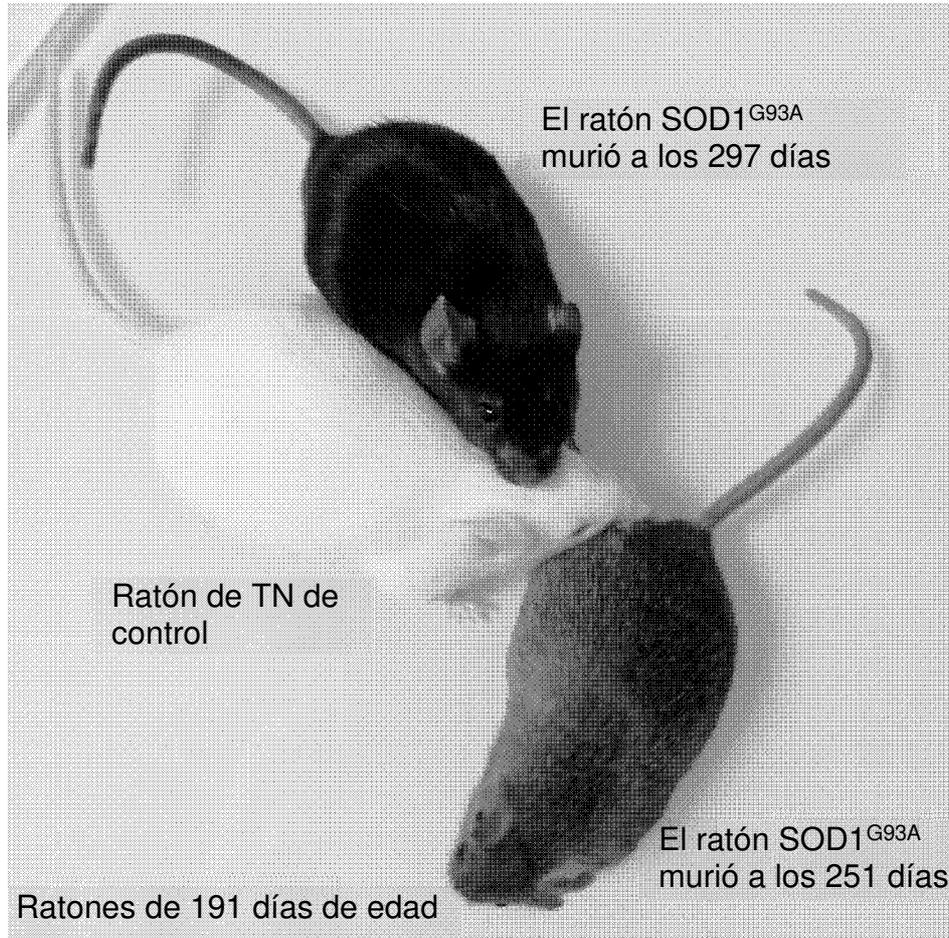


Figura 8

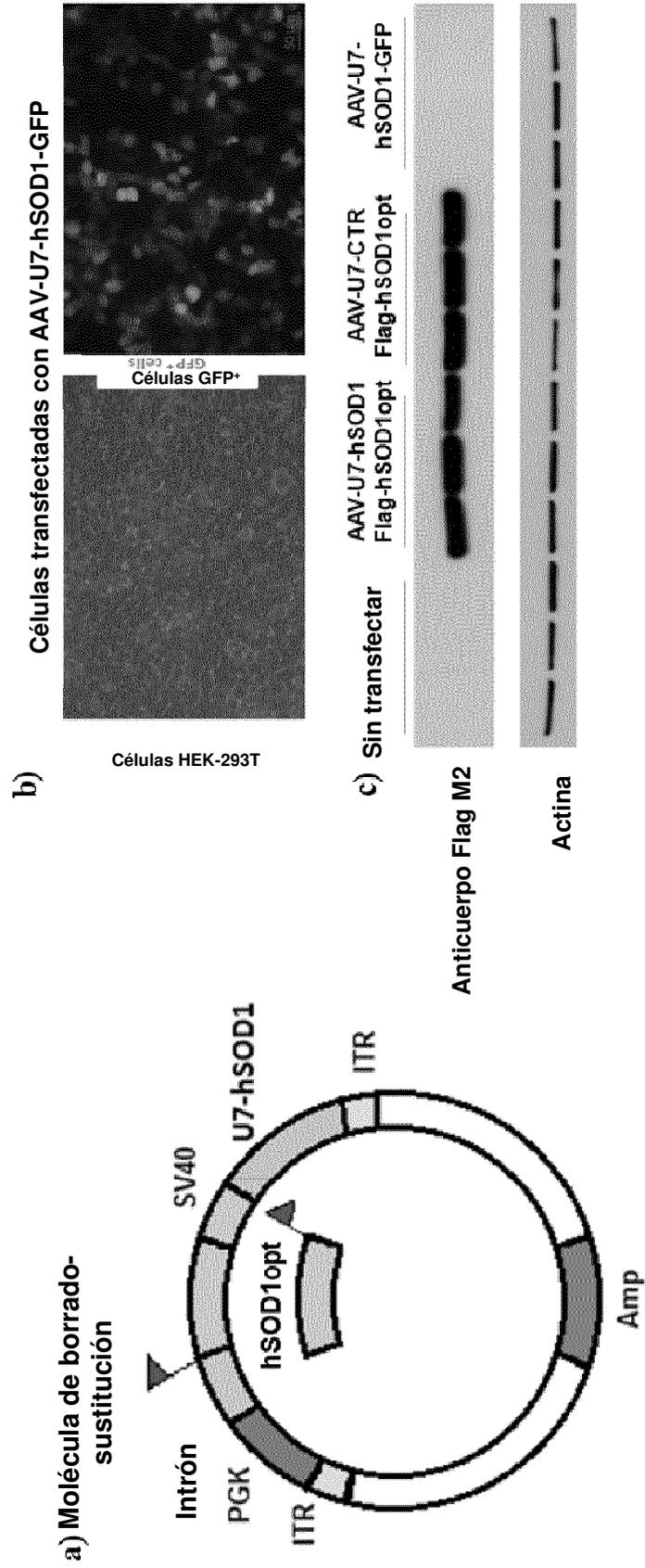


Figura 9