

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 896 181**

51 Int. Cl.:

C12N 15/864 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2016 PCT/EP2016/067549**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2017 WO17013252**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2016 E 16744704 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.09.2021 EP 3325632**

54 Título: **Vector AAV bicistrónico para la interferencia de ARN en ALS**

30 Prioridad:

22.07.2015 EP 15177828

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

24.02.2022

73 Titular/es:

**ECOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE
LAUSANNE (EPFL) (100.0%)
EPFL-TTO EPFL Innovation Park J
1015 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

**AEBISCHER, JULIANNE;
SCHNEIDER, BERNARD y
ROCHAT, CYLIA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 896 181 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

Vector AAV bicistrónico para la interferencia de ARN en ALS

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un vector de expresión bicistrónico para silenciar un gen específicamente en los astrocitos y las neuronas que comprende dos casetes de expresión que comprenden una primera y una segunda secuencia silenciadora, respectivamente, en donde la expresión de dicha primera secuencia silenciadora dentro de los astrocitos se regula por un promotor específico de astrocitos y la expresión de dicha segunda secuencia silenciadora dentro de las neuronas se regula por un promotor específico de neuronas, y en donde el primer casete comprende "promotor específico de astrocitos - elemento regulador postranscripcional - la primera secuencia silenciadora - cola de poliA" y un segundo casete comprende "promotor específico de neuronas - elemento regulador postranscripcional - la segunda secuencia silenciadora - cola de poliA". En una modalidad preferida, dichas primera y segunda secuencias silenciadoras son secuencias silenciadoras de SOD1. Se describe además una composición farmacéutica que comprende dicho vector bicistrónico y el mismo para su uso en el tratamiento de enfermedades de las motoneuronas.

20 Antecedentes

Las enfermedades de las motoneuronas son un grupo de trastornos neurológicos progresivos que destruyen las motoneuronas, las células que controlan la actividad muscular voluntaria esencial, tal como hablar, caminar, respirar y tragar. Normalmente, los mensajes de las células nerviosas del cerebro (llamadas motoneuronas superiores) se transmiten a las células nerviosas del tronco encefálico y la médula espinal (llamadas motoneuronas inferiores) y de ellos a músculos particulares. Cuando hay interrupciones en las señales entre la motoneurona más baja y el músculo, los músculos no funcionan adecuadamente; los músculos se debilitan gradualmente y pueden comenzar a atrofiarse y desarrollan movimientos incontrolados. Cuando hay interrupciones en las señales entre las motoneuronas superiores y la motoneurona inferior, los músculos de las extremidades desarrollan rigidez (llamada espasticidad), los movimientos se vuelven lentos y exigentes y los reflejos tendinosos, como los tirones de la rodilla y el tobillo, se vuelven hiperactivos. A lo largo del tiempo, puede perderse la capacidad de controlar el movimiento voluntario.

En los adultos, la enfermedad de las motoneuronas más común es la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), un trastorno neurodegenerativo mortal. Hasta ahora, el único fármaco aprobado, el riluzol, retrasa el curso de la enfermedad solo unos pocos meses.

En Europa y América del Norte, la incidencia de la ALS es de aproximadamente 2 casos por año por 100 000, mientras que la prevalencia es de aproximadamente 5 casos por 100 000 con aproximadamente 7000 casos diagnosticados anualmente en los EE. UU. La incidencia aumenta con la edad, especialmente después de los 40, para alcanzar un pico a mediados de los 70. Aunque la edad es un factor de riesgo principal, la genética también es importante, y aproximadamente 1 de cada 10 casos de ALS es familiar (FALS). Las mutaciones en el gen del superóxido dismutasa 1 (SOD1) representan el 20 % de las formas familiares de la enfermedad. Los análisis genéticos de casos esporádicos de ALS (SALS) han demostrado asociaciones significativas entre la SALS y una variedad de loci. También se han detectado mutaciones en los loci más típicamente asociadas con la FALS (SOD1 y otros) en los casos de SALS.

Existen varios modelos de ratón y de rata que expresan formas mutantes de SOD1. Los modelos de ratón transgénico que expresan el gen SOD1 humano y que presentan una mutación G93A, G37R o G85R desarrollan un fenotipo similar al observado en pacientes con ALS humanos; el ratón transgénico para SOD1 se considera la representación más exacta del proceso de la enfermedad. La SOD1 mutante ejerce múltiples efectos patogénicos a través de la adquisición de propiedades tóxicas tanto en neuronas como en células gliales. De hecho, los experimentos in vitro, en base a sistemas de cocultivo de motoneuronas-células gliales, así como también las investigaciones realizadas en ratones con SOD1 mutante, han revelado procesos de enfermedad no autónomos de la célula (Lasiene y Yamanaka, 2011). Aunque la expresión de la SOD1 mutante en las motoneuronas determina principalmente el inicio de la enfermedad, la patología de la SOD1 en tipos de células no neuronales desempeña un papel clave en la progresión de la enfermedad. En particular, la eliminación de la SOD1 mutante en los astrocitos, o el enriquecimiento de la médula espinal con los astrocitos de tipo salvaje (WT), prolonga la supervivencia de los animales con SOD1 mutante al ralentizar la progresión a la enfermedad tardía (Lepore, Rauck y otros, 2008; Yamanaka, Chun y otros, 2008; Boucherie, Schafer y otros, 2009; Wang, Gutmann y otros, 2011). Como respaldo adicional a la adquisición de actividades tóxicas por la SOD1 mutada, los ratones nulos de SOD1 no muestran signos de degeneración de las motoneuronas (Reaume, Elliott y otros, 1996; Ho, Gargano y otros, 1998).

Los virus adenoasociados (AAV) son vectores prometedores para el suministro de genes in vivo. Varios serotipos y subtipos de origen natural se han aislado a partir de tejidos de primates humanos y no humanos; algunos de ellos son de interés, dada su capacidad para transducir varios órganos, que incluyen el sistema nervioso central, con alta eficiencia. Recientemente, se logró un avance terapéutico importante mediante el uso de una única inyección intravenosa del AAV del serotipo 9 (AAV9) que codifica un ARN en horquilla pequeño (ARNhp) contra la SOD1 humana (Foust, Salazar y otros, 2013 y el documento WO2015/031392). Cuando se administra al nacimiento, el AAV9 infecta

aproximadamente el 60 % de las motoneuronas y el 30 % de los astrocitos, lo que, en el caso del ARNhp dirigido al ARNm de SOD1, se traduce en un retraso del inicio de la enfermedad, mejoras en el rendimiento motor y una extensión de aproximadamente el 40 % en la supervivencia de los ratones tratados. Cuando se inyecta en ratones adultos, el AAV9 en combinación con el promotor cba conduce a un patrón de expresión del transgén que es mayor en los astrocitos (aproximadamente el 50 %) que en las motoneuronas (8 %). Sin embargo, es posible que la expresión del ARNhp, que está en el mismo vector pero bajo el control del promotor H1 pol-III, tenga un patrón diferente en estos animales. Curiosamente, el ARNhp-AAV9 sigue siendo terapéutico cuando se suministra después del inicio de la enfermedad y prolonga la supervivencia de los ratones SOD1, aunque en menor medida que los tratamientos tempranos.

Un segundo estudio utilizó AAV rhesus-10 recombinante (rAAVrh10) para suministrar el microARN (miARN) artificial diseñado para suprimir la expresión de SOD1 (miR SOD1). La transcripción del miR SOD1 estaba bajo el control del promotor cba constitutivamente activo. Tras la administración intratecal a ratones adultos con ALS, este vector condujo a un predominio de la expresión del transgén en los astrocitos, lo que ralentizó la progresión de la enfermedad (Wang, Yang y otros, 2014).

En el estudio de Dirren, Aebischer y otros, 2015 se usaron dos vectores separados para dirigirlos a los astrocitos o a las motoneuronas. Los dos sistemas de vectores se diseñaron para suprimir la expresión de SOD1 predominantemente en motoneuronas espinales mediante el uso de la cápside del AAV6 en combinación con el promotor cmv constitutivamente activo, o en astrocitos, mediante el uso del AAV9 con el promotor gfaABC₁D específico de astrocitos. En ratones adultos, se ha usado el serotipo AAV9 con el casete dirigido por el promotor cmv, ya que el AAV9 parece ser más eficiente que el AAV6 para dirigirlo a las motoneuronas.

Después de la administración del vector a ratones con ALS tanto recién nacidos como adultos, se obtuvo la protección más completa de las unidades motoras cuando se dirigió a la SOD1 humana principalmente en las motoneuronas. Sorprendentemente, la supresión de la SOD1 en los astrocitos también mostró efectos neuroprotectores, que fueron claramente diferentes de los que se observaron con el vector dirigido a las motoneuronas. Aunque solo se ha observado una protección parcial de las motoneuronas espinales al suprimir la SOD1 en los astrocitos, la innervación muscular se conservó casi por completo, lo que indica un posible efecto sobre la capacidad de las motoneuronas restantes para reinervar el músculo. De hecho, la recuperación de la función neuromuscular fue similar a la condición en la que SOD1 se silenció en las motoneuronas. Con cada uno de estos vectores, la terapia génica prolongó significativamente la supervivencia de los ratones con ALS cuando se administró a ratones recién nacidos. Por lo tanto, aunque el silenciamiento de SOD1 en las motoneuronas es más efectivo para proteger estas células en el modelo de ratón con ALS, se requiere dirigir el vector hacia SOD1 en los astrocitos para restaurar la función neuromuscular. Sin embargo, un gran inconveniente del enfoque probado debe encontrarse en el uso de dos vectores para dirigirlos hacia dos tipos celulares diferentes. La inyección combinada de dos vectores virales supone varios problemas, entre estos:

- i) la carga viral, es decir, obtener la carga viral óptima para dos vectores para obtener eficacia terapéutica, alcanza el límite de la propiedad física, en cuanto a la dosis máxima tolerada por el organismo;
- ii) las restricciones de volumen con relación a los métodos de inyección y suministro.

Los problemas indicados anteriormente no pueden superarse simplemente con inyecciones independientes, múltiples, dado que se conoce que múltiples inyecciones aumentan el riesgo de una reacción del sistema inmunológico.

Existe una fuerte necesidad de un enfoque adecuado para un escenario clínico y capaz de dirigir la SOD1 mutante tanto a las motoneuronas como a los astrocitos para lograr la eficacia terapéutica en las enfermedades de las motoneuronas.

Resumen de la invención

La invención se expone en las reivindicaciones que se adjuntan. La presente invención se refiere a un vector de expresión bicistrónico para silenciar un gen en astrocitos y neuronas que comprende dos casetes de expresión, en donde un primer casete comprende "promotor específico de astrocitos - elemento regulador postranscripcional - la primera secuencia silenciadora - cola de poliA" y un segundo casete comprende "promotor específico de neuronas - elemento regulador postranscripcional - segunda secuencia silenciadora - cola de poliA". En una modalidad preferida, dichas primera y segunda secuencias silenciadoras son secuencias silenciadoras de SOD1. Se describe además una composición farmacéutica que comprende dicho vector bicistrónico y el mismo para su uso en el tratamiento de enfermedades de las motoneuronas.

Descripción de las figuras

Figura 1: Diagrama de dibujo de los vectores usados en la presente invención. A), B), C) ejemplos comparativos. D) una modalidad del vector bicistrónico de la presente invención.

Figura 2: Secuencia silenciadora de SOD1 (miR SOD1), tallos-lazos de miARN, con la hebra guía mostrada en gris.

Figura 3: Potencial de acción muscular compuesto medido en los músculos del tríceps sural durante el tiempo posterior a la infección de los ratones. Estudio de la eficiencia terapéutica, mediante la comparación del vector bicistrónico de la presente invención con un vector específico de astrocitos (promotor de la GFAP, panel A) y vectores específicos de neuronas (promotores cmv y hsyn1, panel B).

Figura 4: El rendimiento de nado de los ratones se evalúa a lo largo del tiempo después de la inyección intratecal de los diferentes vectores. Estudio de la capacidad motora, mediante la comparación de la eficiencia terapéutica del vector bicistrónico de la presente invención con un vector específico de astrocitos (promotor de la GFAP, panel A) y vectores específicos de neuronas (promotores cmv y hsyn1, panel B).

Figura 5: Recuento de motoneuronas por sección de médula espinal lumbar. Las cantidades de motoneuronas aumentan significativamente para el grupo bicistrónico (columna blanca) en comparación con los animales transgénicos de control.

Figura 6: Integridad de la unión neuromuscular expresada como porcentaje de placas motoras terminales positivas para bungarotoxina que están ocupadas por una terminal de motoneurona positiva para SV2. La innervación se conserva completamente en el grupo bicistrónico (columna blanca), que es significativamente diferente de la conservación parcial en los otros grupos tratados.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un vector de expresión bicistrónico, que permite la expresión continua de una primera y una segunda secuencia silenciadora específicamente en las motoneuronas y en los astrocitos.

El vector de expresión bicistrónico para silenciar un gen en los astrocitos y en las neuronas de la presente invención comprende dos casetes de expresión, en donde un primer casete comprende "promotor específico de astrocitos - elemento regulador postranscripcional - la primera secuencia silenciadora - cola de poliA" y un segundo casete que comprende "promotor específico de neuronas - elemento regulador postranscripcional - la segunda secuencia silenciadora - cola de poliA".

En una modalidad preferida, dichas primera y segunda secuencias silenciadoras son secuencias silenciadoras de SOD1.

En una modalidad preferida adicional, dicho vector es un vector AAV y las secuencias reguladoras se seleccionan de manera que el tamaño total del vector sea inferior a 5 kb, lo que es compatible con el empaquetamiento dentro de la cápside del AAV. Dicho vector AAV es de cualquier serotipo compatible con el suministro general de transgenes a astrocitos y motoneuronas; preferentemente, dicho vector AAV es del serotipo 9 o del serotipo 6.

En una modalidad preferida, el promotor específico de astrocitos se selecciona del grupo que comprende el promotor de la GFAP, el promotor de la glutamina sintetasa, preferentemente es el promotor mínimo de la GFAP gfaABC₁D; el promotor específico de neuronas se selecciona del grupo que comprende sinapsina, cmv, cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-β), la proteína 2 de unión a metil-CpG (MeCP2), preferentemente es el promotor de la sinapsina I humana hSyn1.

Los promotores de mamíferos que se indicaron anteriormente son compatibles con la expresión del transgén a largo plazo y se conoce que restringen la expresión del gen controlado a subconjuntos de células de interés en el SNC.

Dicha secuencia silenciadora de SOD1 se selecciona del grupo que comprende secuencias de ARN que se pueden transcribir a partir de ADN natural o artificial para interferir con la expresión de SOD1, incluidas ARN en horquilla pequeño (ARNhp) contra SOD1, micro ARN (miARN) contra SOD1, secuencias de ARN antisentido contra SOD1, o secuencias de ARN guía para dirigir las al gen de SOD1 mediante CRISPR/Cas9. En una modalidad preferida, el silenciador de SOD1 es un miARN dirigido al ARNm de SOD1, preferentemente dirigido a los nt 209-229 (SEQ ID No. 1) (miR SOD1) de la secuencia codificadora de la SOD1 humana con el número de acceso al Genbank NM_000454.4. Para el propósito de la presente invención, miR SOD1 se refiere a un miARN dirigido a SOD1, donde dicha secuencia dirigida a SOD1 se refiere a los nt 209-229 de la secuencia codificante de la SOD1 humana (SEQ ID No. 1). En una modalidad preferida adicional, dicha secuencia de miARN comprende una secuencia "semilla" de 6 o 7 nucleótidos de longitud que es completamente homóloga al transcrito de ARNm de la SOD1 humana con el número de acceso al Genbank NM_000454.4.

En una modalidad preferida adicional, la secuencia madura de miARN tiene al menos 50 %, 60 %, 80 %, aún con mayor preferencia 90 % de homología de secuencia, en donde para el alcance de la presente invención, la homología de secuencia se refiere a la identidad de secuencia, con el conjunto de secuencia codificadora correspondiente establecida en SEQ ID No. 1: 5'-ATT ACT TTC CTT CTG CTC GAA-3' (SEQ ID. No. 1). Con mayor preferencia, dicha secuencia madura de miARN corresponde a la secuencia codificadora: 5'-ATT ACT TTC CTT CTG CTC GAA-3' (SEQ ID No. 1).

En una modalidad preferida, dicho miARN maduro es transportado por la cadena principal del pre-miARN del miR-155 murino. La secuencia de ADN correspondiente se sintetizó y subclonó en un plásmido lanzadera pAAV de acuerdo con los procedimientos estándar.

5 La inclusión de un elemento regulador postranscripcional en el casete de expresión, dicho elemento regulador es, a modo de ejemplo, un intrón o un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la Marmota (WPRE), resulta en un aumento significativo de la expresión de la secuencia silenciadora de SOD1 codificada por dicho vector. Dicho intrón se selecciona preferentemente del grupo que comprende el MVM (virus diminuto de ratones), intrón 1
10 truncado del F.IX (factor IX humano), donante de corte y empalme de la β -globina SD/aceptor de corte y empalme de la cadena pesada de inmunoglobulina SA, adenovirus SD/inmunoglobulina SA. Sin embargo, pueden usarse otros intrones naturales o artificiales conocidos por el experto en la técnica. Alternativamente, puede usarse un elemento potenciador postranscripcional como el WPRE. En comparación con otros sistemas de silenciamiento de SOD1 usados hasta ahora en el campo de la ALS, este vector de expresión bicistrónico compila sorprendentemente las siguientes ventajas que son relevantes para la aplicación terapéutica:

- 15
- el uso de promotores específicos de tipo celular ayuda a limitar la expresión de la secuencia silenciadora de SOD1 a neuronas y astrocitos. Esto minimiza las posibilidades de efectos perjudiciales debido al silenciamiento inespecífico de SOD1 o la activación de las rutas de miARN en otros tipos celulares no relevantes terapéuticamente. Esto es particularmente cierto dado que SOD1 es una enzima ubicua. En la ALS familiar solo un alelo está mutado. No está claro si la actividad de SOD1 producida por el alelo normal es fundamental para la función y supervivencia de ciertos tipos de células. Por lo tanto, se prefiere limitar el silenciamiento de SOD1 a las células enfermas, tales como las motoneuronas y los astrocitos, para limitar el riesgo de efectos secundarios no deseados
 - 20
 - 25 - La incorporación exitosa de dos casetes de expresión en un solo vector que se obtuvo aquí, permite expresar la secuencia silenciadora de SOD1 simultáneamente y específicamente en las motoneuronas y en los astrocitos luego de una sola inyección de un vector viral que tiene un tropismo para los dos tipos celulares, de manera que se evitan las limitaciones del uso de cócteles de vectores. Estas limitaciones incluyen la disminución de la eficiencia de la transducción debido a la menor dosis inyectable de cada vector individual, así como también la necesidad de desarrollar dos productos terapéuticos separados para combinarlos finalmente. También en términos reguladores, esta solución trae una ventaja considerable: en el caso de que se usen dos vectores separados, se requieren dos procedimientos para obtener la aprobación reguladora para ambos. En este caso, debe asumirse la carga de un solo procedimiento.
 - 30

35 En comparación con los vectores con casetes de expresión únicos, el vector de expresión bicistrónico que se describe en la presente descripción, mejora drásticamente los beneficios terapéuticos obtenidos por la terapia génica que tiene como objetivo silenciar la SOD1 en pacientes con ALS.

40 El vector de expresión bicistrónico que se describe en la presente descripción permite su direccionamiento a dos tipos celulares diferentes mediante la administración de un solo vector, donde la inyección combinada de dos vectores virales no solo sería un problema con respecto a la dosis máxima de vector tolerada por el organismo, sino que también aumentaría significativamente los obstáculos reguladores hacia su aplicación clínica.

45 Además, como resultará evidente a partir de los ejemplos siguientes, se obtiene una maximización de la eficacia terapéutica. Dado que las motoneuronas y los astrocitos desempeñan funciones distintivas en la patología y el silenciamiento de SOD1 en cada uno de estos tipos celulares tiene efectos complementarios, el direccionamiento tanto a las motoneuronas como a los astrocitos es un factor crítico.

50 También se describe un vector de expresión bicistrónico de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento de la ALS, en donde dichas primera y segunda secuencias silenciadoras son ambas secuencias silenciadoras de SOD1.

55 Se describe además una composición farmacéutica, que comprende un vector AAV bicistrónico que comprende dos casetes de expresión que comprenden cada uno una primera y una segunda secuencia silenciadora, en donde la expresión de dicha primera secuencia silenciadora dentro de los astrocitos se regula por un promotor específico de astrocitos y la expresión de dicha segunda secuencia silenciadora dentro de las neuronas se regula por un promotor específico de neuronas y un portador farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de la enfermedad de las motoneuronas, preferentemente de la ALS. En una modalidad preferida, en dicha composición farmacéutica dichas primera y segunda secuencias silenciadoras son secuencias silenciadoras de SOD1. También se describe el vector descrito para su uso en un método de tratamiento en un sujeto que necesita del mismo, que comprende la
60 administración de dicho vector en un intervalo comprendido entre $1E12$ - $5E14$ Genomas de Vector GV/kg de peso corporal.

65 Dicha administración, en una modalidad preferida, es a través del líquido cefalorraquídeo. Con mayor preferencia, es intratecal (IT), intracisternal (IC) o intraventricular (ICV). En una modalidad preferida adicional, dicha administración es

intravenosa (IV). Los viriones recombinantes se introducen preferentemente en el sujeto en combinación con una terapia farmacológica complementaria.

Ejemplo 1:

Los ratones con ALS SOD1^{G93A}, portadores de un transgén que es la SOD1 humana mutante que contiene la sustitución Gly⁹³-> Ala (G93A), se usan en el escenario experimental. Los ratones con ALS SOD1^{G93A} se usan ampliamente como modelo de ALS y sus extremidades se paralizan progresivamente a partir de los seis a siete meses de edad aproximadamente. La esperanza de vida es normalmente de cuatro a seis semanas después de la aparición de los síntomas. Los ratones con ALS SOD1^{G93A} tienen un curso de desnervación altamente predecible que tiene lugar en dos episodios sucesivos. Hay una poda inicial de las motoneuronas de contracción rápida fatigables (FF), lo que resulta en la desnervación de las fibras musculares del tipo IIb. Después, las uniones neuromusculares vacías (NMJ) se reinervan parcialmente por la brotación de motoneuronas de contracción rápida resistentes a la fatiga (FR) y de contracción lenta resistentes a la fatiga (S) hasta que las motoneuronas FR también comienzan a podar sus ramas nerviosas intramusculares, lo que lleva a una pérdida sostenida de las NMJ (Pun, Santos y otros, 2006; Kanning, Kaplan y otros, 2010).

Los ratones con ALS SOD1^{G93A} se inyectaron intratecalmente a la edad de 4,5 semanas con 2,1E+12 GV de cualquiera de los siguientes vectores virales AAV9:

A) AAV9-cmv-RFP-miR SOD1 (control, para silenciar SOD1 en las motoneuronas)

B) AAV9-hsyn1-RFP-miR SOD1 (control, para silenciar SOD1 en las motoneuronas)

C) AAV9-gfaABC₁D-GFP-miR SOD1 (control, para silenciar SOD1 en los astrocitos)

D) AAV9-miR SOD1 bicistrónico (vector de acuerdo con la presente invención, para silenciar SOD1 en motoneuronas y astrocitos).

En la Figura 1 se muestra una representación esquemática de los vectores indicados anteriormente. En este escenario experimental, la secuencia silenciadora de SOD1 se construyó en base a las secuencias que flanquean el miARN-155 murino. Su hebra guía se dirige a los nt 209-229 de la secuencia codificadora de la SOD1 humana (Figura 2). El miR SOD1 es un miARN construido en base a las secuencias que flanquean y al lazo de la secuencia del miARN-155 murino (representada en negro en la Figura 2). Se ha diseñado para el silenciamiento específico de SOD1 humana. La secuencia dirigida a SOD1 (fuente en negrita) se compone de una hebra guía (en gris) que se une al ARNm de SOD1 y contiene una secuencia semilla de 7 nucleótidos de longitud (en cursiva y subrayada) y la hebra pasajera parcialmente complementaria. Dicha hebra guía da lugar a una secuencia madura de miR SOD1, que corresponde a la secuencia codificadora SEQ ID No. 1.

Para evaluar la eficiencia terapéutica de estos vectores virales, los cuatro grupos de ratones (7 animales por grupo excepto el grupo del vector bicistrónico, que tenía 8 animales) se compararon con los de tipo salvaje inyectados con PBS y con los animales de control con ALS SOD1^{G93A} (16 y 19 animales por grupo, respectivamente). En cada grupo, las hembras y los machos se distribuyeron equitativamente. Las crías de la camada se dividieron entre los grupos.

La electromiografía (EMG) se realizó semanalmente en los músculos del tríceps sural para evaluar la función neuromuscular. La EMG consiste en estimular eléctricamente las motoneuronas de la médula espinal y registrar la respuesta muscular, que se denomina potencial de acción muscular compuesto (CMAP). La EMG es una de las pruebas más confiables para predecir la aparición y progresión de la enfermedad clínica en ratones con ALS (Mancuso, Osta y otros, 2014) y pacientes con ALS (Simon, Lomen-Hoerth y otros, 2014).

Los resultados se muestran en el gráfico de la Figura 3.

En los ratones SOD1^{G93A} inyectados con PBS, la amplitud del CMAP disminuyó entre los días 50 y 60 después del nacimiento, y luego la amplitud se estabilizó en aproximadamente el 40 % del valor inicial. A las 12 semanas de edad, las mediciones del CMAP de los ratones de control SOD1^{G93A} (33,4±10,2 mV) no difirieron estadísticamente de los ratones inyectados con los vectores AAV9 que silencian SOD1 en motoneuronas o astrocitos. Sin embargo, hubo una tendencia hacia una mejor respuesta muscular en los animales tratados (AAV9-cmv-RFP-miR SOD1, 46,8±16,2 mV; AAV9-hsyn-RFP-miR SOD1, 44,7±13,4 mV; gfaABC₁D-GFP-miR SOD1, 50,8±14,3 mV).

Sorprendentemente, ya se observó una diferencia significativa a las 8 semanas entre el grupo AAV9-bicistrónico y los ratones de control con ALS (p<0,05). A las 12 semanas de edad, la diferencia entre los dos grupos se pronunció aún más (p<0,001). De hecho, en este momento, los valores del CMAP de los animales inyectados con el vector de expresión bicistrónico (75,6±13,4 mV) no difirieron estadísticamente de los valores obtenidos para los ratones de control de tipo salvaje (84,8±18,3 mV).

Al evaluar adicionalmente el CMAP a las 20 semanas de edad, donde los síntomas son evidentes en el modelo animal usado, los valores obtenidos en los animales inyectados con el vector de expresión bicistrónico se mantienen inalterados con respecto al valor obtenido a las 12 semanas de edad ($76,5 \pm 7,2$ mV), mientras que los valores disminuyeron aún más en los ratones SOD1 inyectados con PBS ($17,5 \pm 1,4$ mV), lo que es consistente con la segunda ola de desnervación que se observa típicamente en los ratones SOD1^{G93A} a esta edad (Figura 3). En general, se observó una diferencia significativa entre el grupo inyectado con el vector bicistrónico y el grupo inyectado con el vector que contiene el promotor de la GFAP específico de astrocitos ($p < 0,001$). También se observó una diferencia significativa entre el grupo de vector bicistrónico y los grupos inyectados con los vectores que contienen los promotores para la expresión preferencial en neuronas (para *cmv* y *hsyn1*, $p < 0,001$) (Figura 3, panel B). Este sorprendente resultado confirma la validez del enfoque que aquí se propone.

Esto se confirma adicionalmente al evaluar el rendimiento motor de los ratones, mediante la medición del tiempo que tardan los animales en nadar hasta una plataforma a 1 m de distancia. Los resultados se representan en la Figura 4. En general, se observó una diferencia significativa en el rendimiento de nado entre el grupo inyectado con el vector bicistrónico y el grupo inyectado con el vector que contiene el promotor de la GFAP específico de astrocitos ($p < 0,05$). También se observó una diferencia significativa entre el grupo del vector bicistrónico y el grupo inyectado con los vectores que contienen los promotores para la expresión preferencial en neuronas (para *cmv* $p < 0,01$ y para *hsyn1* $p < 0,05$), mientras que casi no se observó diferencia significativa entre el rendimiento motor del grupo bicistrónico y del grupo de animales de control de tipo salvaje. Estos resultados demuestran claramente el potencial terapéutico superior del vector de expresión bicistrónico que se describe en la presente descripción en comparación con los vectores de expresión que tienen un casete de expresión único que expresa el miR SOD1 en las motoneuronas o en los astrocitos solamente.

Las Figuras 5 y 6 confirman a nivel histológico que el silenciamiento de SOD1 tanto en las neuronas como en los astrocitos mediante el uso del vector bicistrónico tiene un resultado terapéutico superior que el silenciamiento de SOD1 en solo uno de los dos tipos celulares. Se obtuvieron secciones de la médula espinal de los animales tratados en la etapa final. Se contaron las motoneuronas positivas para la acetiltransferasa de colina (ChAT) en la región lumbar de la médula espinal. De hecho, al nivel de supervivencia de las motoneuronas (Figura 5), el vector bicistrónico muestra un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia de las motoneuronas en comparación con los vectores que expresan miR SOD1 bajo el control solo del promotor de la GFAP o del promotor *hsyn*. Luego se evaluó la integridad de la unión neuromuscular (NMJ) (Figura 6). La ocupación de la NMJ se evaluó en secciones de músculo de 20 μ m teñidas con un anti-SV-2 (Banco de Hibridomas para Estudios del Desarrollo, Universidad de Iowa, Ciudad de Iowa, IA) o un anticuerpo VAcHT y tetrametilrodamina α -bungarotoxina (Invitrogen). Aproximadamente 100 placas motoras terminales positivas para bungarotoxina se identificaron y se verificaron para detectar el solapamiento de terminales de motoneuronas positivas para SV-2 o VAcHT mediante el uso de un microscopio Olympus AX70 o un microscopio Leica DM5500. El vector bicistrónico (columna blanca) muestra un mayor porcentaje de placas motoras terminales positivas para bungarotoxina que están ocupadas por una terminal de motoneurona positiva para SV2 en comparación con los vectores que expresan miR SOD1 bajo el control solo del promotor de la GFAP o del promotor *hsyn*.

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión bicistrónico para silenciar un gen en los astrocitos y en las neuronas que comprende dos casetes de expresión, en donde un primer casete comprende "promotor específico de astrocitos - elemento regulador postranscripcional - la primera secuencia silenciadora - cola de poliA" y un segundo casete que comprende "promotor específico de neuronas - elemento regulador postranscripcional - la segunda secuencia silenciadora - cola de poliA".
2. El vector bicistrónico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichas primera y segunda secuencias silenciadoras son ambas secuencias silenciadoras de SOD1.
3. El vector bicistrónico de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dichas secuencias silenciadoras de SOD1 se seleccionan independientemente del grupo que comprende secuencias de ARN que pueden transcribirse a partir del ADN para interferir con la expresión de SOD1, incluido un ARN en horquilla pequeño (ARNhp) contra SOD1, un micro ARN (miARN) contra SOD1, secuencias de ARN antisentido contra SOD1 y secuencias de ARN guía para dirigir las al gen de SOD1 mediante CRISPR/Cas9.
4. El vector bicistrónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dichas primera y segunda secuencias silenciadoras son ambas un miARN diseñado para suprimir la expresión de SOD1 (miR SOD1).
5. El vector bicistrónico de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho miR SOD1 se dirige a la secuencia codificadora de la SOD1 humana de acceso al Genbank NM 000454.4, nt 209-229 (miR SOD1).
6. El vector bicistrónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4, 5, en donde dicha secuencia de miARN comprende una secuencia "semilla" de 6 o 7 nucleótidos de longitud que es completamente homóloga al transcrito de ARNm de la SOD1 humana de acceso al Genbank NM_000454.4.
7. El vector bicistrónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en donde dicha secuencia madura de miR SOD1 tiene al menos 50 %, 60 %, 80 %, aún con mayor preferencia 90 % de identidad de secuencia con la secuencia codificadora correspondiente establecida en SEQ ID No 1: 5'-ATT ACT TTC CTT CTG CTC GAA-3' (SEQ ID. No 1).
8. El vector bicistrónico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha secuencia madura de miR SOD1 corresponde a la secuencia codificadora: 5'-ATT ACT TTC CTT CTG CTC GAA-3' (SEQ ID. No. 1).
9. El vector bicistrónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho promotor específico de astrocitos se selecciona del grupo que comprende el promotor de la GFAP, el promotor de la glutamina sintetasa, preferentemente es el promotor mínimo de la GFAP gfaABC.1D.
10. El vector bicistrónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho promotor específico de neuronas se selecciona del grupo que comprende sinapsina, cmv, cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-β), la proteína 2 de unión a metil-CpG (MeCP2), preferentemente es el promotor de sinapsina I humana hSyn1.
11. El vector bicistrónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde dicho vector es un vector viral adenoasociado (AAV).
12. El vector bicistrónico de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicho vector AAV es de un serotipo compatible con el suministro general de transgenes a los astrocitos y motoneuronas, preferentemente del serotipo 9 o del serotipo 6.
13. Un vector de expresión bicistrónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-12 para su uso en el tratamiento de la ALS, en donde dicha primera y segunda secuencias silenciadoras son ambas secuencias silenciadoras de SOD1.
14. Una composición farmacéutica que comprende un vector AAV bicistrónico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 12 que comprende dos casetes de expresión que comprenden una primera y una segunda secuencia silenciadora, en donde la expresión de dicha primera secuencia silenciadora dentro de los astrocitos se regula por un promotor específico de astrocitos y la expresión de dicha segunda secuencia silenciadora dentro de las neuronas se regula por un promotor específico de neuronas y un portador farmacéuticamente aceptable.
15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14 para su uso en el tratamiento de la ALS, en donde dicha primera y segunda secuencias silenciadoras son ambas secuencias silenciadoras de SOD1.

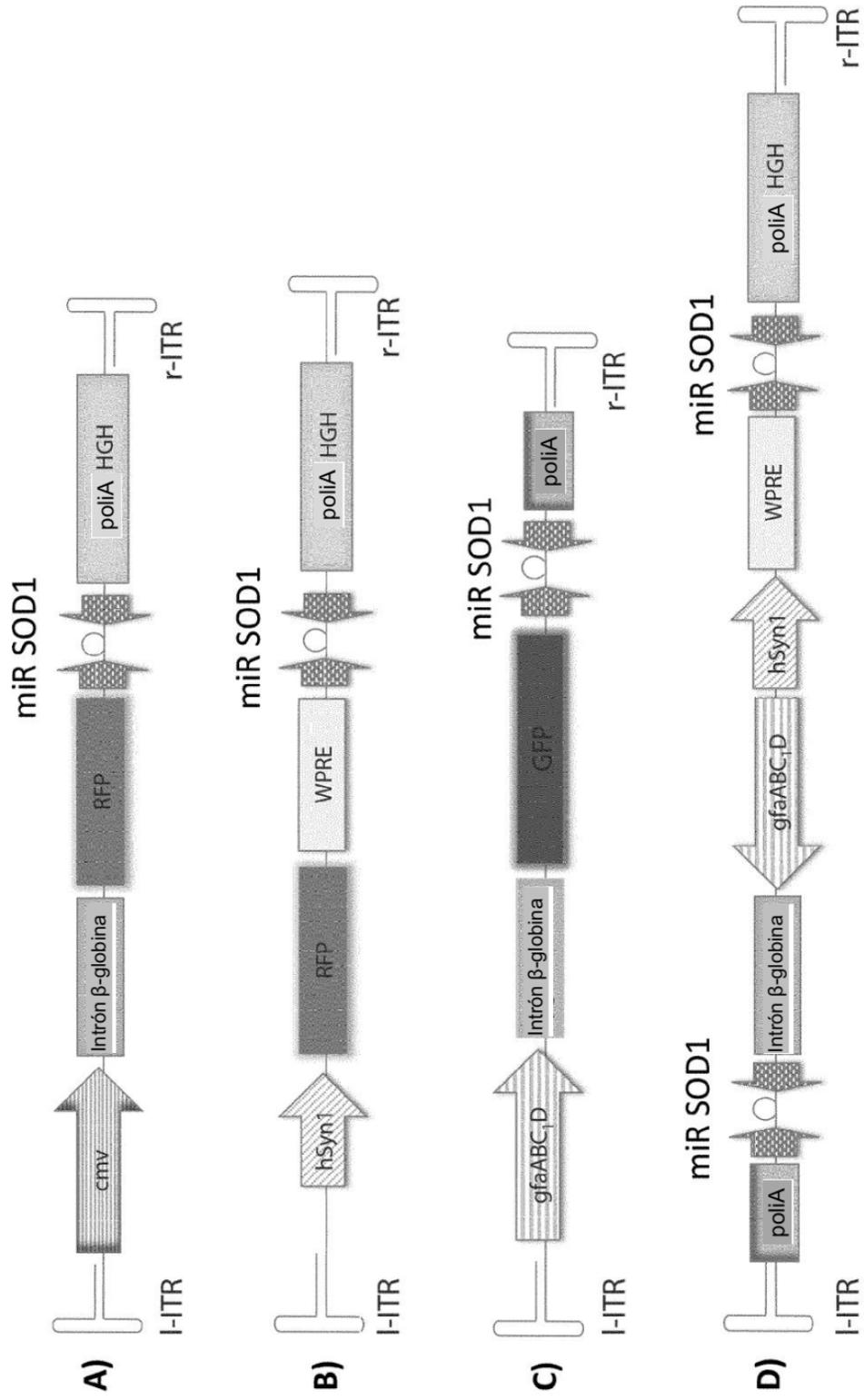


Figura 1

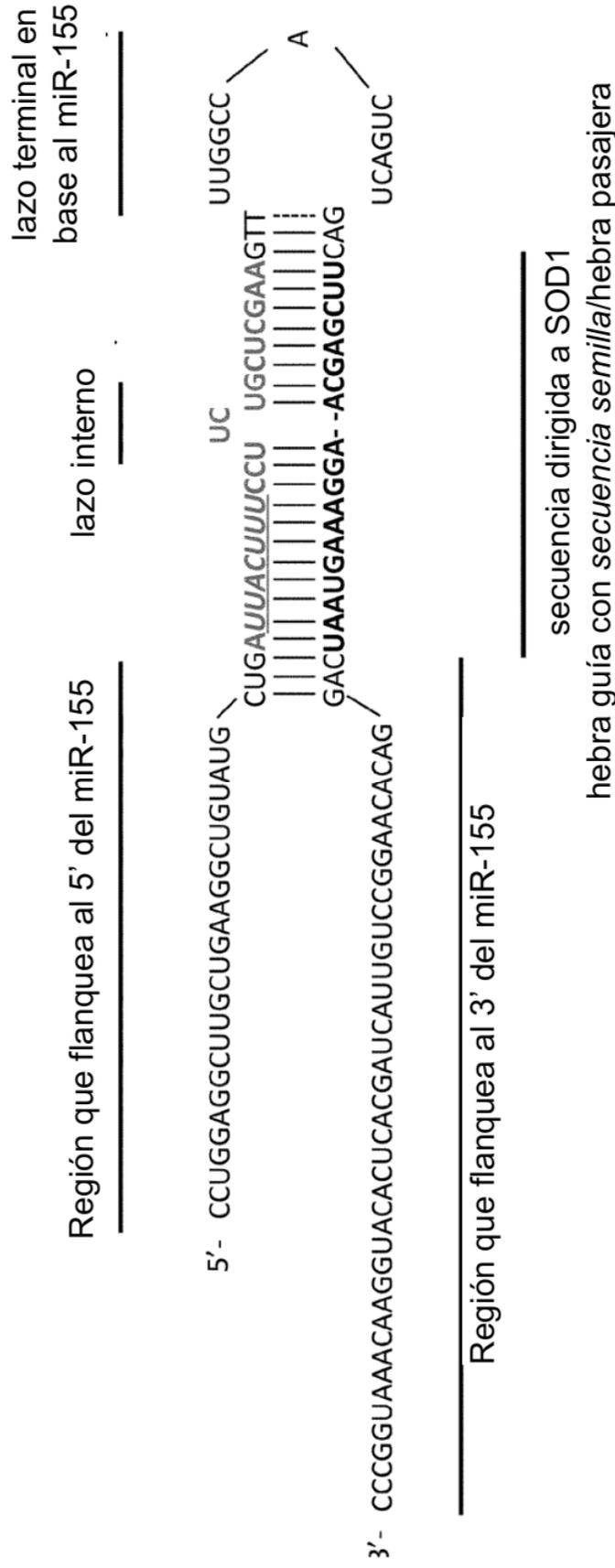


Figura 2

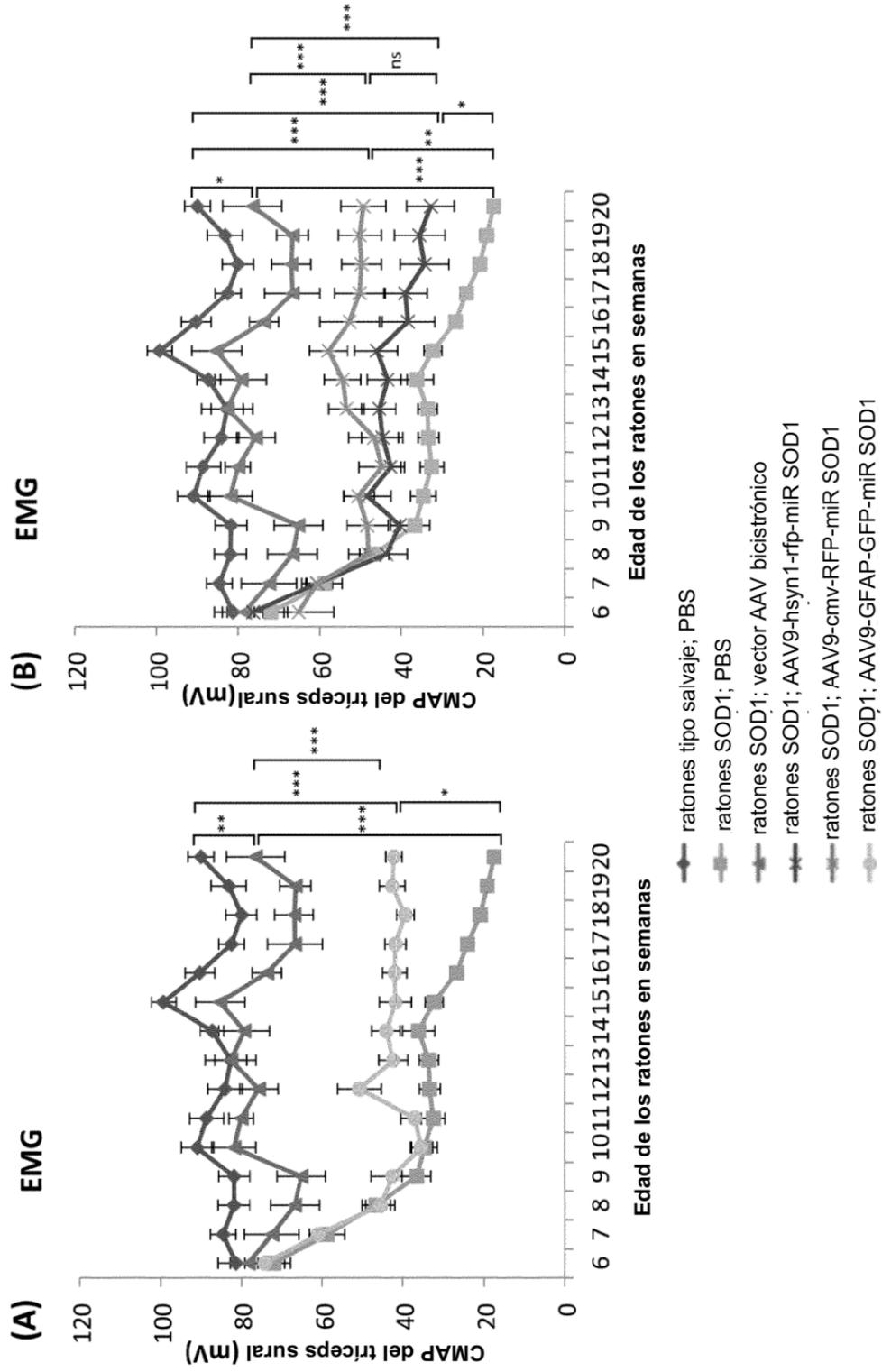


Figura 3

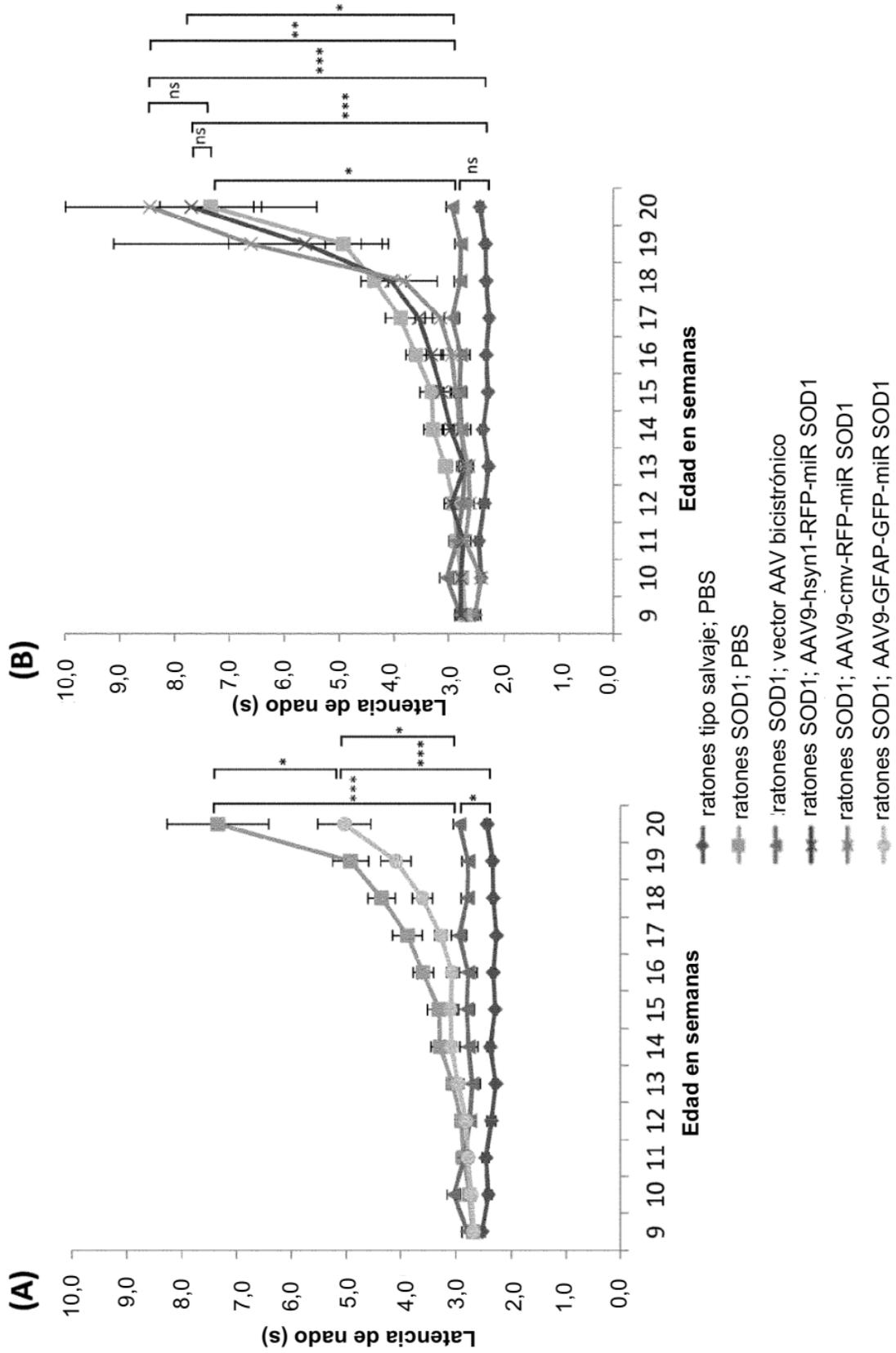


Figura 4

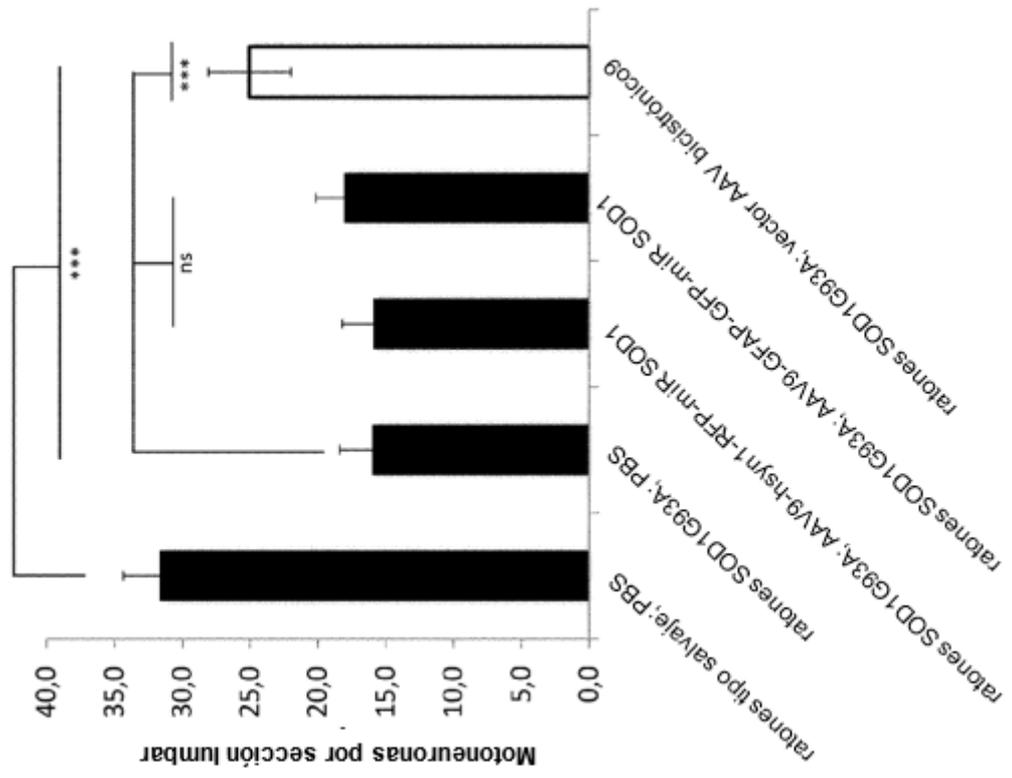


Figura 5

