

ARNi VARIANTE

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica Prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Núm. 62/114.578, presentada el 10 de Febrero de 2015, cuyo contenido es incorporado a la presente como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

PRESENTACIÓN DE LA LISTA DE SECUENCIAS EN ARCHIVO DE TEXTO

ASCII

El contenido de la siguiente presentación en archivo de texto ASCII se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad: una forma legible por ordenador (CRF) de la Lista de Secuencias (nombre de archivo: 159792010140SEQLIST.txt, fecha registrada: 4 de Febrero de 2016, tamaño: 11 KB).

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a moléculas de ARNi variante. En algunos aspectos, la invención se refiere a ARNi variante para tratar la enfermedad de Huntington.

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCION

Se ha demostrado que el ARN de interferencia (ARNi) es una herramienta útil para el silenciamiento génico en una investigación básica de la función génica y es muy prometedor como agente terapéutico para suprimir genes asociados con el desarrollo de diversas enfermedades. En la naturaleza, la regulación génica por ARNi se produce a través de ARN pequeños conocidos como microARN (miARN) (Ambros, (2004) *Nature* 431:350-355; Krol *et al.*, (2010) *Nat. Rev. Genet.* 11:597-610). Los microARN han surgido como poderosos reguladores de diversos procesos celulares, y cuando son liberados por vectores virales, se expresan continuamente miARN artificiales, dando como resultado una supresión fuerte y sostenida de los genes diana. La elucidación de los mecanismos implicados en el procesamiento del miARN ha permitido a los científicos combinar la maquinaria del ARNi celular endógeno y dirigir la degradación de un producto génico diana con el uso de miARN artificiales (véanse, p. ej., US PG Pub. 2014/0163214 y Davidson *et al.*, (2012) *Cell* 150:873-875).

Una barrera para el desarrollo clínico del ARNi es el potencial de silenciamiento inespecífico, donde la región semilla del ARNi (típicamente los nucleótidos 1-7 o 1-8) se empareja con secuencias en los ARNm no diana en la región 3' no traducida (UTR) lo que conduce a la desestabilización del transcrito. Los intentos de reducir el silenciamiento inespecífico incluyen el uso de algoritmos para identificar las secuencias semilla candidatas con alta especificidad por el ARNm diana con potencial inespecífico mínimo (Boudreau RL *et al.*, (2012) *Nucl. Acids Res.* 41(1):e9) y la colocación de una protuberancia interna en la región guía del ARNi (Terasawa *et al.*, (2011) *Journal of Nucleic Acids* 2011:131579).

El ARNi se ha investigado como agente terapéutico para tratar la enfermedad de Huntington (EH). La EH es una enfermedad neurodegenerativa heredada causada por una expansión de la repetición CAG en el exón 1 del gen de la huntingtina (HTT). La extensión resultante de la sección de poliglutamina en la región N-terminal confiere una ganancia de función tóxica a la proteína huntingtina mutante (mHtt). El potencial de silenciamiento de la expresión de mHtt como estrategia terapéutica para la EH fue demostrado en primer lugar en un modelo de ratón condicional de la enfermedad (Yamamoto *et al.*, (2000) *Cell* 101:57-66). Cuando se indujo la expresión de mHtt en estos ratones, se hicieron evidentes aberraciones patológicas y de comportamiento. La posterior represión mediada por tetraciclina del transgén mHtt revertió estas anomalías, indicando que una reducción de los niveles de mHtt permitía mecanismos de aclaramiento de la proteína dentro de las neuronas para normalizar los cambios inducidos por mHtt. Por tanto, las estrategias terapéuticas que reducen los niveles de mHtt podrían detener potencialmente el progreso de la enfermedad y aliviar los síntomas de la EH.

En algunos aspectos, la invención proporciona un ARNi que comprende una primera cadena y una segunda cadena, en donde a) la primera cadena y la segunda cadena forman un dúplex; b) la primera cadena comprende una región guía de al menos 19 bases, en donde la región guía comprende una región semilla que comprende las bases 1-N de la cadena guía, N=7 o N=8; y c) la segunda cadena comprende una región no guía de al menos 11 bases (p. ej., al menos 19 bases) la región no guía comprende una secuencia de la protuberancia opuesta a una cualquiera o más de las bases 1-(N+2) de la región guía en el dúplex. En algunas realizaciones, N=7 y la protuberancia es la base opuesta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 de la región guía. En otras realizaciones, N=8 y la protuberancia es la base opuesta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 de la región guía. En algunas realizaciones, la protuberancia es la base opuesta 1 o base N+2 de la región guía.

En algunos aspectos, la invención proporciona un ARNi que comprende una primera cadena y una segunda cadena, en donde a) la primera cadena y la segunda cadena forman un dúplex; b) la primera cadena comprende una región guía de al menos 11 bases (p. ej., al menos 19 bases), en donde la región guía comprende una región semilla que comprende las bases 1-N de la cadena guía, N=7 o N=8; y c) la segunda cadena comprende una región no guía de al menos 11 bases (p. ej., al menos 19 bases), en donde la región no guía comprende una secuencia de la protuberancia opuesta a una cualquiera o más de las bases 1-(N+1) de la región guía en el dúplex. En algunas realizaciones, N=7 y la protuberancia es la base opuesta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de la región guía. En otras realizaciones, N=8 y la protuberancia es la base opuesta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 de la región guía. En algunas realizaciones, la protuberancia es la base opuesta 1 o base N+1 de la región guía.

En algunos aspectos, la invención proporciona un ARNi que comprende una primera cadena y una segunda cadena, en donde a) la primera cadena y la segunda cadena forman un dúplex; b) la primera cadena comprende una región guía de al menos 11 bases (p. ej., al menos 19 bases), en donde la región guía comprende una región semilla que comprende las bases 1-N de la cadena guía, N=7 o N=8; y c) la segunda cadena comprende una región no guía de al menos 11 bases (p. ej., al menos 19 bases), en donde la región no guía comprende una secuencia de la protuberancia opuesta a una cualquiera o más de las bases 1-N de la región guía en el dúplex. En algunas realizaciones, N=7 y la protuberancia es la base opuesta 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de la región guía. En otras realizaciones, N=8 y la protuberancia es la base opuesta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 de la región guía. En algunas realizaciones, la protuberancia es la base opuesta 1 o base N de la región guía. En algunas realizaciones, la protuberancia es la base opuesta 1 de la región guía.

En algunas realizaciones de los aspectos y reivindicaciones anteriores, la protuberancia está formada por una o más bases de la cadena no guía en el dúplex que carece de una base complementaria en la región guía, en donde la protuberancia está flanqueada por bases que no experimentan emparejamiento de bases con la cadena guía. En algunas realizaciones, la protuberancia comprende de 1 a 10 nucleótidos. En algunas realizaciones, la protuberancia comprende 1-3 nucleótidos. En realizaciones adicionales, el ARNi comprende una segunda protuberancia, en donde la segunda protuberancia está localizada en la primera cadena en la región guía localizada 3' con respecto a la región semilla.

En algunas realizaciones de los aspectos y reivindicaciones anteriores, el dúplex tiene entre 19 y 25 o 19 y 23 pares de bases de longitud. En algunas realizaciones, la primera y/o la segunda cadena comprenden adicionalmente una región saliente 3', una región saliente 5', o regiones salientes tanto 5' como 3'. En algunas realizaciones, la primera cadena y la segunda cadena están conectadas por medio de un conector de ARN capaz de formar una estructura de bucle. En algunas realizaciones, el conector de ARN comprende de 4 a 50 nucleótidos. En algunas realizaciones, la estructura de bucle comprende 4 a 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, el ARNi comprende 5' a 3' la segunda cadena, el conector de ARN, y la primera cadena. En algunas realizaciones, el ARNi comprende 5' a 3' la primera cadena, el conector de ARN, y la segunda cadena. En algunas realizaciones, el ARNi es un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un micro ARN (miARN), o un ARN en horquilla corta (ARNhc).

En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la secuencia de nucleótidos del ARNi es mejorada para reducir el silenciamiento génico inespecífico (p. ej., mejorada para reducir los genes de silenciamiento en donde la región semilla se empareja con secuencias en las 3'-UTR de los ARNm no deseados y dirige la represión traduccional y la destabilización

de esos transcritos). En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico comprende uno o más motivos CpG. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico comprende uno o más motivos CpG en la región semilla.

En algunas realizaciones de los aspectos y realizaciones anteriores, el ARNi se dirige
5 un ARN que codifica un polipéptido asociado con un trastorno. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno del SNC. En algunas realizaciones, el trastorno es la enfermedad de depósito lisosomal (EDL), la enfermedad de Huntington, la epilepsia, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, el accidente cerebrovascular, la degeneración corticobasal (DCB), la degeneración gangliónica corticobasal (DGCB), la demencia
10 frontotemporal (DFT), la atrofia multisistémica (AMS), la parálisis supranuclear progresiva (PSP) o el cáncer de cerebro. En algunas realizaciones, el trastorno es la enfermedad de Huntington. En realizaciones adicionales, el polipéptido es la huntingtina. En otras realizaciones adicionales, la huntingtina comprende una mutación asociada con la enfermedad de Huntington. En algunas realizaciones, la región guía comprende la secuencia
15 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) y la región no guía comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2). En algunas realizaciones, la región guía comprende la secuencia 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:15) y la región no guía comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16). En algunas realizaciones, la región guía comprende la secuencia 5'-
20 UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) y la región no guía comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18).

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para reducir la toxicidad de un ARNi que comprende introducir una protuberancia en la región no guía del ARNi para generar un ARNi como se describe en la presente memoria.

25 En algunos aspectos, la invención proporciona un constructo de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica el ARNi descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el ARNi comprende un armazón de miARN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el ARNi está conectado operablemente a un promotor. En algunas realizaciones, el promotor se selecciona entre un
30 promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), una LTR de RSV, una LTR de MoMLV, un promotor de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un promotor de virus de simios 40 (SV40), un promotor de CK6, un promotor de transtiretina (TTR), un promotor de TK, un promotor sensible a tetraciclina (TRE), un promotor de HBV, un promotor de hAAT, un promotor de LSP, un promotor específico de hígado quimérico (LSP), un promotor de E2F,
35 un promotor de telomerasa (hTERT); un promotor del potenciador de citomegalovirus/promotor de la beta-actina de pollo/ β -globina de conejo (CAG), un

promotor del promotor del factor de elongación 1-alfa (EFI-alfa), un promotor de la β -glucuronidasa, un promotor de la β -actina de pollo, un promotor de LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) retroviral, un promotor de la dihidrofolato reductasa, y un promotor de la 13-actina. En algunas realizaciones, el constructo de expresión comprende
5 adicionalmente una señal de poliadenilación. En algunas realizaciones, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, una señal de poliadenilación de SV40, o una pA de TK de HSV.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un vector que comprende el constructo de expresión que se ha descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones,
10 el vector es un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV), un vector adenoviral recombinante, un vector lentiviral recombinante o un vector del virus del herpes simplex (HSV) recombinante. En algunas realizaciones, el vector es un vector adenoviral recombinante. En algunas realizaciones, el vector adenoviral recombinante deriva de Adenovirus de serotipo 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19,
15 20, 22, 23, 24-30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad bovino tipo 3, Ad canino tipo 2, Ad ovino, o Ad porcino tipo 3. En algunas realizaciones, el vector adenoviral recombinante deriva de adenovirus de serotipo 2 o una variante de serotipo 5 adenoviral. En otras realizaciones, el vector es un vector lentiviral recombinante.
20 En algunas realizaciones, el vector lentiviral recombinante deriva de un lentivirus psudotipificado con el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), el virus Ross River (RRV), el virus del Ébola, el virus Marburg, el virus Mokala, el virus de la rabia, RD114 o variantes de los mismos. En otras realizaciones, el vector es un vector de rHSV. En algunas realizaciones, el vector de rHSV deriva de rHSV-1
25 o rHSV-2.

En algunas realizaciones de los aspectos y reivindicaciones anteriores, la invención proporciona un vector de rAAV que comprende un constructo de expresión que codifica un ARNi descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, el constructo de expresión está flanqueado por una o más secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) de
30 AAV. En algunas realizaciones, el constructo de expresión está flanqueado por dos ITR de AAV. En algunas realizaciones, las ITR de AAV son ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino, o AAV de ratón. En algunas realizaciones, las ITR de AAV son ITR de AAV2. En algunas realizaciones, el
35 vector comprende adicionalmente un ácido nucleico de relleno. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de relleno está localizado entre el promotor y el ácido nucleico que codifica el

ARNi. En algunas realizaciones, el vector es un vector de rAAV autocomplementario. En algunas realizaciones, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el ARNi y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un complemento del ARNi, en donde la primera secuencia de ácido nucleico puede formar pares de base intrahebra con la segunda secuencia de ácido nucleico a lo largo de la mayor parte o de toda su longitud. En algunas realizaciones, la primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico están conectadas por medio de una ITR de AAV mutada, en donde la ITR de AAV mutada comprende una delección de la región D y comprende una mutación de la secuencia de resolución terminal. En algunas realizaciones, la invención proporciona un célula que comprende un vector (p. ej., un vector de rAAV) como se describe en la presente memoria.

En algunas realizaciones de los aspectos y reivindicaciones anteriores, la invención proporciona una partícula viral que comprende el vector que codifica un ARNi descrito en la presente memoria en donde la partícula viral es una partícula de AAV que encapsida el vector de AAV, una partícula de adenovirus que encapsida el vector adenoviral recombinante, una partícula lentiviral que encapsida el vector lentiviral recombinante o una partícula de HSV que encapsida el vector de HSV recombinante. En algunas realizaciones, la partícula viral es una partícula de adenovirus que encapsida el vector adenoviral recombinante. En algunas realizaciones, la partícula de adenovirus comprende una cápside de Adenovirus de serotipo 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24-30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad bovino tipo 3, Ad canino tipo 2, Ad ovino, o Ad porcino tipo 3. En algunas realizaciones, la partícula de adenovirus comprende una cápside de adenovirus de serotipo 2 o una variante de una cápside adenoviral de serotipo 5. En otras realizaciones, la partícula viral es una partícula lentiviral que encapsida el vector lentiviral recombinante. En algunas realizaciones, la partícula lentiviral comprende una cápside pseudotipificada con el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), el virus Ross River (RRV), el virus del Ébola, el virus Marburg, el virus Mokala, el virus de la rabia, RD114 o variantes de los mismos. En otras realizaciones, la partícula viral es una partícula de HSV. En algunas realizaciones, la partícula de HSV es una partícula de rHSV-1 o una partícula de rHSV-2.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una partícula de AAV recombinante que comprende un vector de rAAV que codifica un ARNi descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, la partícula viral de AAV comprende una cápside de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8,

AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, un AAV de cabra, AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino, AAV de ratón, o rAAV2/HBoV1. En algunas realizaciones, la ITR y la cápside de la partícula viral del rAAV derivan del mismo serotipo de AAV. En otras realizaciones, la ITR y la cápside de la partícula viral del rAAV derivan de diferentes serotipos de AAV. En algunas realizaciones, la ITR deriva de AAV2 y la cápside de la partícula de rAAV deriva de AAV1.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende la partícula viral (p. ej., la partícula de rAAV) que comprende un vector que codifica un ARNi descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, la composición comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunos aspectos la invención proporciona un método para inhibir o reducir la expresión de un polipéptido en una enfermedad de mamífero que comprende administrar al mamífero un ARNi, un constructo de expresión, un vector, un vector de rAAV, una partícula viral, una partícula de rAAV, o una composición como se describe en la presente memoria, en donde el ARNi se dirige a un ARN que codifica el polipéptido. En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para inhibir la acumulación de un polipéptido en una célula de un mamífero que comprende administrar al mamífero un ARNi, un constructo de expresión, un vector, un vector de rAAV, una partícula viral, una partícula de rAAV, o una composición como se describe en la presente memoria, en donde el ARNi se dirige a un ARN que codifica el polipéptido. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano.

En algunas realizaciones la invención proporciona el uso de un ARNi, un constructo de expresión, un vector, un vector de rAAV, una partícula viral, una partícula de rAAV, o una composición como se describe en la presente memoria en la fabricación de un medicamento para su uso en cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, la invención proporciona un ARNi, un constructo de expresión, un vector, un vector de rAAV, una partícula viral, una partícula de rAAV, o una composición como se describe en la presente memoria para su uso en cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, la invención proporciona un kit para inducir ARN de interferencia en un mamífero que comprende un ARNi, un constructo de expresión, un vector, un vector de rAAV, una partícula viral, una partícula de rAAV, o una composición como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano. En algunas realizaciones, el kit es para su uso en cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

En algunos aspectos, la invención proporciona un ARNi que comprende una primera cadena que comprende una región guía que comprende la secuencia 5'-

UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) y una segunda cadena que comprende una región no guía que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), en donde la primera cadena y la segunda cadena forman un dúplex y en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda cadena forma una protuberancia en la región no guía. En algunas realizaciones, la región guía comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de aproximadamente 90% con el SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, la región no guía comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de aproximadamente 90% con el SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones, los restos de U en los restos 11 y 12 de la región guía forma una protuberancia en la región guía.

En algunas realizaciones, el dúplex tiene entre 19 y 25 o 19 y 23 pares de bases de longitud. En algunas realizaciones, la primera y/o la segunda cadena comprenden adicionalmente una región saliente 3', una región saliente 5', o regiones salientes tanto 5' como 3'. En algunas realizaciones, la primera cadena y la segunda cadena están conectadas por medio de un conector de ARN capaz de formar una estructura de bucle. En algunas realizaciones, el conector de ARN capaz de formar una estructura de bucle comprende de 4 a 50 nucleótidos. En algunas realizaciones, el conector de ARN capaz de formar una estructura de bucle comprende de 4 a 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, el conector de ARN capaz de formar una estructura de bucle comprende 13 nucleótidos. En algunas realizaciones, el ARNi comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO:3. En otras realizaciones, el ARNi comprende una secuencia de nucleótidos idéntica en aproximadamente 90% a la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO:3. En algunas realizaciones, el ARNi es un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un micro ARN (miARN), o un ARN en horquilla corta (ARNhc).

En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la secuencia de ácido nucleico del ARNi es mejorada para reducir el silenciamiento génico inespecífico. En algunas realizaciones, la secuencia comprende uno o más motivos CpG. En algunas realizaciones, la secuencia comprende uno o más motivos CpG en la región semilla. En algunas realizaciones, el ARNi comprende una primera cadena que comprende una región guía que comprende la secuencia 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:15) y una región no guía que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16), en donde la primera cadena y la segunda cadena forman un dúplex y en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda cadena forma una protuberancia en la región no guía. En algunas realizaciones, el ARNi comprende una primera cadena que comprende una región guía que comprende la secuencia 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) y una región no guía que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18), en donde la primera cadena y la segunda cadena forman un dúplex y en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda cadena forma una protuberancia en

la región no guía. En algunas realizaciones, la región guía comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de aproximadamente 90% con el SEQ ID NO:15 y la región no guía comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de aproximadamente 90% con el SEQ ID NO:16 o una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de aproximadamente 90% con el SEQ ID NO:17 y la región no guía comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de aproximadamente 90% con el SEQ ID NO:18.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un constructo de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica el ARNi como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el ARNi comprende un armazón de miARN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el ARNi comprende un armazón de miR-155. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el ARNi está conectado operablemente a un promotor. En algunas realizaciones, el promotor es capaz de expresar el ARNi en el cerebro de un mamífero. En algunas realizaciones, el promotor se selecciona entre un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), una LTR de RSV, una LTR de MoMLV, un promotor de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un promotor de virus de simios 40 (SV40), un promotor de CK6, un promotor de transtiretina (TTR), un promotor de TK, un promotor sensible a tetraciclina (TRE), un promotor de HBV, un promotor de hAAT, un promotor de LSP, un promotor específico de hígado quimérico (LSP), un promotor de E2F, un promotor de telomerasa (hTERT); un promotor del potenciador de citomegalovirus/promotor de la beta-actina de pollo/ β -globina de conejo, un promotor del promotor del factor de elongación 1-alfa (EFI-alfa), un promotor de la β -glucuronidasa, un promotor de la β -actina de pollo, un promotor de LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) retroviral, un promotor de la dihidrofolato reductasa, y un promotor de la 13-actina. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de la β -actina de pollo híbrido. En algunas realizaciones, el constructo de expresión comprende adicionalmente una señal de poliadenilación. En algunas realizaciones, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un vector que comprende el constructo de expresión que se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el vector es un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV), un vector adenoviral recombinante, un vector lentiviral recombinante o un vector del virus del herpes simplex (HSV) recombinante. En algunas realizaciones, un vector adenoviral recombinante. En algunas realizaciones, el vector adenoviral recombinante deriva de Adenovirus de serotipo 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24-30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37,

AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad bovino tipo 3, Ad canino tipo 2, Ad ovino, o Ad porcino tipo 3. En algunas realizaciones, el vector adenoviral recombinante deriva de adenovirus de serotipo 2 o una variante de serotipo 5 adenoviral. En algunas realizaciones, el vector es un vector lentiviral recombinante. En algunas realizaciones, el vector lentiviral recombinante deriva de un lentivirus psudotipificado con el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), el virus Ross River (RRV), el virus del Ébola, el virus Marburg, el virus Mokala, el virus de la rabia, RD114 o variantes de los mismos. En algunas realizaciones, el vector es un vector de rHSV. En algunas realizaciones, el vector de rHSV deriva de rHSV-1 o rHSV-2.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un vector de AAV recombinante (rAAV) que comprende un constructo de expresión que codifica el ARNi como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el constructo de expresión está flanqueado por una o más secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV. En algunas realizaciones, el constructo de expresión está flanqueado por dos ITR de AAV. En algunas realizaciones, las ITR de AAV son ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino, o AAV de ratón. En algunas realizaciones, las ITR de AAV son ITR de AAV2. En algunas realizaciones, el vector de rAAV comprende 5' a 3' una ITR de AAV2, un promotor, el ácido nucleico que codifica el ARNi, una señal de poliadenilación, y una ITR de AAV2. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de CBA. En algunas realizaciones, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. En algunas realizaciones, el vector de rAAV comprende 5' a 3' una ITR de AAV2, el promotor de CBA, el ácido nucleico que codifica el ARNi, una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, y una ITR de AAV2. En algunas realizaciones, el vector comprende adicionalmente un ácido nucleico de relleno. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de relleno comprende un ácido nucleico que codifica una proteína fluorescente verde (GFP). En algunas realizaciones, el ácido nucleico de relleno está localizado entre el promotor y el ácido nucleico que codifica el ARNi. En algunas realizaciones, el ARNi comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO:3. En otras realizaciones, el ARNi comprende una secuencia de nucleótidos idéntica en aproximadamente 90% a la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO:3. En algunas realizaciones, el vector es un vector autocomplementario. En algunas realizaciones, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el ARNi y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un complemento del ARNi, en donde la primera secuencia de ácido nucleico puede formar pares de base intrahebra con la segunda secuencia de ácido nucleico a lo largo de la mayor parte o de toda

su longitud. En algunas realizaciones, la primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico están conectadas por medio de una ITR de AAV mutada, en donde la ITR de AAV mutada comprende una delección de la región D y comprende una mutación de la secuencia de resolución terminal.

5 En algunas realizaciones, la invención proporciona una célula que comprende el vector o el vector de rAAV como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, la célula es una célula del sistema nervioso central (SNC).

En algunas realizaciones, la invención proporciona una partícula viral que comprende un vector que codifica un ARNi como se ha descrito anteriormente, en donde la
10 partícula viral es una partícula de AAV que encapsida el vector de AAV, una partícula de adenovirus que encapsida el vector adenoviral recombinante, una partícula lentiviral que encapsida el vector lentiviral recombinante o una partícula de HSV que encapsida el vector de HSV recombinante. En algunas realizaciones, la partícula viral es una partícula de adenovirus que encapsida el vector adenoviral recombinante. En algunas realizaciones, la
15 partícula de adenovirus comprende una cápside de Adenovirus de serotipo 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24-30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad bovino tipo 3, Ad canino tipo 2, Ad ovino, o Ad porcino tipo 3. En algunas realizaciones, la partícula de adenovirus comprende
20 una cápside de adenovirus de serotipo 2 o una variante de una cápside adenoviral de serotipo 5. En otras realizaciones, la partícula viral es una partícula lentiviral que encapsida el vector lentiviral recombinante. En algunas realizaciones, la partícula lentiviral comprende una cápside pseudotipificada con el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), el virus Ross River (RRV), el virus del Ébola, el virus
25 Marburg, el virus Mokala, el virus de la rabia, RD114 o variantes de los mismos. En otras realizaciones, la partícula viral es una partícula de HSV. En algunas realizaciones, la partícula de HSV es una partícula de rHSV-1 o una partícula de rHSV-2.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una partícula de AAV recombinante que comprende el vector de rAAV que codifica un ARNi como se ha descrito
30 anteriormente. En algunas realizaciones, la partícula viral de AAV comprende una cápside de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, un AAV de cabra, AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino, AAV de ratón, o rAAV2/HBoV1. En algunas
35 realizaciones, la ITR y la cápside de la partícula viral del rAAV derivan del mismo serotipo de AAV. En otras realizaciones, la ITR y la cápside de las partículas virales del rAAV

derivan de diferentes serotipos de AAV. En algunas realizaciones, la partícula viral del rAAV comprende una cápside de AAV2. En algunas realizaciones, la partícula viral del rAAV comprende una cápside de AAV1, y en donde el vector comprende ITR de AAV2.

5 En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende la partícula viral o la partícula de rAAV como se ha descrito anteriormente. En realizaciones adicionales, la composición comprende un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para el tratamiento de la enfermedad de Huntington en un mamífero que comprende administrar al mamífero la composición. En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para inhibir la
10 expresión de htt en un mamífero con la enfermedad de Huntington que comprende administrar al mamífero la composición. En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para inhibir la acumulación de htt en una célula de un mamífero con la enfermedad de Huntington que comprende administrar al mamífero la composición.

En algunos aspectos, la invención proporciona métodos para el tratamiento de la
15 enfermedad de Huntington en un mamífero que comprende administrar al mamífero un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), en donde el resto A en el resto 18 o el
20 resto 19 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena. En algunos aspectos, la invención proporciona un método para inhibir la expresión de htt en un mamífero con la enfermedad de Huntington que comprende administrar al mamífero un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) y una
25 segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena. En algunos aspectos, la invención proporciona un método para inhibir la acumulación de htt en una célula de un mamífero con la enfermedad de Huntington que comprende administrar
30 al mamífero un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la
35 primera cadena.

En algunas realizaciones de los métodos anteriores, la región guía comprende una

secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de aproximadamente 90% con el SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, la región no guía comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de aproximadamente 90% con el SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones, los restos de U en los restos 11 y 12 de la región guía forma una protuberancia en la región guía. En algunas realizaciones, el dúplex tiene entre 19 y 25 o 19 y 23 pares de bases de longitud. En algunas realizaciones, la primera y/o la segunda cadena comprenden adicionalmente una región saliente 3', una región saliente 5', o regiones salientes tanto 5' como 3'. En algunas realizaciones, la primera cadena y la segunda cadena están conectadas por medio de un conector de ARN capaz de formar una estructura de bucle. En algunas realizaciones, el conector de ARN capaz de formar una estructura de bucle comprende de 4 a 50 nucleótidos. En algunas realizaciones, el conector de ARN capaz de formar una estructura de bucle comprende de 4 a 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, el conector de ARN capaz de formar una estructura de bucle comprende 13 nucleótidos. En algunas realizaciones, el ARNi comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO:3. En otras realizaciones, el ARNi comprende una secuencia de nucleótidos idéntica en aproximadamente 90% a la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO:3. En algunas realizaciones, el ARNi es un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un micro ARN (miARN), o un ARN en horquilla corta (ARNhc).

En algunas realizaciones de los métodos anteriores, el ácido nucleico es mejorado para reducir el silenciamiento génico inespecífico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende uno o más motivos CpG. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende uno o más motivos CpG en una región semilla.

En algunas realizaciones la invención proporciona métodos para el tratamiento de la enfermedad de Huntington en un mamífero que comprende administrar al mamífero un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:15) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16), en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena. En algunas realizaciones la invención proporciona métodos para inhibir la expresión de htt en un mamífero con la enfermedad de Huntington que comprende administrar al mamífero un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:15) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16), en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena.

En algunas realizaciones la invención proporciona métodos para inhibir la acumulación de htt en una célula de un mamífero con la enfermedad de Huntington que comprende administrar al mamífero un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:15) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16), en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena. En algunas realizaciones, la primera cadena comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de aproximadamente 90% con el SEQ ID NO:15 pero mantiene el motivo CpG. En algunas realizaciones, la segunda cadena comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de aproximadamente 90% con el SEQ ID NO:16 pero mantiene el motivo CpG.

En algunas realizaciones la invención proporciona métodos para el tratamiento de la enfermedad de Huntington en un mamífero que comprende administrar al mamífero un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18), en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena.

En algunas realizaciones la invención proporciona métodos para inhibir la expresión de htt en un mamífero con la enfermedad de Huntington que comprende administrar al mamífero un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18), en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena.

En algunas realizaciones la invención proporciona métodos para inhibir la acumulación de htt en una célula de un mamífero con la enfermedad de Huntington que comprende administrar al mamífero un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18), en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena. En algunas realizaciones, la primera cadena comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de aproximadamente 90% con el SEQ ID NO:17 pero mantiene el motivo CpG. En algunas realizaciones, la segunda cadena

comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de aproximadamente 90% con el SEQ ID NO:18 pero mantiene el motivo CpG.

En algunas realizaciones de los métodos anteriores, el constructo de expresión que comprende el ácido nucleico que codifica el ARNi como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el ARNi comprende un armazón de miARN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el ARNi comprende un armazón de miR-155. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el ARNi está conectado operablemente a un promotor. En algunas realizaciones, el promotor es capaz de expresar el ARNi en el cerebro de un mamífero. En algunas realizaciones, el promotor se selecciona entre un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), una LTR de RSV, una LTR de MoMLV, un promotor de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un promotor de virus de simios 40 (SV40), un promotor de CK6, un promotor de transtiretina (TTR), un promotor de TK, un promotor sensible a tetraciclina (TRE), un promotor de HBV, un promotor de hAAT, un promotor de LSP, un promotor específico de hígado quimérico (LSP), un promotor de E2F, un promotor de telomerasa (hTERT); un promotor del potenciador de citomegalovirus/promotor de la beta-actina de pollo/ β -globina de conejo, un promotor del promotor del factor de elongación 1-alfa (EFI-alfa), un promotor de la β -glucuronidasa, un promotor de la β -actina de pollo, un promotor de LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) retroviral, un promotor de la dihidrofolato reductasa, y un promotor de la 13-actina. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de la β -actina de pollo híbrido. En algunas realizaciones, el constructo de expresión comprende adicionalmente una señal de poliadenilación. En algunas realizaciones, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

En algunas realizaciones de los métodos anteriores, el vector comprende el constructo de expresión que se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el vector es un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV), un vector adenoviral recombinante, un vector lentiviral recombinante o un vector del virus del herpes simplex (HSV) recombinante. En algunas realizaciones, un vector adenoviral recombinante. En algunas realizaciones, el vector adenoviral recombinante deriva de Adenovirus de serotipo 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24-30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad bovino tipo 3, Ad canino tipo 2, Ad ovino, o Ad porcino tipo 3. En algunas realizaciones, el vector adenoviral recombinante deriva de adenovirus de serotipo 2 o una variante de serotipo 5 adenoviral. En algunas realizaciones, el vector es un vector lentiviral recombinante. En algunas realizaciones, el vector lentiviral recombinante deriva de un lentivirus psudotipificado con el

virus de la estomatitis vesicular (VSV), el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), el virus Ross River (RRV), el virus del Ébola, el virus Marburg, el virus Mokala, el virus de la rabia, RD114 o variantes de los mismos. En algunas realizaciones, el vector es un vector de rHSV. En algunas realizaciones, el vector de rHSV deriva de rHSV-1 o rHSV-2.

5 En algunas realizaciones de los métodos anteriores, el vector de AAV recombinante (rAAV) comprende un constructo de expresión que codifica el ARNi como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el constructo de expresión está flanqueado por una o más secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV. En algunas realizaciones, el constructo de expresión está flanqueado por dos ITR de AAV. En algunas
10 realizaciones, las ITR de AAV son ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino, o AAV de ratón. En algunas realizaciones, las ITR de AAV son ITR de AAV2. En algunas realizaciones, el vector de rAAV comprende 5' a 3' una ITR de AAV2, un promotor, el ácido nucleico que codifica el
15 ARNi, una señal de poliadenilación, y una ITR de AAV2. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de CBA. En algunas realizaciones, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. En algunas realizaciones, el vector de rAAV comprende 5' a 3' una ITR de AAV2, el promotor de CBA, el ácido nucleico que codifica el ARNi, una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento
20 bovina, y una ITR de AAV2. En algunas realizaciones, el vector comprende adicionalmente un ácido nucleico de relleno. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de relleno comprende un ácido nucleico que codifica una proteína fluorescente verde (GFP). En algunas realizaciones, el ácido nucleico de relleno está localizado entre el promotor y el ácido nucleico que codifica el ARNi. En algunas realizaciones, el ARNi comprende la
25 secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO:3. En otras realizaciones, el ARNi comprende una secuencia de nucleótidos idéntica en aproximadamente 90% a la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO:3. En algunas realizaciones, el vector es un vector autocomplementario. En algunas realizaciones, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el ARNi y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un complemento
30 del ARNi, en donde la primera secuencia de ácido nucleico puede formar pares de base intrahebra con la segunda secuencia de ácido nucleico a lo largo de la mayor parte o de toda su longitud. En algunas realizaciones, la primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico están conectadas por medio de una ITR de AAV mutada, en donde la ITR de AAV mutada comprende una delección de la región D y comprende una
35 mutación de la secuencia de resolución terminal.

En algunas realizaciones de los métodos anteriores, la partícula viral que comprende

un vector que codifica un ARNi como se ha descrito anteriormente, en donde la partícula viral es una partícula de AAV que encapsida el vector de AAV, una partícula de adenovirus que encapsida el vector adenoviral recombinante, una partícula lentiviral que encapsida el vector lentiviral recombinante o una partícula de HSV que encapsida el vector de HSV recombinante. En algunas realizaciones, la partícula viral es una partícula de adenovirus que encapsida el vector adenoviral recombinante. En algunas realizaciones, la partícula de adenovirus comprende una cápside de Adenovirus de serotipo 2, 1, 5, 6, 19, 3, 11, 7, 14, 16, 21, 12, 18, 31, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24-30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad bovino tipo 3, Ad canino tipo 2, Ad ovino, o Ad porcino tipo 3. En algunas realizaciones, la partícula de adenovirus comprende una cápside de adenovirus de serotipo 2 o una variante de una cápside adenoviral de serotipo 5. En otras realizaciones, la partícula viral es una partícula lentiviral que encapsida el vector lentiviral recombinante. En algunas realizaciones, la partícula lentiviral comprende una cápside pseudotipificada con el virus de la estomatitis vesicular (VSV), el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), el virus Ross River (RRV), el virus del Ébola, el virus Marburg, el virus Mokala, el virus de la rabia, RD114 o variantes de los mismos. En otras realizaciones, la partícula viral es una partícula de HSV. En algunas realizaciones, la partícula de HSV es una partícula de rHSV-1 o una partícula de rHSV-2.

En algunas realizaciones de los métodos anteriores, la partícula de AAV recombinante comprende el vector de rAAV que codifica un ARNi como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la partícula viral de AAV comprende una cápside de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, un AAV de cabra, AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino, AAV de ratón, o rAAV2/HBoV1. En algunas realizaciones, la ITR y la cápside de la partícula viral del rAAV derivan del mismo serotipo de AAV. En otras realizaciones, la ITR y la cápside de las partículas virales del rAAV derivan de diferentes serotipos de AAV. En algunas realizaciones, la partícula viral del rAAV comprende una cápside de AAV2. En algunas realizaciones, la partícula viral del rAAV comprende una cápside de AAV1, y en donde el vector comprende ITR de AAV2.

En algunas realizaciones de los métodos anteriores la partícula viral o la partícula de rAAV está en una composición. En algunas realizaciones, la composición comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones la invención proporciona el uso de un ARNi, un constructo de expresión, un vector, un vector de rAAV, una partícula viral, una partícula de rAAV, o

una composición como se describe en la presente memoria en la fabricación de un medicamento para su uso en cualquiera de los métodos para tratar la enfermedad de Huntington descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, la invención proporciona un ARNi, un constructo de expresión, un vector, un vector de rAAV, una partícula viral, una partícula de rAAV, o una composición como se describe en la presente memoria para su uso en cualquiera de los métodos para tratar la enfermedad de Huntington descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, la invención proporciona un kit para inducir ARN de interferencia para tratar la enfermedad de Huntington en un mamífero que comprende un ARNi, un constructo de expresión, un vector, un vector de rAAV, una partícula viral, una partícula de rAAV, o una composición como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano. En algunas realizaciones, el kit es para su uso en cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

Todas las referencias citadas en la presente memoria, incluyendo las solicitudes y publicaciones de patentes, se incorporan como referencia en su totalidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las **FIG. 1A y B** muestran la reducción mediada por AAV2/1-miARN-Htt de los niveles de Htt *in vitro*. (**FIG. 1A**) Esquema del constructo previral utilizado para generar AAV2/1-miARN-Htt. El plásmido fue diseñado para expresar GFP y una secuencia de miARN contra Htt bajo el control transcripcional del promotor de la β -actina de pollo (CBA). ITR, repetición terminal invertida. eGFP, proteína fluorescente verde potenciada. PoliA, poliA de hormona de crecimiento bovina. (**FIG. 1B**) Análisis mediante PCR cuantitativa que evaluaba los niveles de ARNm de Htt en células HEK293 48 hr después del tratamiento con AAV-2/1-miARN-Htt. PPIA sirvió como gen de control de normalización. Los valores se proporcionan como las medias $\pm$ ETM. * $p < 0,05$.

Las **FIG. 2A-D** demuestran la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) siguiente a la infección de Células HEK293 con el vector AAV2/1-eGFP-miARN-Htt. (**FIG. 2A**) Perfil de dispersión de citometría de flujo de células HEK293 con eGFP. La dispersión de la luz hacia adelante A (FSC-A) representa el tamaño relativo de la célula, el área y SSC-A representa la complejidad relativa de la célula, representando el área con cada punto una célula. (**FIG. 2B**) Un gráfico de fluorescencia de las intensidades de fluorescencia de eGFP de células demarcando cada color células clasificadas como as GFP-, GFP+, GFP++, o GFP+++ , respectivamente. (**FIG. 2C**) Histograma FACS de células HEK293 que expresan eGFP. (**FIG. 2D**) Tabla de recuentos de células siguientes a clasificación mediante FACS.

Las **FIG. 3A-E** muestran la transducción estriatal generalizada y la reducción de Htt que sigue a la inyección intraestriatal de AAV2/1-miARN-Htt en ratones YAC128. (**FIG.**

3A) Perfil de dispersión mediante citometría de flujo de células estriatales con eGFP. La dispersión de luz hacia adelante A (FSC-A) representa el tamaño relativo de la célula, el área y SSC-A representa la complejidad relativa de la célula, representando el área con cada punto una célula. (**FIG. 3B**) Gráfico de puntos utilizando un análisis FSC-A frente a FITC-A. Las células muertas se clasificaron y se seleccionaron las células eGFP⁺ y eGFP⁻. La expresión de GFP de estas células se evaluó y se cuantificó y se muestra en la **FIG. 3C**. (**FIG. 3C**) Un gráfico de fluorescencia de la intensidad de fluorescencia de eGFP recopilado con un filtro 530/30BP 505LP. (**FIG. 3D**) Microscopia de fluorescencia que muestra la expresión de eGFP generalizada a lo largo del cuerpo estriado que sigue a la administración intracraneal de AAV2/1-eGFP-miARN-Htt. (**FIG. 3E**) Análisis de PCR cuantitativa que evalúa los niveles de ARNm de Htt en el cuerpo estriado 1 y 5 meses después de la inyección de AAV2/1-miARN-Htt o vector de control AAV2/1-nulo. PPIA sirvió como gen de control de normalización. Los valores se proporcionan como las medias $\pm$ ETM. * $p < 0,05$. Los ratones YAC128 tratados con AAV2/1-miARN-Htt (N=8) mostraron una reducción de aproximadamente 50% de los niveles de ARNm de Htt en el cuerpo estriado cuando se compararon con ratones a los que se había inyectado AAV2/1-Nulo (N=8 por punto temporal) 1 y 5 meses después del tratamiento.

La **FIG. 4** muestra la reducción del ARNm de Htt de ratón que sigue a la inyección intraestriatal de AAV2/1-miARN-Htt en ratones YAC128. Análisis de PCR cuantitativa que evalúa los niveles endógenos de ARNm de Htt ratón en el cuerpo estriado 1 y 5 meses después de la inyección de AAV2/1-miARN-Htt o vector de control AAV2/1-nulo. PPIA sirvió como gen de control de normalización. Los valores se proporcionan como las medias $\pm$ ETM. * $p < 0,05$.

Las **FIG. 5A-I** demuestran que el descenso sostenido de los niveles de Htt en ratones YAC128 mediante AAV2/1-miARN-Htt no ocasiona neuroinflamación visible. (**FIGS. 5A-C**) Tinción con hematoxilina y Eosina (H y E) de secciones de tejido estriatal de ratones YAC128 tratados utilizando AAV2/1-miARN-Htt a los 1 (**FIG. 5B**) o 5 meses (**FIG. 5C**) de la inyección de AAV-miARN-Htt, en comparación con los ratones YAC128 tratados utilizando vectores AAV2/1-Nulo (**FIG. 5A**). (**FIGS. 5D-F**) Tinción inmunohistoquímica de GFAP de secciones de tejido estriatal de ratones YAC128 tratados utilizando AAV2/1-miARN-Htt a los 1 (**FIG. 5E**) o 5 meses (**FIG. 5F**) de la inyección de AAV-miARN-Htt, en comparación con los ratones YAC128 tratados utilizando vectores AAV2/1-Nulo (**FIG. 5D**). (**FIGS. 5G-I**) Tinción inmunohistoquímica de Iba-1 de secciones de tejido estriatal de ratones YAC128 tratados utilizando AAV2/1-miARN-Htt a los 1 (**FIG. 5H**) o 5 meses (**FIG. 5I**) de la inyección de AAV-miARN-Htt, en comparación con los ratones YAC128 tratados utilizando vectores AAV2/1-Nulo (**FIG. 5G**). Se ajustó la exposición de todas las fotografías

para comparaciones exactas. Barra de escala: 0,25mm.

Las **FIG. 5J y K** demuestran que la disminución sostenida de los niveles de Htt en ratones YAC128 mediante AAV2/1-miARN-Htt no ocasiona neuroinflamación visible. (**FIG. 5J**) Niveles estriatales de los niveles de ARNm de GFAP mediante QPCR a los 1 o 5 meses que siguen a la inyección de AAV2/1-miARN-Htt. (**FIG. 5K**) Niveles de ARNm de Iba1 mediante QPCR a los 1 o 5 meses que siguen a la inyección de AAV2/1-miARN-Htt. Los valores se proporcionan como las medias $\pm$ ETM. *Significativamente diferente de los ratones AAV2/1-Nulo, $p < 0,05$; ANOVA.

Las **FIGS. 6A-D** muestran el diseño experimental para someter a ensayo el efecto de la administración estriatal de AAV2/1-miARN-Htt en ratones YAC128 sobre déficits de comportamiento. (**FIG. 6A**) Ilustración del calendario experimental. Ratones YAC128 y de tipo salvaje de dos meses de edad recibieron inyecciones bilateral en el cuerpo estriado de AAV2/1-miARN-Htt (N=8 YAC y N=8 WT) o de control AAV2/1-Nulo (N=8 YAC y N=8 WT) y se sometieron a un ensayo de varilla giratoria ("rotarod") y al ensayo de natación de Porsolt a los 4 y 5 meses de edad, respectivamente. Todos los ratones se sacrificaron a los 5 meses de edad, y a continuación se recogieron los tejidos para los análisis bioquímicos e histológicos. (**FIG. 6B**) Microscopia fluorescente que muestra la expresión de eGFP en el cuerpo estriado a los 3 meses del tratamiento. Niveles de proteína Htt de ratón (**FIG. 6C**) y humana (**FIG. 6D**) mediante transferencia Western 3 meses después del tratamiento con AAV2/1-miARN-Htt.

Las **FIG. 6E y F** demuestran que la administración estriatal de AAV2/1-miARN-Htt redujo los déficits de comportamiento en ratones YAC128. (**FIG. 6E**) Ensayo de la varilla giratoria a los 2 meses siguientes a la inyección de AAV2/1-miARN-Htt. (**FIG. 6F**) Tiempo de permanencia inmóvil en el ensayo de natación de Porsolt 3 meses después de la inyección de AAV2/1-miARN-Htt. Los valores se proporcionan como las medias $\pm$ ETM. *Significativamente diferente de los ratones AAV2/1-Nulo, $p < 0,05$; ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey.

Las **FIG. 7A y B** muestran que el tratamiento utilizando AAV2/1-miARN-Htt corrigió parcialmente la desregulación transcripcional del receptor DARPP-32 y D1 en ratones YAC128. Niveles de ARNm del receptor DARPP-32 y D1 en el cuerpo estriado de ratones YAC128 y de tipo salvaje evaluados mediante QPCR a los 3 meses siguientes a la inyección de AAV2/1-miARN-Htt (N=8 YAC y N=8 WT) o control de AAV2/1-Nulo (N=8 YAC y N=8 WT). (**FIG. 7A**) Niveles estriatales de ARNm de DARPP-32 en ratones de la misma camada YAC128 y FVB de tipo salvaje después del tratamiento con AAV2/1-Nulo o AAV2/1-miARN-Htt. (**FIG. 7B**) Niveles estriatales de ARNm del receptor D1 en ratones de la misma camada YAC128 y FVB de tipo salvaje después del tratamiento con AAV2/1-Nulo

o AAV2/1-miARN-Htt. Los valores se proporcionan como las medias $\pm$ ETM. *Significativamente diferente de las muestras AAV2/1-Nulo, $p < 0,05$; ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey.

Las **FIG. 8A-D** muestran que la administración intracraneal de AAV2/1-miARN-Htt
5 mejoró los déficits motores y redujo los agregados de Htt mutante en el cuerpo estriado de
ratones YAC128 de edad avanzada. (**FIG. 8A**) Tinción inmunohistoquímica de secciones de
cerebro de ratón YAC128 que muestra agregados de Htt mutante en el cuerpo estriado. Los
agregados se observaron en ratones YAC128 de 6, 9, 12 (no mostrado) y 24 meses de edad.
Los ratones de tipo salvaje no mostraron agregados en ninguna de las edades sometidas a
10 ensayo. (**FIG. 8B**) Una ilustración del calendario experimental para someter a ensayo
AAV2/1-miARN-HTT en ratones YAC 128 y de tipo salvaje de edad avanzada. Ratones de
siete meses de edad recibieron inyecciones intraestriatales bilaterales de AAV2/1-miARN-
Htt (N=6 YAC y N=4 WT) o control de AAV2/1-GFP (N=6 YAC y N=4 WT) y a
continuación se sometieron a pruebas de comportamiento a los 10 meses de edad. Los
15 cerebros se recogieron a los 5 de la inyección (cuando los ratones tuvieron 12 meses de
edad). (**FIG. 8C**) Actuación de los ratones YAC128 de edad avanzada en el ensayo de la
varilla giratoria a los 3 meses de la inyección de AAV-miARN-Htt. (**FIG. 8D**) Análisis
inmunohistoquímico de EM-48 de secciones de cerebro de ratones YAC 128 tratados con
AAV2/1-miARN-Htt o AAV2/1-eGFO a los 5 meses del tratamiento.

Las **FIGS. 9A y B** ilustran la protuberancia interna en la secuencia del tallo de
20 ARNhc utilizado para los experimentos descritos en la presente memoria. En comparación
con la secuencia perfectamente coincidente mostrada en la **FIG. 9A**, la secuencia utilizada
en los experimentos anteriores contenía un nucleótido de adenina (A) adicional en el extremo
3' de la secuencia semilla (resaltada mediante flechas), que no tenía un nucleótido de timina
25 correspondiente (T) en la cadena guía (**FIG. 9B**). Se resaltan las secuencias complementarias
a la secuencia diana.

La **FIG. 10** muestra la secuencia de miARN de PS170XA original (SEQ ID NO: 19)
y dos versiones de baja inespecificidad modificadas.

La **FIG. 11** muestra la capacidad de AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 y 170XAL2
30 para mediar en la reducción de Htt in vitro. Los valores se proporcionan como las medias $\pm$
ETM.

Las **FIG. 12A-12D** muestran la capacidad de AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 y
170XAL2 para silenciar la expresión de Htt en el cuerpo estriado de ratones YAC128. La Htt
humana se muestra en las **FIG. 12A y 12C**. La Htt de ratón se muestra en las **FIG. 12B y**
35 **12D**. La beta-tubulina sirvió como un gen de control de normalización para todas las
transferencias western. *Significativamente diferente de los ratones de control no tratados,

$p < 0,05$; ANOVA seguido de prueba post-hoc de Tukey.

La **FIG. 13A** muestra GFAP y la **FIG. 13B** muestra los niveles de ARNm de Iba1 en el cuerpo estriado. PPIA humana sirvió como gen de control de normalización. Los valores se proporcionan como las medias $\pm$ ETM. *Significativamente diferente de los ratones de control no tratados, $p < 0,05$; ANOVA seguido de prueba post-hoc de Tukey.

La **FIG. 14** muestra la tinción inmunohistoquímica de GFAP e Iba1 de secciones de tejido estriatal de ratones YAC128 tratados con AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 o AAV2/1-miARN-Htt 170XAL2. Barra de escala = 50 μ M.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En algunos aspectos la invención proporciona ARNi mejorado; por ejemplo, ARNi mejorado para usos terapéuticos. En algunas realizaciones, el ARNi comprende una primera cadena y una segunda cadena, en donde a) la primera cadena y la segunda forman un dúplex; b) la primera cadena comprende una región guía de al menos 11 bases, en donde la región guía comprende una región semilla que comprende las bases 1-N de la cadena guía, en donde $N=7$ o $N=8$; y c) la segunda cadena comprende una región no guía de al menos 11 bases, en donde la región no guía comprende una secuencia de la protuberancia opuesta a una cualquiera o más de las bases 1-(N+2) de la región guía en el dúplex. En algunas realizaciones, el ARNi comprende una primera cadena y una segunda cadena, en donde a) la primera cadena y la segunda forman un dúplex; b) la primera cadena comprende una región guía de al menos 10 bases, en donde la región guía comprende una región semilla que comprende las bases 1-N de la cadena guía, en donde $N=7$ o $N=8$; y c) la segunda cadena comprende una región no guía de al menos 10 bases, en donde la región no guía comprende una secuencia de la protuberancia opuesta a una cualquiera o más de las bases 1-(N+1) de la región guía en el dúplex. En algunas realizaciones, el ARNi comprende una primera cadena y una segunda cadena, en donde a) la primera cadena y la segunda forman un dúplex, b) la primera cadena comprende una región guía de al menos 9 bases, en donde la región guía comprende una región semilla que comprende las bases 2-7 o 2-8 de la cadena guía, y c) la segunda cadena comprende una región no guía de al menos 9 bases, en donde la región no guía comprende una secuencia de la protuberancia opuesta a base 1 o base 9 de la región guía en el dúplex. En algunas realizaciones, el ARNi comprende una primera cadena y una segunda cadena, en donde a) la primera cadena y la segunda forman un dúplex, b) la primera cadena comprende una región guía de al menos 9 bases, en donde la región guía comprende una región semilla que comprende las bases 2-7 o 2-8 de la cadena guía, y c) la segunda cadena comprende una región no guía de al menos 9 bases, en donde la región no guía comprende una secuencia de la protuberancia opuesta a base 1 de la región guía en el dúplex. En algunas realizaciones, el ARNi es un ARNi artificial.

En algunos aspectos, la invención proporciona casetes de expresión, vectores (p. ej., vectores de AAV, adenovirales, lentivirales, o de HSV recombinantes), células, partículas virales (p. ej., partículas virales de AAV, adenovirales, lentivirales, o de HSV), y composiciones farmacéuticas que comprende un ARNi de la presente descripción. En aspectos adicionales, la invención proporciona métodos para el tratamiento de a enfermedad o trastorno en un mamífero que comprende administrar al mamífero una composición farmacéutica que comprende un ARNi de la presente descripción. En otros aspectos adicionales, la invención proporciona kits que comprende un ARNi de la presente descripción.

En algunos aspectos, la invención proporciona ARNi para el tratamiento de la enfermedad de Huntington. En algunas realizaciones, el ARNi comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), donde la primera cadena y la segunda cadena forman un dúplex y en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 del SEQ ID NO:2 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena. En algunos aspectos, la invención proporciona casetes de expresión, vectores (p. ej., vectores de AAV, adenovirales, lentivirales, o de HSV recombinantes), células, partículas virales (p. ej., partículas virales de AAV, adenovirales, lentivirales, o de HSV), y composiciones farmacéuticas que comprende un ARNi de la presente descripción. En aspectos adicionales, la invención proporciona métodos para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, que inhiben la expresión de htt, y que inhiben la acumulación de htt en una célula en un mamífero que comprende administrar al mamífero una composición farmacéutica que comprende un ARNi de la presente descripción. En otros aspectos adicionales, la invención proporciona el uso de una composición farmacéutica que comprende un ARNi de la presente descripción para tratar la enfermedad de Huntington (p. ej., mejorar los síntomas de la enfermedad de Huntington), inhibir la expresión de htt, o inhibir la acumulación de htt en una célula en un mamífero con la enfermedad de Huntington. En otros aspectos adicionales, la invención proporciona kits para el tratamiento de la enfermedad de Huntington en un mamífero que comprende un ARNi de la presente descripción.

I. Técnicas Generales

Las técnicas y procedimientos descritos o referidos en la presente memoria son generalmente bien entendidos y empleados comúnmente utilizando metodología convencional por lo expertos en la técnica, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et

al., 4a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., 2003); la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds., 1995); Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow y Lane, eds., 1988); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I. Freshney, 6a ed., J. Wiley and Sons, 2010); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., Academic Press, 1998); Introducción to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1996); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reacción, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., J. Wiley and Sons, 2002); Immunobiology (C.A. Janeway et al., 2004); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 2011).

II. Definiciones

Un “vector”, según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un plásmido o virus recombinante que comprende un ácido nucleico que se va a suministrar a una célula anfitriona, ya sea in vitro o in vivo.

El término “polinucleótido” o “ácido nucleico” según se utiliza en la presente memoria se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. De este modo, este término incluye, pero no está limitado, ADN o ARN de cadena sencilla, doble o múltiple, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN, o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina, u otras bases nucleotídicas naturales, modificadas químicamente o bioquímicamente, no naturales, o derivatizadas. La cadena principal del polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato (como se puede encontrar típicamente en el ARN o el ADN), o grupos azúcar o fosfato modificados o sustituidos. Alternativamente, cadena principal del polinucleótido puede comprender un polímero de subunidades sintéticas tales como fosforamidatos y por tanto puede ser un oligodesoxinucleósido fosforamidato (P-NH₂) o un oligómero de

fosforamidato-fosfodiéster mixto. Además, se puede obtener un polinucleótido de doble cadena a partir de producto polinucleotídico de cadena sencilla de síntesis química ya sea sintetizando la cadena complementaria y reasociando las cadenas en las condiciones apropiadas, o sintetizando la cadena complementaria de novo utilizando una ADN polimerasa con un cebador apropiado.

Los términos “polipéptido” y “proteína” se utilizan indistintamente para referirse a un polímero de restos de aminoácidos, y no están limitados a una longitud mínima. Tales polímeros de restos de aminoácidos pueden contener restos de aminoácidos naturales o no naturales, e incluyen, pero no se limitan a, péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros, y multímeros de restos de aminoácidos. Tanto las proteínas completas como sus fragmentos están incluidos en la definición. Los términos también incluyen modificaciones post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación, y similares. Además, para los fines de la presente invención, un “polipéptido” se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones, y sustituciones (generalmente conservativas en la naturaleza), de la secuencia nativa, con tal que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo a través de mutagénesis dirigida al sitio, o puede ser accidental, por ejemplo a través de mutaciones de anfitriones que producen las proteínas o de errores debidos a la amplificación mediante PCR.

A “vector viral recombinante” se refiere a un vector polinucleotídico recombinante que comprende una o más secuencias heterólogas (es decir, secuencia de ácido nucleico de origen no viral). En el caso de los vectores de AAV recombinantes, el ácido nucleico recombinante está flanqueado por al menos una y en realizaciones dos, secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR).

Un “vector de AAV recombinante (vector de rAAV)” se refiere a un vector polionucleotídico que comprende una o más secuencias heterólogas (es decir, secuencia de ácido nucleico que no tiene su origen en AAV) que están flanqueadas por al menos una, y en realizaciones dos, secuencias de AAV de repeticiones terminales invertidas (ITR). Tales vectores de rAAV pueden replicarse y empaquetarse en partículas virales infecciosas cuando están presentes en una célula anfitriona que ha sido infectada con un virus auxiliar adecuado (o que está expresando funciones auxiliares adecuadas) y que está expresando los productos génicos rep y cap de AAV (es decir proteínas Rep y Cap de AAV). Cuando un vector de rAAV se incorpora a un polinucleótido más grande (p. ej., en un cromosoma o en otro vector tal como un plásmido utilizado para la clonación o transfección), el vector de rAAV puede ser referido como un “pro-vector” que puede ser “rescatado” mediante replicación y encapsidación en presencia de las funciones de empaquetamiento de AAV y de las funciones

auxiliares adecuadas. Un vector de rAAV puede estar en cualquiera de diversas formas, incluyendo, pero no limitadas a, plásmidos, cromosomas artificiales lineales, formando complejos con lípidos, encapsulados dentro de liposomas, y encapsidados en una partícula viral, particularmente en una partícula de AAV. Un vector de rAAV puede ser empaquetado en una cápside de virus AAV para generar una “partícula viral adeno-asociada recombinante (la partícula de rAAV)”.

Un “vector adenoviral recombinante” se refiere a un vector polionucleotídico que comprende una o más secuencias heterólogas (es decir, secuencia de ácido nucleico que no tiene su origen en adenovirus) que están flanqueadas por al menos una secuencia de repetición terminal invertida de adenovirus (ITR). En algunas realizaciones, el ácido nucleico recombinante está flanqueado por dos secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR). Tales vectores virales recombinantes se pueden replica y empaquetar en partículas virales infecciosas cuando están presentes en una célula anfitriona que está expresando genes de adenovirus esenciales suprimidos del genoma viral recombinante (p. ej., genes E1, genes E2, genes E4, etc.). Cuando un vector viral recombinante es incorporado a un polinucleótido más grande (p. ej., en un cromosoma o en otro vector tal como un plásmido utilizado para la clonación o transfección), el vector viral recombinante puede ser referido como “pro-vector” que puede ser “rescatado” mediante replicación y encapsidación en presencia de funciones de empaquetamiento de adenovirus. Un vector viral recombinante puede estar en cualquiera de diversas formas, incluyendo, pero sin limitarse a, plásmidos, cromosomas artificiales lineales, formando complejos con lípidos, encapsulado dentro de liposomas, y encapsidado en una partícula viral, por ejemplo, una partícula de adenovirus. Un vector viral recombinante puede ser empaquetado en una cápside de virus de adenovirus para generar una “partícula adenoviral recombinante.”

Un “vector de lentivirus recombinante” se refiere a un vector polionucleotídico que comprende una o más secuencias heterólogas (es decir, secuencia de ácido nucleico que no tiene su origen en lentivirus) que están flanqueadas por al menos una secuencia de repetición terminal de lentivirus (LTR). En algunas realizaciones, el ácido nucleico recombinante está flanqueado por dos secuencia de repetición terminal lentivirales (LTR). Tales vectores virales recombinantes pueden replicarse y empaquetarse en partículas virales infecciosas cuando están presentes en una célula anfitriona que ha sido infectada con funciones auxiliares adecuadas. Un vector recombinante lentiviral puede empaquetarse en una cápside de lentivirus para generar una “partícula lentiviral recombinante”.

Un “vector de herpes simplex recombinante (vector de HSV recombinante)” se refiere a un vector polionucleotídico que comprende una o más secuencias heterólogas (es decir, secuencia de ácido nucleico que no tiene su origen en HSV) que están flanqueadas por

secuencias de repetición terminal de HSV. Tales vectores virales recombinantes pueden replicarse y empaquetarse en partículas virales infecciosas cuando están presentes en una célula anfitriona que ha sido infectada con funciones auxiliares adecuadas. Cuando un vector viral recombinante es incorporado a un polinucleótido más grande (p. ej., en un cromosoma o en otro vector tal como un plásmido utilizado para clonación o transfección), el vector viral recombinante puede ser referido como “pro-vector” que puede ser “rescatado” mediante replicación y encapsidación en presencia de las funciones de empaquetamiento de HSV. Un vector viral recombinante puede estar en cualquiera de diversas formas, incluyendo, pero sin limitarse a, plásmidos, cromosomas artificiales lineales, formando complejos con lípidos, encapsulado dentro de liposomas, y encapsidado en una partícula viral, por ejemplo, una partícula de HSV. Un vector viral recombinante puede empaquetarse en una cápside de HSV para generar una “partícula viral de herpes simplex recombinante”.

“Heterólogo” significa derivado de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad con la que se compara o en la que se ha introducido o incorporado. Por ejemplo, un polinucleótido introducido mediante técnicas de ingeniería genética en un tipo de célula diferente es un polinucleótido heterólogo (y, cuando se expresa, puede codificar un polipéptido heterólogo). De un modo similar, a una secuencia celular (p. ej., un gene o porción del mismo) que es incorporada a un vector viral es una secuencia de nucleótidos heteróloga con respecto al vector.

El término “transgén” se refiere a un polinucleótido que se introduce en una célula y es susceptible de ser transcrito un ARN y opcionalmente, traducido y/o expresado en condiciones apropiadas. En un aspecto, confiere una propiedad deseada a una célula en la que se ha introducido, o conduce de otra manera a un resultado terapéutico o diagnóstico. En otro aspecto, puede ser transcrito a una molécula que media la interferencia por ARN, tal como miARN, ARNip, o ARNhc.

El “promotor de la β -actina de pollo (CBA)” se refiere a una secuencia de polinucleótido derivada de un gen de β -actina de pollo (p. ej., beta actina de *Gallus gallus*, representado por GenBank Entrez Gene ID 396526). Según se utiliza en la presente memoria, “promotor de β -actina de pollo” puede referirse a un promotor que contiene un elemento potenciador temprano de citomegalovirus (CMV), el promotor y el primer exón e intrón del gen de la β -actina de pollo, y el acceptor de corte y empalme del gen de la beta-globina de conejo, tales como las secuencias descritas por Miyazaki, J. et al. (1989) en Gene 79(2):269-77. Según se utiliza en la presente memoria, el término “promotor de CAG” se puede utilizar indistintamente. Según se utiliza en la presente memoria, los términos “potenciador temprano de CMV/promotor de beta actina de pollo (CAG)” se pueden utilizar indistintamente.

Los términos “partículas genómicas (gp)”, “equivalentes genómicos”, o “copias genómicas” según se utiliza en referencia a un título viral, se refiere al número de viriones que contiene el genoma de ADN de AAV recombinante, con independencia de su infectividad o funcionalidad. El número de partículas genómicas en una preparación de vector concreta se puede medir mediante procedimientos tales como los descritos en los Ejemplos en la presente memoria, o por ejemplo, por Clark et al. (1999) en Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) Mol. Ther., 6:272-278.

El término “genoma del vector (gv)” según se utiliza en la presente memoria puede referirse a uno o más polinucleótidos que comprenden un conjunto de secuencias de polinucleótidos de un vector, p. ej., un vector viral. Un genoma de vector puede ser encapsidado en una partícula viral. Dependiendo del vector viral concreto, un genoma de vector puede comprender ADN de cadena sencilla, ADN de doble cadena, o ARN de cadena sencilla, o ARN de doble cadena. Un genoma de vector puede incluir secuencias endógenas asociadas con un vector viral concreto y/o secuencias heterólogas cualesquiera insertadas en un vector viral concreto a través de técnicas recombinantes. Por ejemplo, un genoma de vector de AAV recombinante puede incluir al menos una secuencia ITR que flanquea un promotor, un relleno, una secuencia de interés (p. ej., un ARNi), y una secuencia de poliadenilación. Un genoma de vector completo puede incluir un conjunto completo de las secuencias de polinucleótidos de un vector. En algunas realizaciones, el título de ácido nucleico de un vector viral se puede medir en términos de vg/mL. Los métodos adecuados para la medición de este título son conocidos en la técnica (p. ej., PCR cuantitativa).

Según se utiliza en la presente memoria, el término “inhibir” puede referirse al acto de bloquear, reducir, eliminar, o suscitar antagonismo sobre la presencia, o una actividad de, una diana concreta. La inhibición puede referirse a la inhibición parcial o a la inhibición completa. Por ejemplo, que inhibe la expresión de un gene puede referirse a cualquier acto que conduzca a un bloqueo, reducción, eliminación, o cualquier otro antagonismo de la expresión del gen, incluyendo reducción de la abundancia de ARNm (p. ej., silenciando la transcripción de ARNm), degradación de ARNm, inhibición de la traducción de ARNm, etcétera. En algunas realizaciones, que inhibe la expresión de HTT puede referirse a bloqueo, reducción, eliminación, o cualquier otro antagonismo de la expresión de HTT, incluyendo reducción de la abundancia de ARNm de HTT (p. ej., silenciando la transcripción de ARNm de HTT), degradación de ARNm de HTT, inhibición de la traducción del ARNm de HTT, etcétera. Como otro ejemplo, que inhibe la acumulación de una proteína en una célula puede referirse a cualquier acto que conduzca a un bloqueo, reducción, eliminación, u otro antagonismo de la expresión de la proteína, incluyendo reducción de la abundancia de ARNm (p. ej., silenciamiento de la transcripción de ARNm), degradación de ARNm,

inhibición de la traducción de ARNm, degradación de la proteína, etcétera. En algunas realizaciones, que inhibe la acumulación de proteína HTT en una célula se refiere a una bloqueo, reducción, eliminación, u otro antagonismo de la expresión de la proteína HTT en una célula, incluyendo reducción de la abundancia de ARNm de HTT (p. ej., silenciamiento de la transcripción de ARNm de HTT), degradación de ARNm de HTT, inhibición de la traducción de ARNm de HTT, degradación de la proteína HTT, etcétera.

Los términos “unidad de infección (iu)”, “partícula infecciosa”, o “unidad de replicación”, según se utiliza en referencia a un título viral, se refiere al número de partículas de vector de AAV recombinante infecciosas y de replicación competente medida mediante el análisis del centro infeccioso, también conocido como el análisis de centro de replicación, como describen, por ejemplo, McLaughlin et al. (1988) en J. Virol., 62:1963-1973.

El término “unidad de transducción (ut)” según se utiliza en referencia a un título viral, se refiere al número de partículas infecciosas de vector de AAV recombinante que dan como resultado la producción de un producto de transgén funcional medido en análisis funcionales tales como los descritos en los Ejemplos de la presente memoria, o por ejemplo, por Xiao et al. (1997) en Exp. Neurobiol., 144:113-124; o por Fisher et al. (1996) en J. Virol., 70:520-532 (análisis LFU).

Una secuencia de “repetición terminal invertida” o “ITR” es un término bien entendido en la técnica y se refiere a secuencias relativamente cortas encontradas en los extremos de los genomas virales que están en orientación opuesta.

Una secuencia de “repetición terminal invertida (ITR) de AAV”, un término bien entendido en la técnica, es una secuencia de aproximadamente 145 nucleótidos que está presente en ambos extremos de un genoma de AAV de cadena sencilla nativo. Los 125 nucleótidos más extremos de la ITR pueden estar presentes en cualquiera de dos orientaciones alternativas, conduciendo a heterogeneidad entre diferentes genomas de AAV y entre los dos extremos de un genoma de AAV sencillo. Los 125 nucleótidos más extremos también contienen varias regiones más cortas de auto-complementariedad (denominadas regiones A, A', B, B', C, C' y D), que permiten que aparezcan emparejamientos de bases intrahebra dentro de esta porción de la ITR.

Una “secuencia de resolución terminal” o “trs” es una secuencia en la región D de la ITR de AAV que es escindida por proteínas rep de AAV durante la replicación de ADN viral. Una secuencia de resolución terminal mutante es refractaria a la escisión mediante proteínas rep de AAV.

Las “funciones auxiliares de AAV” se refieren a funciones que permiten que AAV sea replicado y empaquetado por una célula anfitriona. Las funciones auxiliares de AAV pueden ser proporcionadas en cualquiera de diversas formas, incluyendo, pero sin limitarse

a, virus auxiliares o genes de virus auxiliares que ayudan a la replicación y empaquetamiento de AAV. Otras funciones auxiliares de AAV son conocidas en la técnica tales como agentes genotóxicos.

Un “virus auxiliar” para AAV se refiere a un virus que permite que AAV (que es un parvovirus defectuoso) sea replicado y empaquetado por una célula anfitriona. Un virus auxiliar proporciona "funciones auxiliares" que permiten la replicación de AAV. Se han identificado varios de tales virus auxiliares, incluyendo adenovirus, herpesvirus y, poxvirus tales como vaccinia y baculovirus. El adenovirus abarca varios subgrupos diferentes, el tipo 5 de Adenovirus del subgrupo C (Ad5) es el más comúnmente utilizado. Numerosos adenovirus de origen humano, de mamífero no humano y de aves son conocidos y están disponibles de depósitos tales como la ATCC. Los virus de la familia del herpes, que también están disponibles de depósitos tales como la ATCC, incluyen, por ejemplo, virus herpes simplex (HSV), virus Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV) y virus de la pseudorabia (PRV). Los ejemplos de las funciones auxiliares de los adenovirus para la replicación de AAV incluyen funciones E1A, funciones E1B, funciones E2A, funciones VA y funciones E4orf6. Los baculovirus disponibles de depósitos incluyen el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*.

Se dice que una preparación de rAAV está “sustancialmente libre” de virus auxiliar si la razón de partículas de AAV infecciosas con respecto a las partículas de virus auxiliar infecciosas es al menos aproximadamente 102:1; al menos aproximadamente 104:1, al menos aproximadamente 106:1; o al menos aproximadamente 108:1 o más. En algunas realizaciones, las preparaciones también están libres de cantidades equivalentes de proteínas de virus auxiliar (es decir, proteínas que podrían estar presentes como resultado de tal nivel de virus auxiliar si las impurezas de las partículas de virus auxiliar observadas anteriormente estuvieran presentes en forma desorganizada). La contaminación por proteínas virales y/o celulares puede ser observada generalmente como la presencia de bandas de tinción de Coomassie sobre geles de SDS (p. ej., la aparición de bandas distintas de las correspondientes a las proteínas de la cápside de AAV VP1, VP2 y VP3).

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia” con respecto a un polipéptido o secuencia de ácido nucleico de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos o nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos o nucleótidos en el polipéptido o secuencia de ácido nucleico de referencia, después de alinear la secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar sustituciones conservativas cualesquiera como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determina el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico se

puede lograr de varias manera que se encuentran dentro del conocimiento práctico de la técnica, por ejemplo, utilizando programas de soporte lógico para ordenador disponibles al público, por ejemplo, aquellos descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1987), Supp. 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1, e incluyendo soporte lógico

5 BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (ADNSTAR). Un programa de alineamiento preferido ALIGN Plus (Scientific adn Educational Software, Pennsylvania). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para la medición del alineamiento, incluyendo algoritmos necesarios cualesquiera para lograr el alineamiento máximo a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se estén comparando. Para los fines de la presente

10 memoria, el % de identidad de secuencia de aminoácido de una secuencia de aminoácidos A dada, con, o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que puede ser formulada alternativamente como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto, con, o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue: 100 veces la fracción X/Y, donde

15 X es el número de restos de aminoácidos puntuado como emparejamientos idénticos por el programa de alineamiento de secuencia en ese alineamiento del programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos A con respecto a B no será igual al % de

20 identidad de la secuencia de aminoácidos B con respecto a A. Para los fines de la presente memoria, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico C dada con respecto, con, o frente a una secuencia de ácido nucleico D dada (que puede ser formulada alternativamente como una secuencia de ácido nucleico C dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de ácido nucleico con respecto,

25 con, o frente a una secuencia de ácido nucleico D dada) se calcula como sigue: 100 veces la fracción W/Z, donde W es el número de nucleótidos puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineamiento de secuencia en ese alineamiento del programas de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de la secuencia de

30 ácido nucleico D, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C con respecto a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D con respecto a C.

Una molécula "aislada" (p. ej., ácido nucleico o proteína) o célula significa que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos

35 o deseados, incluyendo resultados clínicos (p. ej., mejora de los síntomas, consecución de criterios de valoración clínicos, y similares). Una cantidad eficaz puede ser administrada en

una o más administraciones. En términos de un estado de enfermedad, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para mejorar, estabilizar, o retrasar el desarrollo de una enfermedad.

Un “individuo” o “sujeto” es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (p. ej., vacas, ovejas, gatos, perros, y caballos), primates (p. ej., primates humanos y no humanos tales como monos), conejos, y roedores (p. ej., ratones y ratas). En ciertas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

Según se utiliza en la presente memoria, “tratamiento” es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución del alcance de la enfermedad, estabilización (p. ej. no empeoramiento) del estado de enfermedad, prevención de la diseminación (p. ej., metástasis) de la enfermedad, retraso o ralentización del progreso de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y remisión (parcial o total), detectable o indetectable. “Tratamiento” también puede significar prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “tratamiento profiláctico” se refiere a tratamiento, en donde se sabe o se sospecha que un individuo tiene o está en riesgo de tener un trastorno pero no ha presentado síntomas o ha presentado síntomas mínimos del trastorno. Un individuo que experimenta tratamiento profiláctico puede ser tratado antes del comienzo de los síntomas.

“Enfermedad de Huntington (EH)” se refiere al trastorno cerebral progresivo causado típicamente por mutaciones en el gen HTT (aka huntingtina, EH o IT15). Puede estar caracterizada por síntomas que incluyen movimientos anómalos (denominados corea), pérdida gradual de función motora, dolencias emocionales o psiquiátricas, y deterioro progresivo de la cognición. Si bien la mayoría de los síntomas aparecen entre los 30 y los 40 años, también se han observado formas juveniles de la enfermedad. Para una descripción adicional de la EH, véase la Entrada Núm. 143100 de la OMIM.

“Huntingtina (HTT)” puede referirse o bien al gen o bien a un producto polipeptídico asociado con la mayoría de los casos de enfermedad de Huntington. La función normal de la huntingtina no se comprende completamente. Sin embargo, se sabe que mutaciones en el gen de la huntingtina causan EH. Estas mutaciones son heredadas típicamente de una manera dominante autosómica e implican la expansión de repeticiones de trinucleótido CAG en el gen HTT, que conducen a una sección de poliglutamina (poliQ) en la proteína Htt.

Según se utiliza en la presente memoria, un “ARNi” puede referirse a cualquier molécula de ARN que induce interferencia por ARN en una célula. Los ejemplos de los

ARNi incluyen sin limitación ARN inhibidores pequeños (ARNip), microARN (miARN), y ARN de horquilla corta (ARNhc).

El “armazón de miARN” puede referirse a un polinucleótido que contiene (i) una secuencia de doble cadena que se dirige a un gen de interés para reducir la expresión mediante ARNi y (ii) secuencias adicionales que forman una estructura de tallo-bucle que se parece a la de los miARN endógenos. Una secuencia que se dirige a un gen de interés para el ARNi (p. ej., una secuencia corta, ~20-nt) se puede ligar a secuencias que crean un tallo-bucle de tipo miARN - y una secuencia que empareja las bases con la secuencia de interés para formar un dúplex cuando el polinucleótido se ensambla a la estructura secundaria de tipo miARN. Como se describe en la presente memoria, este dúplex puede hibridar imperfectamente, p. ej., puede contener una o más bases no emparejadas o emparejadas erróneamente. Después de la escisión de este polinucleótido mediante Dicer, este dúplex que contiene la secuencia que se dirige a un gen de interés se puede desenrollar e incorporar al complejo RISC. Un armazón de miARN puede referirse al propio miARN o a un polinucleótido de ADN que codifica el miARN. Un ejemplo de un armazón de miARN es la secuencia miR-155 (Lagos-Quintana, M. et al. (2002) Curr. Biol. 12:735-9). Los kits asequibles comercialmente para la clonación de una secuencia en un armazón de miARN son conocidos en la técnica (p. ej., el kit del vector de expresión de ARNi Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR de Life Technologies, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA).

Según se utiliza en la presente memoria, una “protuberancia” se refiere a una región de ácido nucleico que no es complementaria a un ácido nucleico opuesto a ella en un dúplex de ácido nucleico. Por ejemplo, una protuberancia puede referirse a una secuencia de ácido nucleico que no es complementaria a un ácido nucleico opuesto en un dúplex de ácido nucleico donde la protuberancia está flanqueada por regiones de ácido nucleico que son complementarias a un ácido nucleico opuesto en un dúplex de ácido nucleico. En algunos ejemplos, la protuberancia puede tener cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10 o más de 10 bases de longitud. En algunos ejemplos, la protuberancia puede ser el resultado de emparejamiento erróneo (p. ej., la cadena opuesta contiene una base que no es complementaria) o la protuberancia puede ser el resultado de no emparejamiento (p. ej., la cadena opuesta comprende ácido nucleico complementario al ácido nucleico que flanquea la protuberancia pero la cadena opuesta no contiene ácido nucleico opuesto a la protuberancia).

Según se utiliza en la presente memoria, el término ácido nucleico “efector” es un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica todo o una parte de un transgén. En algunos ejemplos, el ARNm para un transgén es un ácido nucleico efector.

Según se utiliza en la presente memoria, ácido nucleico “antisentido” es una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a un ácido nucleico “efector”. Por

ejemplo, un ácido nucleico antisentido puede ser complementario a un ARNm que codifica un transgén.

Según se utiliza en la presente memoria, la “región guía” de un ARNi es la cadena del ARNi que se une al ARNm diana, típicamente sobre la base de la complementariedad. La
5 región de complementariedad puede abarcar toda o una porción de la región guía. Típicamente, la región de complementariedad incluye al menos la región semilla. En muchos casos, la región antisentido de un ARNi es la región guía.

Según se utiliza en la presente memoria, la “región pasajera”, o “región no guía”, utilizadas indistintamente en la presente memoria, de un ARNi es la región del ARNi que es
10 complementaria a la región guía. En muchos casos, la región efectora de un ARNi es la región pasajera.

Según se utiliza en la presente memoria, la “región semilla” de un ARNi (p. ej., miARN) es una región de aproximadamente 1-8 nucleótidos de longitud de un microARN. En algunos ejemplos, la región semilla y la 3'-UTR de su ARNm diana pueden ser un
15 determinante clave en el reconocimiento del ARNi.

Según se utiliza en la presente memoria, “silenciamiento génico inespecífico” se refiere al emparejamiento de una región semilla de un ARNi con secuencias en las 3'-UTR de los ARNm no deseados y dirige la represión traduccional y la destabilización de esos transcritos (p. ej., reduce la expresión de los ARNm no deseados).

La referencia a “aproximadamente” un valor o parámetro en la presente memoria incluye (y describe) realizaciones que se dirigen a ese valor o parámetro per se. Por ejemplo, la descripción referente a “aproximadamente X” incluye la descripción de “X”.

Según se utiliza en la presente memoria, las formas en singular de los artículos “un”, “uno”, “una”, “el” y “la” incluyen las referencias plurales a no ser que se indique lo
25 contrario.

Se entiende que los aspectos y realizaciones de la invención descrita en la presente memoria incluyen “que comprende”, “que consiste”, y/o “que consiste esencialmente en” aspectos y realizaciones.

III. ARNi

En algunos aspectos, la invención proporciona ARNi mejorado. En algunas realizaciones, el ARNi es un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un micro ARN (miARN), o un ARN en horquilla corta (ARNhc). Un ARN inhibidor o de interferencia pequeño (ARNip) es conocido en la técnica como una molécula de ARN de doble cadena de aproximadamente
30 19-25 (p. ej., 19-23) pares de bases de longitud que induce ARNi en una célula. Un ARN en horquilla corta (ARNhc) es conocido en la técnica como una molécula de ARN que
35 comprende aproximadamente 19-25 (p. ej., 19-23) pares de bases de ARN de doble cadena

conectado mediante un bucle corto (p. ej., ~4-11 nucleótidos) que induce ARNi en una célula.

Un microARN (miARN) es conocido en la técnica como una molécula de ARN que induce ARNi en una célula que comprende una secuencia corta (p. ej., 19-25 pares de bases) de ARN de doble cadena conectado mediante un bucle y que contiene una o más secuencias de ARN de doble cadena adicionales que comprenden una o más protuberancias (p. ej., pares de bases emparejados erróneamente o no emparejados). Según se utiliza en la presente memoria, el término “miARN” abarca miARN endógenos así como miARN exógenos o heterólogos. En algunas realizaciones, “miARN” puede referirse a un pri-miARN o un pre-miARN. Durante el procesamiento del miARN, se produce un transcrito de pri-miARN. El pri-miARN es procesado por Drosha-DGCR8 para producir un pre-miARN mediante escisión de una o más secuencias para dejar un pre-miARN con una región flanqueante 5', una cadena guía, una región bucle, una cadena no guía, y una región flanqueante 3'; o una región flanqueante 5', una cadena no guía, una región bucle, una cadena guía, y una región flanqueante 3'. El pre-miARN es exportado a continuación al citoplasma y procesado mediante Dicer para producir un ARNip con una cadena guía y una cadena no guía (o pasajera). La cadena guía es utilizada a continuación por el complejo RISC para catalizar el silenciamiento génico, p. ej. mediante el reconocimiento de una secuencia de ARN diana complementaria a la cadena guía. Una descripción adicional de miARN se puede encontrar, p. ej., en el documento WO 2008/150897. El reconocimiento de una secuencia diana por un miARN es determinada principalmente por el emparejamiento entre la diana y la secuencia semilla del miARN, p. ej., nucleótidos 1-8 (5' a 3') de la cadena guía (véase, p. ej., Boudreau, R.L. et al. (2013) *Nucleic Acids Res.* 41:e9).

En la estructura pri/pre-miARN, se forma la interfaz de cadena guía:cadena no guía en un dúplex en parte a través del emparejamiento de bases complementarias (p. ej., emparejamiento de bases de Watson-Crick). Sin embargo, en algunas realizaciones, este emparejamiento de bases complementarias no se extiende a lo largo de todo el dúplex. En algunas realizaciones, puede existir una protuberancia en la interfaz en una o más posiciones de nucleótidos. Según se utiliza en la presente memoria, el término "protuberancia" puede referirse a una región de ácido nucleico que no es complementaria al ácido nucleico opuesto a ella en un dúplex. En algunas realizaciones, la protuberancia se forma cuando las regiones de los ácidos nucleicos complementarios se unen entre sí, mientras que la regiones de la región no complementaria central no se unen. En algunas realizaciones, la protuberancia se forma cuando las dos cadenas de ácido nucleico situadas entre las dos regiones complementarias tienen diferentes longitudes. Como se describe a continuación, una protuberancia puede tener 1 o más nucleótidos.

Durante el procesamiento del miARN, el miARN es escindido en un sitio de escisión adyacente a la interfaz de cadena guía:cadena no guía, liberando de este modo el dúplex de ARNip de las cadenas guía y no guía. En algunas realizaciones, el miARN comprende una protuberancia en la cadena efectora o antisentido adyacente al sitio de escisión. para decirlo
5 de otro modo, en algunas realizaciones, el miARN comprende una protuberancia en la cadena guía o no guía adyacente a la secuencia semilla. Una protuberancia en esta posición es indicada por una flecha en la realización ilustrativa mostrada en la FIG. 9B.

En algunas realizaciones, el miARN comprende una protuberancia en la cadena guía opuesta al sitio de escisión 5' de la cadena no guía madura. En algunas realizaciones, el
10 miARN comprende una protuberancia opuesta al nucleótido 5' de la cadena no guía. En algunas realizaciones, el miARN comprende una protuberancia en la cadena efectora opuesta al sitio de escisión 3' de la cadena guía madura. En algunas realizaciones, el miARN comprende una protuberancia opuesta al nucleótido 3' de la cadena guía.

En algunas realizaciones, el ARNi comprende una primera cadena y una segunda
15 cadena, en donde a) la primera cadena y la segunda forman un dúplex; b) la primera cadena comprende una región guía de al menos 11 bases, en donde la región guía comprende una región semilla que comprende las bases 1-N de la cadena guía, en donde $N=7$ o $N=8$; y c) la segunda cadena comprende una región no guía de al menos 11 bases, en donde la región no guía comprende una secuencia de la protuberancia opuesta a una cualquiera o más de las
20 bases 1-(N+2) de la región guía en el dúplex. En algunas realizaciones, $N=7$ y la protuberancia es la base opuesta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 de la región guía. En otras realizaciones, $N=8$ y la protuberancia es la base opuesta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 de la región guía.

En algunas realizaciones, el ARNi comprende una primera cadena y una segunda
25 cadena, en donde a) la primera cadena y la segunda forman un dúplex; b) la primera cadena comprende una región guía de al menos 10 bases, en donde la región guía comprende una región semilla que comprende las bases 1-N de la cadena guía, en donde $N=7$ o $N=8$; y c) la segunda cadena comprende una región no guía de al menos 10 bases, en donde la región no guía comprende una secuencia de la protuberancia opuesta a una cualquiera o más de las
30 bases 1-(N+1) de la región guía en el dúplex. En algunas realizaciones, en donde $N=7$ y la protuberancia es la base opuesta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de la región guía. En otras realizaciones, $N=8$ y la protuberancia es la base opuesta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 de la región guía.

En algunas realizaciones, la región no guía comprende una secuencia de la
35 protuberancia opuesta a una cualquiera o más de las bases 1-N de la región guía en el dúplex. En algunas realizaciones, $N=7$ y la protuberancia es la base opuesta 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de la

región guía. En otras realizaciones, N=8 y la protuberancia es la base opuesta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de la región guía.

En algunas realizaciones, el ARNi comprende una primera cadena y una segunda cadena, en donde a) la primera cadena y la segunda forman un dúplex, b) la primera cadena
5 comprende una región guía de al menos 9 bases, en donde la región guía comprende una región semilla que comprende las bases 2-7 o 2-8 de la cadena guía, y c) la segunda cadena comprende una región no guía de al menos 9 bases, en donde la región no guía comprende una secuencia de la protuberancia opuesta a base 1 o base 9 de la región guía en el dúplex.

En algunas realizaciones, el ARNi comprende una primera cadena y una segunda
10 cadena, en donde a) la primera cadena y la segunda forman un dúplex, b) la primera cadena comprende una región guía de al menos 9 bases, en donde la región guía comprende una región semilla que comprende las bases 2-7 o 2-8 de la cadena guía, y c) la segunda cadena comprende una región no guía de al menos 9 bases, en donde la región no guía comprende una secuencia de la protuberancia opuesta a base 1 de la región guía en el dúplex.

En algunas realizaciones, la protuberancia se forma mediante una o más bases de la
15 cadena no guía en el dúplex que carece de una base complementaria en la región guía, en donde la protuberancia está flanqueada por bases que no experimentan emparejamiento de bases con la cadena guía. En algunas realizaciones, la secuencia de la protuberancia tiene aproximadamente 1-10 nucleótidos. En algunas realizaciones, la secuencia de la
20 protuberancia tiene aproximadamente 2-15 nucleótidos. En algunas realizaciones, la secuencia de la protuberancia tiene aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, o
25 aproximadamente 15 nucleótidos.

La seguridad de las terapias basadas en ARNi puede ser dificultada por la capacidad de los ARN inhibidores pequeños (ARNip) para unirse a ARNm no deseados y reducir su expresión, un efecto conocido como silenciamiento génico inespecífico. La inespecificidad se produce principalmente cuando la región semilla (nucleótidos 2-8 del ARN pequeño) se
30 empareja con secuencias en 3'-UTR de ARNm no deseados y dirige la represión traduccional y la destabilización de esos transcritos. Se puede diseñar un ARNi de inespecificidad reducida sustituyendo bases dentro de las secuencias guía y no guía; p. ej., creando motivos CpG. Las sustituciones potenciales que pueden dar como resultado una puntuación inespecífica significativamente inferior se puede evaluar utilizando el algoritmo SiSPOTR,
35 un algoritmo de diseño de ARNip enfocado a la especificidad que identifica secuencias candidatas con potenciales inespecíficos mínimos y potentes capacidades de silenciamiento

(Boudreau et al, Nucleic Acids Res. 2013 Jan; 41(1) e9. Una puntuación SiSPOTR reducida pronostica secuencias que tienen un número inferior de inespecificidades humanas potenciales en comparación con las moléculas ARNi parentales. En algunas realizaciones de la invención, el ARNi es mejorado para reducir el silenciamiento génico inespecífico. En algunas realizaciones, el ARNi comprende uno o más motivos CpG. En algunas realizaciones, el ARNi comprende uno o más motivos CpG en una región semilla.

En algunas realizaciones, la primera cadena y la segunda cadena están conectadas por medio de un ARN (p. ej., un conector de ARN) capaz de formar una estructura de bucle. Como es comúnmente conocido en la técnica, una estructura de bucle de ARN (p. ej., un tallo-bucle u horquilla) se forma cuando una molécula de ARN comprende dos secuencias de ARN que emparejan las bases entre sí separadas por una secuencia de ARN que no empareja las bases entre sí. Por ejemplo, se puede formar una estructura de bucle en la molécula de ARN A-B-C si las secuencias A y C son complementarias o parcialmente complementarias de manera que sus bases se emparejan entre sí, pero las bases en la secuencia B no se emparejan entre sí.

En algunas realizaciones, el ARN capaz de formar una estructura de bucle comprende de 4 a 50 nucleótidos. En ciertas realizaciones, el ARN capaz de formar una estructura de bucle comprende 13 nucleótidos. En algunas realizaciones, el número de nucleótidos en el ARN capaz de formar un bucle es de 4 a 50 nucleótidos o cualquier número entero entre ellos. En algunas realizaciones, de 0 a 50% del bucle puede ser complementario a otra porción del bucle. Según se utiliza en la presente memoria, el término “estructura de bucle” es una secuencia que une dos cadenas de ácido nucleico complementarias. En algunas realizaciones, 1-3 nucleótidos de la estructura de bucle son contiguos a las cadenas de ácido nucleico complementarias y pueden ser complementarios a 1-3 nucleótidos de la porción distal de la estructura de bucle. Por ejemplo, los tres nucleótidos del extremo 5' de la estructura de bucle pueden ser complementarios a los tres nucleótidos del extremo 3' de la estructura de bucle.

En algunas realizaciones, ácido nucleico que codifica un ARNi de la presente descripción comprende un almacén de miARN heterólogo. En algunas realizaciones, el uso de un almacén de miARN heterólogo se utiliza para modular la expresión del miARN; por ejemplo, para incrementar la expresión del miARN o para disminuir la expresión del miARN. Se puede utilizar cualquier almacén de miARN conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el almacén de miARN deriva de un almacén de miR-155 (véanse, p. ej., Lagos-Quintana, M. et al. (2002) Curr. Biol. 12:735-9 y el kit del vector de expresión de ARNi Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR de Life Technologies, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA).

IV. Enfermedad de Huntington y modelos experimentales de la misma

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa heredada causada por una expansión de la repetición CAG en el exón 1 del gen de la huntingtina (HTT). La extensión resultante de la sección de poliglutamina en la región N-terminal
5 confiere una ganancia de función tóxica a la proteína huntingtina mutante (mHtt). La toxicidad de la mHtt puede aparecer por la formación de agregados que contienen mHtt insoluble, desregulación transcripcional, y perturbaciones en la homeostasis de proteínas, todas las cuales puede conducir a muerte neuronal (Saudou et al. (1998) Cell, 95:55-66; Zuccato et al. (2003) Nat. Genet. 35:76-83; Schaffar et al. (2004) Mol. Cell. 15:95-105;
10 Benn et al., (2008) J. Neurosci. 28:10720-10733). Los hallazgos patológicos en pacientes con EH incluyen adelgazamiento cortical y una llamativa pérdida progresiva de neuronas estriales (Rosas et al., (2002) Neurology 58:695-701). El comienzo de la enfermedad se produce típicamente durante la tercera o cuarta década de vida; los síntomas incluyen movimientos coreiformes, deterioro de coordinación, demencia progresiva, y otros
15 desórdenes psiquiátricos (Vonsattel et al., (1985) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 44:559-577). En la mayoría de los casos, los síntomas comienzan a aparecer entre los 30 y 40 años de edad con sutiles alteraciones en las capacidades motoras, la cognición, y la personalidad. A lo largo del tiempo, estas progresan a movimientos espasmódicos, incontrolables y pérdida de control muscular, demencia, y dolencias psiquiátricas tales como depresión, agresión,
20 ansiedad, y comportamientos obsesivos-compulsivos. La muerte se produce típicamente 10-15 años después del comienzo de los síntomas. Menos de 10% de los casos de EH implican una forma de comienzo juvenil de la enfermedad, caracterizada por un progreso más rápido de la enfermedad. Se cree que aproximadamente 1 de cada 10.000 estadounidenses tiene EH.

Aunque la base genética de la EH se conoce desde hace casi 20 años, las terapias
25 actuales son en gran medida paliativas y no tratan la causa subyacente de la enfermedad. Esto es debido en parte al hecho de que la etiología de esta enfermedad es compleja, observándose efectos perjudiciales en una amplia variedad de procesos celulares. Por tanto, el interés del desarrollo de fármacos se ha dirigido a tratar el desencadenante ofensivo primario, es decir, el propio gen HTT mutante.

30 La mayoría de los casos de EH están asociados con una expansión de la repetición del trinucleótido CAG en el gen HTT. El número de repeticiones de CAG en el gen HTT está intensamente correlacionado con la manifestación de EH. Por ejemplo, individuos con 35 o menos repeticiones típicamente no desarrollan EH, pero individuos con entre 27 y 35 repeticiones tienen un mayor riesgo de tener descendientes con EH. Los individuos con entre
35 36 y 40-42 repeticiones penetrancia incompleta de EH, mientras que individuos con más de 40-42 repeticiones muestran penetrancia completa. Los casos de EH de comienzo juvenil

pueden estar asociados con tamaños de repeticiones de CAG de 60 o más.

La proteína Htt expandida con poliQ que resulta de esta expansión de la repetición de CAG está asociada con agregados celulares o cuerpos de inclusión, perturbaciones de la homeostasis de proteínas, y desregulación transcripcional. Si bien estos fenotipos tóxicos pueden estar asociados con varias partes del organismo, son los que están más típicamente asociados con la muerte celular neuronal. Los pacientes de EH presentan con frecuencia adelgazamiento cortical y una llamativa pérdida progresiva de neuronas estriatales. Parece que el cuerpo estriado es la región del cerebro más vulnerable a la EH (particularmente las neuronas espinosas medianas estriatales), con observándose efectos tempranos en el putamen y el núcleo caudado. La muerte celular en las neuronas espinosas estriatales, el aumento del número de astrocitos, y la activación de la microglia se observan en los cerebros de los pacientes de EH. La EH puede afectar también ciertas regiones del hipocampo, el córtex cerebral, el tálamo, el hipotálamo, y el cerebelo.

Los enfoques propuestos para bloquear la expresión de Htt incluyen el uso de oligonucleótidos antisentido (OAS) así como ARN de interferencia (ARNi) que utiliza ARN dúplex (ARNdh) o ARN de cadena sencilla (ARNhs) modificados químicamente (Harper et al., (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:5820-5825; DiFiglia et al., (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:17204-17209; Boudreau et al., (2009b) Mol. Ther. 17:1053-1063; Drouet et al., (2009) Ann. Neurol. 65:276-285; Sah et al., (2011) J. Clin. Invest. 121:500-507; Matsui et al., (2012) Drug Discov. Today 17:443-450; Yu et al., (2012) Cell 150:895-908). Sin embargo, los obstáculos para traducir un enfoque OAS al uso clínico pueden incluir la necesidad de incorporar un dispositivo para facilitar infusiones repetidas y crónicas de OAS al SNC, y la necesidad de distribuir adecuadamente el fármaco a las regiones diana en un cerebro grande.

Para evitar estos problemas potenciales con los OAS, puede ser ventajoso el empleo de la expresión mediada por AAV de un ARNi (p. ej., ARNip), que ofrece el potencial del incremento de seguridad, el incremento de eficacia, y la eficacia de larga duración. Puesto que los pacientes de EH expresan los alelos de Htt tanto mutantes como de tipo salvaje, una mayoría del ARNip que se dirige a las secuencias degradará probablemente ambos alelos. Sin embargo, se ha demostrado que el silenciamiento de Htt no específico del alelo en ratones con EH es bien tolerado y puede proporcionar el mismo beneficio que la reducción de la Htt mutante sola (Boudreau et al., (2009b) Mol. Ther. 17:1053-1063; Drouet et al., (2009) Ann. Neurol. 65:276-285; Kordasiewicz et al., (2012) Neuron 74(6):1031-1044). por otra parte, la supresión parcial y sostenida de Htt de tipo salvaje en el putamen de primates no humanos que sigue a ARNi mediado por AAV no tiene aparentemente ningún efecto adverso, lo que sugiere que el cerebro adulto puede tolerar niveles reducidos de Htt de tipo

salvaje (McBride et al., (2011) Mol. Ther. 19:2152-2162; Grondin et al., (2012) Brain 135:1197-1209).

Se pueden utilizar modelos animales de EH para someter a ensayo estrategias terapéuticas potenciales, tales como las composiciones y métodos de la presente descripción.

5 Los modelos de ratón para la EH son conocidos en la técnica. Estos incluyen modelos de ratón con fragmentos de HTT mutante tales como los ratones con EH R6/1 y N171-82Q (Harper et al., (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:5820-5825, Rodriguez-Lebron et al., (2005) Mol. Ther. 12:618-633, Machida et al., (2006) Biochem. Biophys. Res. Commun. 343:190-197). Otro ejemplo de un modelo de EH de ratón descrito en la presente memoria es
10 el modelo de ratón YAC128. Este modelo porta un cromosoma artificial de levadura (YAC) que expresa un gen HTT humano mutante con 128 repeticiones de CAG, y los ratones YAC128 muestran una acumulación significativa y generalizada de agregados de Htt en el cuerpo estriado a los 12 meses de edad (Slow et al., (2003) Hum. Mol. Genet. 12:1555-1567, Pouladi et al., (2012) Hum. Mol. Genet. 21:2219-2232).

15 También se pueden utilizar otros modelos animales para la EH. Por ejemplo, se han descrito modelos de rata transgénica (von Horsten, S. et al. (2003) Hum. Mol. Genet. 12:617-24) y de mono rhesus (Yang, S.H. et al. (2008) Nature 453:921-4). También se conocen modelos no genéticos. Estos implican muy a menudo el uso de compuestos excitotóxicos (tales como ácido quinolínico o ácido cáinico) o toxinas mitocondriales (tales
20 como ácido 3-nitropropiónico y ácido malónico) para inducir la muerte de células neuronales estriales en roedores o primates no humanos (para más descripción y referencias, véase Ramaswamy, S. et al. (2007) ILAR J. 48:356-73).

V. Métodos para tratar la enfermedad de Huntington

En algunos aspectos, la invención proporciona métodos y composiciones para el
25 tratamiento de la enfermedad de Huntington en un mamífero que comprende administrar al mamífero una composición farmacéutica de la presente descripción (p. ej., una composición farmacéutica que comprende una partícula viral de la presente descripción). En algunos aspectos, la invención proporciona métodos y composiciones para inhibir la expresión de htt en un mamífero con la enfermedad de Huntington que comprende administrar al mamífero
30 una composición farmacéutica de la presente descripción (p. ej., una composición farmacéutica que comprende una partícula viral de la presente descripción). En algunos aspectos, la invención proporciona métodos y composiciones para inhibir la acumulación de htt en una célula de un mamífero con la enfermedad de Huntington que comprende administrar al mamífero una composición farmacéutica de la presente descripción (p. ej., una
35 composición farmacéutica que comprende una partícula viral de la presente descripción).

En algunos aspectos, la invención proporciona métodos y composiciones para

mejorar un síntoma de la EH, que comprende la administración de una cantidad eficaz de partículas virales recombinantes que comprenden un vector que codifica un ARNi de la presente descripción al cerebro de un mamífero. En algunas realizaciones, los síntomas de EH incluyen, pero no se limitan a, corea, rigidez, movimientos corporales incontrolables, pérdida de control muscular, carencia de coordinación, inquietud, movimientos oculares ralentizados, posición anormal, inestabilidad, marcha atáxica, expresión facial anormal, problemas en el habla, dificultad para masticar y/o deglutir, alteraciones del sueño, ataques convulsiones, demencia, déficits cognitivos (p. ej., disminución de las capacidades relacionadas con la planificación, el pensamiento abstracto, la flexibilidad, el aprendizaje de normas, la sensibilidad interpersonal, el autocontrol, la atención, el aprendizaje, y la memoria), depresión, ansiedad, cambios en la personalidad, agresión, comportamiento compulsivo, comportamiento obsesivo-compulsivo, hipersexualidad, psicosis, apatía, irritabilidad, pensamientos suicidas, pérdida de peso, atrofia muscular, insuficiencia cardíaca, tolerancia reducida a la glucosa, atrofia testicular, y osteoporosis.

En algunos aspectos, la invención proporciona métodos para prevenir o retrasar el progreso de la EH. La EH dominante autosómica es una enfermedad genética que puede ser genotipificada. Por ejemplo, el número de repeticiones de CAG en HTT puede ser determinado mediante calibrado de las repeticiones basado en PCR. Este tipo de diagnóstico se puede realizar en cualquier estadio de vida sometiendo a ensayo directamente jóvenes o adultos (p. ej., junto con presentación de síntomas clínicos), escrutinio prenatal o pruebas prenatales de exclusión (p. ej., mediante biopsia de vellosidades coriónicas o amniocentesis), o escrutinio de preimplantación de embriones. Como tales, los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar como tratamiento profiláctico de la EH puesto que la diagnosis se puede producir antes del comienzo de los síntomas. Por ejemplo, la EH puede ser diagnosticada mediante pruebas genéticas (pruebas prenatales, pruebas al nacer, etc.) y tratada profilácticamente (p. ej., utilizando una partícula de rAAV descrita en la presente memoria) antes del comienzo de los síntomas (p. ej., pérdida de células del CNS) para prevenir el comienzo y/o progreso de los síntomas de EH. Adicionalmente, la EH puede ser diagnosticada mediante obtención de imágenes del cerebro, observando la contracción de los núcleos caudados y/o putamen y/o ventrículos alargados. Estos síntomas, combinados con un historial familiar de EH y/o síntomas clínicos, pueden indicar EH.

Los medios para determinar la mejora de los síntomas de EH son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la Valoración Unificada de la Enfermedad de Huntington "Unified Huntington's Disease Rating Scale" (UHDRS) se puede utilizar para evaluar función motora, la función cognitiva, las anomalías del comportamiento, y la capacidad funcional (véanse, p. ej., Huntington Study Group (1996) Movement Disorders 11:136-42). Esta escala de

valoración se desarrolló par proporcionar un ensayo uniforme, comprensivo para las múltiples facetas de la patología de la enfermedad, incorporando elementos de ensayos tales como la escala gravedad de la corea de HD Activities and Daily Living Scale, Marsden y Quinn's, las escalas de Physical Disability and Independence, la escala de valoración motora de la EH (HDMRS), la escala de la capacidad funcional de la EH (HDFCS), y el examen 5 neurológico cuantificado (QNE). Otro ensayo útil para determinar la mejora de los síntomas de la EH puede incluir sin limitación la obtención de imágenes cerebrales de Montreal Cognitive Assessment, (p. ej., MRI), Category Fluency Test, Trail Making Test, Map Search, Stroop Word Reading Test, Speeded Tapping Task, y el Symbol Digit Modalities 10 Test.

En algunos aspectos de la invención, los métodos y composiciones se utilizan para el tratamiento de seres humanos con EH. Como se ha descrito anteriormente, la EH es heredada de una manera dominante autosómica y está causada por una expansión de la repetición CAG en el gen HTT. La EH de comienzo juvenil es heredada muy a menudo de la rama 15 paterna. También se han correlacionado fenotipos de tipo enfermedad de Huntington con otros loci genéticos, tales como EHL1, PRNP, EHL2, EHL3, y EHL4. Se piensa que otros loci genéticos pueden modificar la manifestación de los síntomas de EH, incluyendo mutaciones en los genes GRIN2A, GRIN2B, MSX1, GRIK2, y APOE.

En algunos aspectos, la invención proporciona un ARNi mejorado para dirigirse a 20 ARNm de htt en un mamífero con la enfermedad de Huntington. En algunas realizaciones, el ARNi comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), donde la primera cadena y la 25 segunda cadena forman un dúplex y en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 del SEQ ID NO:2 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena. Un ARNi descrito en la presente memoria (p. ej., como parte de un vector de rAAV) puede encontrar uso, entre otros, en el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

En algunas realizaciones de la invención, el ARNi es mejorado para reducir el 30 silenciamiento génico inespecífico. En algunas realizaciones, el ARNi comprende uno o más motivos CpG. En algunas realizaciones, el ARNi comprende uno o más motivos CpG en una región semilla.

En algunas realizaciones la invención proporciona métodos para el tratamiento de la enfermedad de Huntington en un mamífero que comprende administrar al mamífero un 35 ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:15) y una

segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16), en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena. En algunas realizaciones la invención proporciona métodos para inhibir la expresión de htt

5 en un mamífero con la enfermedad de Huntington que comprende administrar al mamífero un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:15) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16), en donde el resto A en el resto 18 o el

10 resto 19 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena. En algunas realizaciones la invención proporciona métodos para inhibir la acumulación de htt en una célula de un mamífero con la enfermedad de Huntington que comprende administrar al mamífero un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3'

15 (SEQ ID NO:15) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO:16), en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena. En algunas realizaciones, la primera cadena comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene más de aproximadamente cualquiera de 75%, 80%,

20 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con el SEQ ID NO:15 pero mantiene el motivo CpG. En algunas realizaciones, la segunda cadena comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene más de aproximadamente cualquiera de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con el SEQ ID NO:16 pero mantiene el motivo CpG.

25 En algunas realizaciones la invención proporciona métodos para el tratamiento de la enfermedad de Huntington en un mamífero que comprende administrar al mamífero un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-

30 ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18), en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena. En algunas realizaciones la invención proporciona métodos para inhibir la expresión de htt en un mamífero con la enfermedad de Huntington que comprende administrar al mamífero un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que

35 comprende la secuencia 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-

ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18), en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena. En algunas realizaciones la invención proporciona métodos para inhibir la acumulación de htt en una célula de un mamífero con la enfermedad de Huntington que comprende

5 administrar al mamífero un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18), en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda cadena no forman un par de bases con un

10 resto en la primera cadena. En algunas realizaciones, la primera cadena comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene más de aproximadamente cualquiera de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con el SEQ ID NO:17 pero mantiene el motivo CpG. En algunas realizaciones, la segunda cadena comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene más de aproximadamente cualquiera de 75%, 80%, 85%, 90%,

15 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con el SEQ ID NO:18 pero mantiene el motivo CpG.

En algunas realizaciones, el ARNi es un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un micro ARN (miARN), o un ARN en horquilla corta (ARNhc). Un ARN inhibidor o de interferencia (ARNip) es conocido en la técnica como una molécula de ARN de doble cadena de

20 aproximadamente 19-25 (p. ej., 19-23) pares de bases de longitud que induce ARNi en una célula. Un ARN en horquilla corta (ARNhc) es conocido en la técnica como una molécula de ARN que comprende aproximadamente 19-25 (p. ej., 19-23) pares de bases de ARN de doble cadena conectados por un bucle corto (p. ej., ~4-11 nucleótidos) que induce ARNi en una célula.

25 En algunas realizaciones, el miARN comprende una secuencia guía que es idéntica en aproximadamente 90% al SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el miARN comprende una secuencia guía que es aproximadamente idéntica en 90%, idéntica en 91%, idéntica en 92%, idéntica en 93%, idéntica en 94%, idéntica en 95%, idéntica en 96%, idéntica en 97%, idéntica en 98%, idéntica en 99%, o idéntica en 100% al SEQ ID NO:1.

30 En algunas realizaciones, el miARN comprende una secuencia no guía que es idéntica en aproximadamente 90% al SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones, el miARN comprende una secuencia no guía que es aproximadamente cualquiera de idéntica en 90%, idéntica en 91%, idéntica en 92%, idéntica en 93%, idéntica en 94%, idéntica en 95%, idéntica en 96%, idéntica en 97%, idéntica en 98%, idéntica en 99%, o idéntica en 100% al

35 SEQ ID NO:2.

En algunas realizaciones, los restos de U en los restos 11 y 12 del SEQ ID NO:1 del

primer ácido nucleico no forman un par de bases con un resto en la segunda cadena. En algunas realizaciones, el dúplex tiene entre 18 y 25 pares de bases de longitud. En algunas realizaciones, la primera y/o la segunda cadena comprenden adicionalmente una región saliente 3', una región saliente 5', o regiones salientes tanto 5' como 3'. En algunas realizaciones, la invención proporciona ARNi, así como métodos y composiciones para su uso, que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), donde la primera cadena y la segunda cadena forman un dúplex y en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 del SEQ ID NO:2 no forman un par de bases con un resto en la primera cadena y los restos de U en los restos 11 y 12 del SEQ ID NO:1 del primer ácido nucleico no forman un par de bases con un resto en la segunda cadena.

En algunas realizaciones, la primera cadena y la segunda cadena están conectadas por medio de ARN capaz de formar una estructura de bucle. Como es comúnmente conocido en la técnica, una estructura de bucle de ARN (p. ej., un tallo-bucle u horquilla) se forma cuando una molécula de ARN comprende dos secuencias de ARN que emparejan las bases entre sí separadas por una secuencia de ARN que no empareja las bases entre sí. Por ejemplo, se puede formar una estructura de bucle en la molécula de ARN A-B-C si las secuencias A y C son complementarias o parcialmente complementarias de manera que emparejan las bases entre sí, pero las bases en la secuencia B emparejan las bases entre sí.

En algunas realizaciones, el ARN capaz de formar una estructura de bucle comprende de 4 a 50 nucleótidos. En ciertas realizaciones, el ARN capaz de formar una estructura de bucle comprende 13 nucleótidos. En ciertas realizaciones, el ARN capaz de formar una estructura de bucle comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO:7. En algunas realizaciones, el genoma de vector comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente cualquiera de idéntica en 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia del SEQ ID NO:13.

En algunos aspectos, la invención proporciona métodos que comprenden administrar a un mamífero (p. ej., un mamífero con EH) un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 del SEQ ID NO:2 no forman un par de bases con un resto en la primera cadena. En algunas realizaciones, los restos de U en las posiciones 11 y 12 del SEQ ID NO:1 del primer

ácido nucleico no emparejan las bases con restos de la segunda cadena. En algunas realizaciones, el resto A en el resto 18 o el resto 19 del ID NO:2 no forman un par de bases con un resto en la primera cadena y los restos de U en las posiciones 11 y 12 del SEQ ID NO:1 del primer ácido nucleico no emparejan las bases con restos de la segunda cadena. En algunas realizaciones, a partícula viral recombinante comprende el ARNi. En algunas realizaciones, la partícula viral recombinante es una partícula de AAV que encapsida un vector de rAAV, una partícula de adenovirus que encapsida un vector adenoviral recombinante, una partícula lentiviral que encapsida un vector lentiviral recombinante o una partícula de HSV que encapsida un vector de HSV recombinante en donde el vector de rAAV, el vector adenoviral, el vector lentiviral o el vector de HSV codifica el ARNi.

En algunas realizaciones, el suministro de partículas virales recombinantes es mediante inyección de partículas virales al cerebro. En algunas realizaciones, el suministro de partículas virales recombinantes es mediante inyección de partículas virales al cuerpo estriado. La administración intraestriatal suministra partículas virales recombinantes a una zona del cerebro, el cuerpo estriado (incluyendo el putamen y el núcleo caudado), que es sumamente afectada por la EH. Además, y sin desear estar limitados por la teoría, se piensa que las partículas virales recombinantes (p. ej., partículas de rAAV) inyectadas al cuerpo estriado se pueden dispersar también (p. ej., a través de transporte retrógrado) a otras zonas del cerebro, incluyendo sin limitación zonas de proyección (p. ej., el córtex). En algunas realizaciones, las partículas virales recombinantes se suministran por medio de (p. ej., suministro potenciado mediante convección al cuerpo estriado).

En algunos aspectos, la invención proporciona métodos para el tratamiento de la enfermedad de Huntington en un mamífero que comprende administrar al mamífero la composición farmacéutica de la presente descripción. En algunos aspectos, la invención proporciona métodos para inhibir la acumulación de htt en una célula de un mamífero con la enfermedad de Huntington que comprende administrar al mamífero la composición farmacéutica de la presente descripción. En algunos aspectos, la invención proporciona métodos para inhibir la expresión de htt en un mamífero con la enfermedad de Huntington que comprende administrar al mamífero la composición farmacéutica de la presente descripción. En algunas realizaciones, la htt es una htt mutante (p. ej., una htt que comprende más de 35, más de 36, más de 37, más de 38, más de 39, más de 40, más de 41, o más de 42 repeticiones de CAG). En algunas realizaciones, también se inhibe la expresión y/o acumulación de una htt de tipo salvaje. Como se ha descrito en la presente memoria, y sin desear estar limitados por la teoría, se cree que la inhibición de la expresión y/o acumulación de htt mutante en un mamífero con EH es sumamente beneficiosa, pero la inhibición de la expresión y/o la acumulación de htt de tipo salvaje en el mismo mamífero como efecto

secundario (p. ej., de un ARNi de la presente descripción) puede ser bien tolerada (p. ej., produce pocos o ningún efecto secundario no deseados).

En algunas realizaciones, una célula comprende un vector (p. ej., un vector que comprende un constructo de expresión que codifica un ARNi de la presente descripción). En algunas realizaciones, el vector es un vector de rAAV. En algunas realizaciones, el vector es un vector adenoviral recombinante, un vector lentiviral recombinante o un vector del virus del herpes simplex (HSV) recombinante. En algunas realizaciones, la célula es una célula del sistema nervioso central (SNC).

En algunas realizaciones, la administración de una cantidad eficaz de partículas virales recombinantes que comprende un vector que codifica un ARNi de la presente descripción transduce neuronas (p. ej., neuronas estriatales, tales como neuronas espinosas) en o cerca del sitio de administración. En algunas realizaciones, se transducen más de aproximadamente cualquiera de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% o 100% de neuronas. En algunas realizaciones, se transducen de aproximadamente 5% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 50%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 75%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 50%, o aproximadamente 30% a aproximadamente 50% de las neuronas. Los métodos para identificar neuronas transducidas por partículas virales recombinantes que expresan miARN son conocidos en la técnica; por ejemplo, inmunohistoquímica, detección de ARN (p. ej., qPCR, transferencia Northern, sec. de ARN, hibridación in situ, y similares) o se puede emplear el uso de un marcador co-expresado tal como la proteína fluorescente verde potenciada para detectar la expresión.

En algunas realizaciones de la invención, los métodos comprenden la administración al cerebro de un mamífero de una cantidad eficaz de partículas virales recombinantes que comprenden un vector que codifica un ARNi de la presente descripción para el tratamiento de un mamífero, p. ej., un ser humano, con EH. En algunas realizaciones, la composición se inyecta a una o más locaciones en el cerebro para permitir la expresión de un ARNi de la presente descripción en al menos las neuronas. En algunas realizaciones, la composición se inyecta a una cualquiera de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez localizaciones en el cerebro. En algunas realizaciones, la composición se inyecta al cuerpo estriado. En algunas realizaciones, la composición se inyecta al cuerpo estriado dorsal. En algunas realizaciones, la composición se inyecta al putamen. En algunas realizaciones, la composición se inyecta al núcleo caudado. En algunas realizaciones, la composición se inyecta al putamen y al núcleo caudado.

En algunas realizaciones, las partículas virales recombinantes se administran a un

hemisferio del cerebro. En algunas realizaciones, las partículas virales recombinantes se administran a ambos hemisferios del cerebro.

En algunas realizaciones las partículas virales recombinantes se administran a más de una localización simultáneamente o sucesivamente. En algunas realizaciones, las inyecciones de partículas virales recombinantes múltiples tienen una separación de no más de una hora, dos horas, tres horas, cuatro horas, cinco horas, seis horas, nueve horas, doce horas o 24 horas.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para el tratamiento de un ser humano con EH mediante la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un vector viral recombinante que codifica un ARNi de la presente descripción para suprimir la actividad de un HTT mutante. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un vector viral recombinante que codifica un ARNi de la presente descripción para suprimir la actividad de una HTT mutante. En algunas realizaciones, el título viral de las partículas virales (p. ej., partículas de rAAV) es al menos aproximadamente cualquiera de 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 10×10^{12} , 11×10^{12} , 15×10^{12} , 20×10^{12} , 25×10^{12} , 30×10^{12} , o 50×10^{12} copias de genoma/mL. En algunas realizaciones, el título viral de las partículas virales (p. ej., partículas de rAAV) es aproximadamente cualquiera de 5×10^{12} a 6×10^{12} , 6×10^{12} a 7×10^{12} , 7×10^{12} a 8×10^{12} , 8×10^{12} a 9×10^{12} , 9×10^{12} a 10×10^{12} , 10×10^{12} a 11×10^{12} , 11×10^{12} a 15×10^{12} , 15×10^{12} a 20×10^{12} , 20×10^{12} a 25×10^{12} , 25×10^{12} a 30×10^{12} , 30×10^{12} a 50×10^{12} , o 50×10^{12} a 100×10^{12} copias de genoma/mL. En algunas realizaciones, el título viral de las partículas virales (p. ej., partículas de rAAV) es aproximadamente cualquiera de 5×10^{12} a 10×10^{12} , 10×10^{12} a 25×10^{12} , o 25×10^{12} a 50×10^{12} copias de genoma/mL. En algunas realizaciones, el título viral de las partículas virales (p. ej., partículas de rAAV) es al menos aproximadamente cualquiera de 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 10×10^9 , 11×10^9 , 15×10^9 , 20×10^9 , 25×10^9 , 30×10^9 , o 50×10^9 unidades de transducción/mL. En algunas realizaciones, el título viral de las partículas virales (p. ej., partículas de rAAV) es aproximadamente cualquiera de 5×10^9 a 6×10^9 , 6×10^9 a 7×10^9 , 7×10^9 a 8×10^9 , 8×10^9 a 9×10^9 , 9×10^9 a 10×10^9 , 10×10^9 a 11×10^9 , 11×10^9 a 15×10^9 , 15×10^9 a 20×10^9 , 20×10^9 a 25×10^9 , 25×10^9 a 30×10^9 , 30×10^9 a 50×10^9 o 50×10^9 a 100×10^9 unidades de transducción/mL. En algunas realizaciones, el título viral de las partículas virales (p. ej., partículas de rAAV) es aproximadamente cualquiera de 5×10^9 a 10×10^9 , 10×10^9 a 15×10^9 , 15×10^9 a $25 \times$

109, o 25×10^9 a 50×10^9 unidades de transducción/mL. En algunas realizaciones, el título viral de las partículas virales (p. ej., partículas de rAAV) es al menos cualquiera de aproximadamente 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 10×10^{10} , 11×10^{10} , 15×10^{10} , 20×10^{10} , 25×10^{10} , 30×10^{10} , 40×10^{10} , o 50×10^{10} unidades infecciosas/mL. En algunas realizaciones, el título viral de las partículas virales (p. ej., partículas de rAAV) es al menos cualquiera de aproximadamente 5×10^{10} a 6×10^{10} , 6×10^{10} a 7×10^{10} , 7×10^{10} a 8×10^{10} , 8×10^{10} a 9×10^{10} , 9×10^{10} a 10×10^{10} , 10×10^{10} a 11×10^{10} , 11×10^{10} a 15×10^{10} , 15×10^{10} a 20×10^{10} , 20×10^{10} a 25×10^{10} , 25×10^{10} a 30×10^{10} , 30×10^{10} a 40×10^{10} , 40×10^{10} a 50×10^{10} , o 50×10^{10} a 100×10^{10} unidades infecciosas/mL. En algunas realizaciones, el título viral de las partículas virales (p. ej., partículas de rAAV) es al menos cualquiera de aproximadamente 5×10^{10} a 10×10^{10} , 10×10^{10} a 15×10^{10} , 15×10^{10} a 25×10^{10} , o 25×10^{10} a 50×10^{10} unidades infecciosas/mL.

En algunas realizaciones, la dosis de partículas virales administradas al individuo es al menos aproximadamente cualquiera de 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{13} copias de genoma/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis de partículas virales administradas al individuo es aproximadamente cualquiera de 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{13} copias de genoma/kg de peso corporal.

En algunas realizaciones, la total cantidad de partículas virales administradas al individuo es al menos aproximadamente cualquiera de 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{14} copias de genoma. En algunas realizaciones, la cantidad total de partículas virales administradas al individuo es aproximadamente cualquiera de 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{14} copias de genoma.

En algunas realizaciones de la invención, el volumen de la composición inyectada al cuerpo estriado es más de aproximadamente uno cualquiera de 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 4 μ l, 5 μ l, 6 μ l, 7 μ l, 8 μ l, 9 μ l, 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l, 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l, 400 μ l, 500 μ l, 600 μ l, 700 μ l, 800 μ l, 900 μ l, o 1 mL, o cualquier cantidad entre estas.

En algunas realizaciones, se inyecta un primer volumen de la composición a una primera región del cerebro, y se inyecta un segundo volumen de la composición a una segunda región del cerebro. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se inyecta un primer volumen de la composición al núcleo caudado, y se inyecta un segundo volumen de la composición al putamen. En algunas realizaciones, se inyecta un volumen 1X de la composición al núcleo caudado, y se inyecta un volumen 1,5X, 2X, 2.5X, 3X, 3.5X, o 4X de la composición al putamen, donde X es un volumen que es más de aproximadamente uno cualquiera de 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 4 μ l, 5 μ l, 6 μ l, 7 μ l, 8 μ l, 9 μ l, 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l, 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l, 400 μ l, 500 μ l, 600 μ l, 700 μ l, 800 μ l, 900 μ l, o 1 mL, o

cualquier cantidad entre estas.

Las composiciones de la invención (p. ej., partículas virales recombinantes que comprenden un vector que codifica un ARNi de la presente descripción) se pueden utilizar solas o combinadas con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de la EH. El intervalo entre la administración sucesiva puede ser en términos de al menos (o, alternativamente, menos de) minutos, horas, o días.

V. Constructos y Vectores de Expresión de ARNi

La invención proporciona constructos de expresión, vectores y partículas virales para la expresión del ARNi descrito en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica un ARNi de la presente descripción comprende un armazón heterólogo de miARN. En algunas realizaciones, el uso de un armazón heterólogo de miARN se utiliza para modular la expresión del miARN; por ejemplo, para incrementar la expresión del miARN o para disminuir la expresión del miARN. Se puede utilizar cualquier armazón de miARN conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el armazón de miARN deriva de un armazón de miR-155 (véanse, p. ej., Lagos-Quintana, M. *et al.* (2002) *Curr. Biol.* 12:735-9 y el kit del vector de expresión de ARNi Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR de Life Technologies, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA). En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica un ARNi de la presente descripción comprende un armazón de miARN. En algunas realizaciones, el armazón de miARN es proporcionado por el SEQ ID NO:14.

En algunas realizaciones, el ARNi se dirige a ARN que codifica un polipéptido asociado con un trastorno. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno del SNC. Sin desear estar limitados por la teoría, se piensa que se puede utilizar un ARNi para reducir o eliminar la expresión y/o la actividad de un polipéptido cuya ganancia de función ha sido asociada con un trastorno. Los ejemplos no limitantes de trastornos del SNC de la invención que pueden ser tratados mediante un polipéptido terapéutico o un ácido nucleico terapéutico de la invención (los genes ilustrativos que se pueden dirigir o suministrar se proporcionan entre paréntesis para cada trastorno) incluyen el accidente cerebrovascular (p. ej., caspasa-3, Beclina1, Ask1, PAR1, HIF1 α , PUMA, y/o cualquiera de los genes descritos por Fukuda, A.M. y Badaut, J. (2013) en *Genes* (Basel) 4:435-456), la enfermedad de Huntington (HTT mutante), la epilepsia (p. ej., SCN1A, NMDAR, ADK, y/o cualquiera de los genes descritos por Boison, D. (2010) en *Epilepsia* 51:1659-1668), la enfermedad de Parkinson (alfa-sinucleína), la enfermedad de Lou Gehrig (también conocida como esclerosis lateral amiotrófica; SOD1), la enfermedad de Alzheimer (tau, proteína precursora del amiloide), la degeneración corticobasal o CBD (tau), la degeneración gangliónica corticobasal o DGCB (tau), la demencia frontotemporal o DFT (tau), la parálisis supranuclear progresiva o PSP

(tau), la atrofia multisistémica o MSA (alfa-sinucleína), el cáncer de cerebro (p. ej., un oncogen mutante o expresado en exceso implicado en el cáncer de cerebro), y la enfermedad de depósito lisosomal (EDL). Lo trastornos de la invención pueden incluir aquellos que implican grandes zonas del córtex, p. ej., más de una zona funcional del córtex, más de un lóbulo del córtex, y/o el córtex completo. Otros ejemplos no limitantes de trastornos de la invención que pueden ser tratados mediante un polipéptido terapéutico o un ácido nucleico terapéutico de la invención incluyen lesión cerebral traumática, trastornos de disfunción enzimática, trastornos psiquiátricos (incluyendo síndrome de estrés post-traumático), enfermedades neurodegenerativas, y trastornos cognitivos (incluyendo demencias, autismo, y depresión). Los trastornos de disfunción enzimática incluyen sin limitación leucodistrofias (incluyendo la enfermedad de Canavan) y cualquiera de las enfermedades de depósito lisosomal descritas a continuación.

En algunas realizaciones, el transgén (p. ej., un ARNi de la presente descripción) está conectado operablemente a un promotor. Los promotores ilustrativos incluyen, peso no se limitan a, promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), la LTR de RSV, la LTR de MoMLV, el promotor de la fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un promotor de virus de simios 40 (SV40) y un promotor de CK6, un promotor de transtiretina (TTR), un promotor de TK, un promotor sensible a tetraciclina (TRE), un promotor de HBV, un promotor de hAAT, un promotor de LSP, promotores quiméricos específicos de hígado (LSP), el promotor de E2F, el promotor de telomerasa (hTERT); el promotor del potenciador de citomegalovirus/beta-actina de pollo/ β -globina de conejo (promotor CAG; Niwa et al., Gene, 1991, 108(2):193-9) y el promotor del factor de elongación 1-alfa (EF1- α) (Kim et al., Gene, 1990, 91(2):217-23 y Guo et al., Gene Ther., 1996, 3(9):802-10). En algunas realizaciones, el promotor comprende un promotor de la β -glucuronidasa o un potenciador de citomegalovirus conectado a un promotor de la β -actina de pollo. El promotor puede ser un promotor constitutivo, inducible o reprimible. En algunas realizaciones, la invención proporciona un vector recombinante que comprende el ácido nucleico que codifica un transgén heterólogo de la presente descripción conectado operablemente a un promotor de CBA. Los promotores y descripciones ilustrativos se pueden encontrar, p. ej., en la Publicación de los Estados Unidos Pre-Concedida Núm. 20140335054. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de CBA, un promotor de CBA mínimo, un promotor de CMV o un promotor de GUSB.

Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen, sin limitación, el promotor LTR retroviral del virus del sarcoma de Rous (RSV) (opcionalmente con el potenciador de RSV), el promotor de citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el potenciador de CMV) [véase, p. ej., Boshart et al, Cell, 41:521-530 (1985)], el promotor de SV40, el promotor de la

dihidrofolato reductasa, el promotor de la 13-actina, el promotor de la fosfoglicerol quinasa (PGK), y el promotor EFla [Invitrogen].

Los promotores inducibles permiten la regulación de la expresión génica y pueden ser regulados por compuestos suministrados endógenamente, factores ambientales tales como la temperatura, o la presencia de un estado fisiológico específico, p. ej., fase aguda, un estado de diferenciación concreto de la célula, o en células en replicación únicamente. Los promotores inducibles y los sistemas inducibles son asequibles de una variedad de fuentes comerciales, incluyendo, sin limitación, Invitrogen, Clontech y Ariad. Muchos otros sistemas han sido descritos y pueden ser seleccionados fácilmente por un experto en la técnica. Los ejemplos de los promotores inducibles regulados por promotores suministrados exógenamente incluyen el promotor de la metalotioneína (MT) de oveja inducible por cinc, el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el sistema promotor de la polimerasa de T7 (documento WO 98/10088); el promotor de ecdisona de insectos (No et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)), el sistema represible por tetraciclina (Gossen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)), el sistema inducible por tetraciclina (Gossen et al, Science, 268:1766-1769 (1995), véanse también Harvey et al, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)), el sistema inducible por RU486 (Wang et al, Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) y Wang et al, Gene Ther., 4:432-441 (1997)) y el sistema inducible por rapamicina (Magari et al, J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)). Otros tipos más de promotores inducibles que pueden ser útiles en este contexto son aquellos que son regulados por un estado fisiológico específico, p. ej., temperatura, fase aguda, un estado de diferenciación concreto de la célula, o en células en replicación únicamente.

En otra realización, se utilizará el promotor nativo, o fragmento del mismo, para el transgén. El promotor nativo puede preferirse cuando se desea que la expresión del transgén imite la expresión nativa. El promotor nativo se puede utilizar cuando la expresión del transgén deba ser regulada temporalmente o para el desarrollo, o de una manera específica de tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. En una realización adicional, también se pueden utilizar otros elementos de control de la expresión nativos, tales como elementos potenciadores, sitios de poliadenilación o secuencias consenso de Kozak para imitar la expresión nativa.

En algunas realizaciones, las secuencias reguladoras confieren capacidades de expresión génica específica de tejido. En algunos casos, las secuencias reguladoras específicas de tejido se unen a factores de transcripción específicos de tejido que inducen la transcripción de una manera específica de tejido. Tales secuencias reguladoras específicas de tejido (p. ej., promotores, potenciadores, etc.) son bien conocidos en la técnica. Las

secuencias reguladoras específicas de tejido incluyen, pero no se limitan a los siguientes promotores específicos de tejido: neuronal tal como el promotor de enolasa específico de neuronas (NSE) (Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)), el promotor del gen de la cadena ligera de neurofilamentos (Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. IDSA, 88:5611-5 (1991)), y el promotor del gen vgf específico de neuronas (Piccioli et al., Neuron, 15:373-84 (1995)). En algunas realizaciones, el promotor específico de tejido es un promotor de un gen seleccionado entre: núcleos neuronales (NeuN), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), poliposis adenomatosa coli (APC), y molécula del adaptador de unión a calcio ionizado 1 (Iba-1). Otros promotores específicos de tejido apropiados resultarán evidentes para los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de la Beta-actina de pollo.

En algunas realizaciones, el promotor expresa el ácido nucleico heterólogo en una célula del SNC. Como tal, en algunas realizaciones, se puede utilizar un polipéptido terapéutico o un ácido nucleico terapéutico de la invención para tratar un trastorno del SNC. En algunas realizaciones, el promotor expresa el ácido nucleico heterólogo en una célula del cerebro. Una célula del cerebro puede referirse a cualquier célula del cerebro conocida en la técnica, incluyendo sin limitación una neurona (tal como una neurona sensorial, una neurona motora, una interneurona, una neurona dopaminérgica, una neurona espinosa mediana, una neurona colinérgica, una neurona GABAérgica, una neurona piramidal, etc.), una célula glial (tal como microglía, macroglía, astrocitos, oligodendrocitos, células ependimales, glía radial, etc.), una célula del parénquima cerebral, célula microglial, célula ependimal, y/o una célula de Purkinje. En algunas realizaciones, el promotor expresa el ácido nucleico heterólogo en una neurona y/o célula glial. En algunas realizaciones, la neurona es una neurona espinosa mediana del núcleo caudado, una neurona espinosa mediana del putamen, una neurona de la capa IV del córtex y/o una neurona de la capa V del córtex.

Diversos promotores que expresan transcritos (p. ej., un transgén heterólogo) en células del SNC, células del cerebro, neuronas, y células gliales son conocidos en la técnica y se describen en la presente memoria. Tales promotores pueden comprender secuencias de control asociadas normalmente con el gen seleccionado o con secuencias de control heterólogas. Con frecuencia, las secuencias de control heterólogas incluyen aquellas derivadas de secuencias que codifican genes de mamífero o virales. Los ejemplos incluyen, sin limitación, el promotor temprano de SV40, el promotor de LTR de tumor mamario de ratón, el promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP), un promotor del virus del herpes simplex (HSV), un promotor de citomegalovirus (CMV) tal como la región promotora temprana inmediata de CMV (CMVIE), un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotores sintéticos, promotores híbridos, y similares. Además, también se

pueden utilizar secuencias derivadas de genes no virales, tales como el gen de la metalotioneína murina. Tales secuencias promotoras son asequibles comercialmente, p. ej., de Stratagene (San Diego, CA). Se pueden utilizar promotores específicos del SNC y promotores inducibles. Los ejemplos de promotores específicos del SNC incluyen sin limitación los aislados de genes específicos del SNC tales como la proteína básica de mielina (MBP), la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), y la enolasa específica de neuronas (NSE). Los ejemplos de los promotores inducibles incluyen elementos sensibles al ADN para la ecdisona, tetraciclina, metalotioneína, e hipoxia, entre otros.

La presente invención contempla el uso de un genoma viral recombinante para la introducción de una o más secuencias de ácido nucleico que codifican un ARNi descrito en la presente memoria o el empaquetamiento en una partícula viral de AAV. El genoma viral recombinante puede incluir cualquier elemento para establecer la expresión de un ARNi, por ejemplo, un promotor, un ácido nucleico heterólogo, una ITR, un elemento de unión a ribosoma, terminador, potenciador, marcador de selección, intrón, señal poliA, y/u origen de replicación. En algunas realizaciones, el vector de rAAV comprende uno o más de un potenciador, un par donador de empalme/aceptor de empalme, un sitio de anclaje a la matriz, o una señal de poliadenilación.

En algunas realizaciones, la administración de una cantidad eficaz de partículas de rAAV que comprenden un vector que codifica un ARNi transduce células (p. ej., células del SNC, células de cerebro, neuronas, y/o células gliales) a o cerca del sitio de administración (p. ej., el cuerpo estriado y/o córtex) o más distal con respecto al sitio de administración. En algunas realizaciones, se transducen más de aproximadamente cualquiera de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% o 100% de las neuronas. En algunas realizaciones, se transducen de aproximadamente 5% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 50%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 75%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 50%, o de aproximadamente 30% a aproximadamente 50% de las neuronas. Los métodos para identificar neuronas transducidas por partículas virales recombinantes que expresan miARN son conocidos en la técnica; por ejemplo, inmunohistoquímica, detección de ARN (p. ej., qPCR, transferencia Northern, sec. de ARN, hibridación in situ, y similares) o se puede emplear el uso de un marcador co-expresado tal como la proteína fluorescente verde potenciada para detectar la expresión.

En algunos aspectos, la invención proporciona partículas virales que comprenden un genoma de auto-complementación recombinante (p. ej., un vector de rAAV autocomplementario). Las partículas virales de AAV con genoma de autocomplementación

de vectores y los métodos de uso de los genomas de autocomplementación de AAV se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.596.535; 7.125.717; 7.465.583; 7.785.888; 7.790.154; 7.846.729; 8.093.054; y 8.361.457; y Wang Z., et al., (2003) Gene Ther 10:2105-2111, cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad. Un rAAV que comprende un genoma de auto-complementación formará rápidamente una molécula de ADN de doble cadena en virtud de sus secuencias que se complementan parcialmente (p. ej., cadenas codificante y no codificante de complementación de un ácido nucleico heterólogo). En algunas realizaciones, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el ácido nucleico heterólogo y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un complemento del ácido nucleico, donde la primera secuencia de ácido nucleico puede formar pares de base intrahebra con la segunda secuencia de ácido nucleico a lo largo de la mayor parte o de toda su longitud.

En algunas realizaciones, la primera secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un ARNi y una segunda secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica el complemento del ARNi están conectadas mediante una ITR mutada (p. ej., la ITR derecha). En algunas realizaciones, la ITR comprende la secuencia de polinucleótido 5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG – 3' (SEQ ID NO:1). La ITR mutada comprende una delección de la región D que comprende la secuencia de resolución terminal. Como resultado, al replicar un genoma viral de AAV, las proteínas rep no escindirán el genoma viral en la ITR mutada y como tal, se empaquetará un genoma viral recombinante que comprende los siguientes en orden 5' a 3' en una cápside viral: una AAV ITR, la primera secuencia de polinucleótido heterólogo incluyendo las secuencias reguladoras, la ITR de AAV mutada, el segundo polinucleótido heterólogo en orientación inversa al primer polinucleótido heterólogo y una tercera ITR de AAV.

VI. Partículas virales y métodos de producción de partículas virales

La invención proporciona, *inter alia*, partículas virales recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica un ARNi de la presente descripción, así como métodos de uso de las mismas para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero; p. ej., la enfermedad de Huntington.

Partículas virales

La invención proporciona partículas virales que comprenden el ARNi que se ha descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, la invención proporciona partículas virales para suministrar el ARNi de la invención como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, la invención proporciona métodos de utilización de partículas virales

recombinantes para suministrar ARNi para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero; p. ej., partículas de rAAV que comprenden ARNi para tratar la EH. En algunas realizaciones, la partícula viral recombinante es una partícula de AAV recombinante. En algunas realizaciones, la partícula viral es una partícula de AAV recombinante que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de un ARNi de la presente descripción flanqueada por una o dos ITR. El ácido nucleico es encapsidado en la partícula de AAV. La partícula de AAV también comprende proteínas de la cápside. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende la secuencia o secuencias codificantes de interés (p. ej., ácido nucleico de un ARNi de la presente descripción), componentes conectados operativamente en la dirección de la transcripción, secuencias de control incluyendo secuencias de inicio y terminación de la transcripción, formando de ese modo un casete de expresión. El casete de expresión está flanqueado en el extremo 5' y 3' por al menos una de las secuencias de ITR de AAV funcionales. Por “secuencias de ITR de AAV funcionales” se pretende significar que las secuencias de ITR funcionan como se prevé para el rescate, la replicación y el empaquetamiento del virión de AAV. Véase Davidson *et al.*, *PNAS*, 2000, 97(7):3428-32; Passini *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):7034-40; y Pechan *et al.*, *Gene Ther.*, 2009, 16:10-16, todas las cuales se incorporan a la presente memoria en su totalidad como referencia. Para poner en práctica algunos aspectos de la invención, los vectores recombinantes comprenden al menos todas las secuencias de AAV esenciales para la encapsidación y las estructuras físicas para la infección por el rAAV. Se necesita que la ITR de AAV para su uso en los vectores de la invención no tenga una secuencia de nucleótidos de tipo salvaje (p. ej., como describen Kotin, *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5:793-801), y pueda ser alterada mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos o la ITR de AAV puede derivar de cualquiera de varios serotipos de AAV. Se conocen en la actualidad más de 40 serotipos de AAV, y se continúan identificando nuevos serotipos y variantes de los serotipos existentes. Véanse Gao *et al.*, *PNAS*, 2002, 99(18): 11854-6; Gao *et al.*, *PNAS*, 2003, 100(10):6081-6; y Bossis *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):6799-810. El uso de cualquier serotipo de AAV se considera dentro del alcance de la presente invención. En algunas realizaciones, un vector de rAAV es un vector derivado de un serotipo de AAV, incluyendo sin limitación, ITR de AAV que son ITR de serotipos de la cápside de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino, o AAV de ratón o similares. En algunas realizaciones, el ácido nucleico en el AAV comprende ITR de AAV que son ITR de serotipos de la cápside de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino, AAV de ratón o

similares. En algunas realizaciones, el ácido nucleico en el AAV codifica adicionalmente un ARNi descrito en la presente memoria. Por ejemplo, el ácido nucleico en el AAV puede comprender al menos una ITR de cualquier serotipo de AAV contemplado en la presente memoria y puede codificar adicionalmente un ARNi que comprende una primera cadena y una segunda cadena, en donde: a) la primera cadena y la segunda forman un dúplex; b) la primera cadena comprende una región guía de al menos 11 bases, en donde la región guía comprende una región semilla que comprende las bases 1-N de la cadena guía, en donde N=7 o N=8; y c) la segunda cadena comprende una región no guía de al menos 11 bases, en donde la región no guía comprende una secuencia de la protuberancia opuesta a una cualquiera o más de las bases 1-(N+2) de la región guía en el dúplex. En algunas realizaciones, el rAAV puede comprender una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2). En algunas realizaciones, el ácido nucleico en el AAV comprende 5' a 3' el ácido nucleico que codifica los siguientes: una ITR (p. ej., una ITR de AAV2), un promotor, un ácido nucleico que codifica un ARNi como se describe en la presente memoria, una señal de poliadenilación, y una ITR de AAV (p. ej., una ITR de AAV2). En algunas realizaciones, el ácido nucleico en el AAV comprende 5' a 3' el ácido nucleico que codifica los siguientes: una ITR (p. ej., una ITR de AAV2), un promotor, un ácido nucleico que codifica un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), una señal de poliadenilación, y una ITR de AAV (p. ej., una ITR de AAV2). En algunas realizaciones, el ácido nucleico en el AAV comprende 5' a 3' el ácido nucleico que codifica los siguientes: una ITR (p. ej., una ITR de AAV2), un promotor de CBA, un ácido nucleico que codifica un ARNi como se describe en la presente memoria, una señal de poliadenilación (p. ej., una poliA de la hormona de crecimiento bovina), y una ITR de AAV (p. ej., una ITR de AAV2). En algunas realizaciones, el ácido nucleico en el AAV comprende 5' a 3' el ácido nucleico que codifica los siguientes: una ITR (p. ej., una ITR de AAV2), un promotor de CBA, un ácido nucleico que codifica un ARNi que comprende una primera cadena que comprende un primer ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) y una segunda cadena que comprende un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2), una señal de poliadenilación (p. ej., poliA de la hormona de crecimiento bovina), y una ITR de AAV (p.

ej., una ITR de AAV2). En algunas realizaciones, la primera cadena y la segunda cadena forman un dúplex, y el resto A en el resto 18 o el resto 19 del SEQ ID NO:2 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena. En algunas realizaciones, los restos de U como restos 11 y 12 del SEQ ID NO:1 de la primera cadena no forman pares de bases con la segunda cadena. En algunas realizaciones, el resto A en el resto 18 o el resto 19 del SEQ ID NO:2 de la segunda cadena no forman un par de bases con un resto en la primera cadena y los restos de U como restos 11 y 12 del SEQ ID NO:1 de la primera cadena no forman pares de bases con la segunda cadena.

En algunas realizaciones, un vector puede incluir un ácido nucleico de relleno. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de relleno puede codificar una proteína fluorescente verde. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de relleno se puede localizar entre el promotor y el ácido nucleico que codifica el ARNi. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de relleno puede ser una secuencia de relleno de alfa-1-antitripsina (AAT) humana o una secuencia de relleno del clon 16 P1 del cromosoma C16 P1 (C16 humano).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico en el AAV comprende el ácido nucleico del SEQ ID NO:13. En algunas realizaciones, el ácido nucleico en el AAV comprende un ácido nucleico que es al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico al SEQ ID NO: 13. En realizaciones adicionales, la partícula de rAAV comprende proteínas de la cápside de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.8, AAVrh8R, AAVrh.10, AAV11, AAV12, o mutantes de estas proteínas de la cápside. En algunas realizaciones, una proteína de la cápside mutante mantiene la capacidad de formar una cápside de AAV. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende la cápside mutante en tirosina de AAV5 (Zhong L. *et al.*, (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(22):7827-7832. En realizaciones adicionales, la partícula de rAAV comprende proteínas de la cápside de un serotipo de AAV de los Clados A-F (Gao, *et al.*, *J. Virol.* 2004, 78(12):6381).

Se utilizan diferentes serotipos de AAV para optimizar la transducción de células dianas concretas o para dirigirse a tipos celulares específicos dentro de un tejido diana concreto (p. ej., un tejido enfermo). Una partícula de rAAV puede comprender proteínas virales y ácidos nucleicos virales del mismo serotipo o de serotipo mixto. Por ejemplo, en algunas realizaciones una partícula de rAAV puede comprender proteínas de la cápside AAV1 y al menos una ITR de AAV2 o puede comprender proteínas de la cápside de AAV2 y al menos una ITR de 1. En la presente memoria se proporciona cualquier combinación de serotipos de AAV para la producción de una partícula de rAAV como si cada combinación se hubiera establecido expresamente en la presente memoria. En algunas realizaciones, la invención proporciona partículas de rAAV que comprenden una cápside de AAV1 y un

vector de rAAV de la presente descripción (p. ej., un casete de expresión que comprende ácido nucleico que codifica un ARNi de la presente descripción), flanqueado por al menos una ITR de AAV2. En algunas realizaciones, la invención proporciona partículas de rAAV que comprenden una cápside de AAV2.

5 En algunos aspectos, la invención proporciona partículas virales que comprenden un genoma de auto-complementación recombinante. Las partículas virales de AAV con genomas de auto-complementación y los métodos de uso de los genomas de auto-complementación de AAV se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.596.535; 7.125.717; 7.465.583; 7.785.888; 7.790.154; 7.846.729; 8.093.054; y 8.361.457; y Wang Z., *et al.*, (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111, cada una de las cuales se incorpora a la
10 y presente memoria como referencia en su totalidad. Un rAAV que comprende un genoma de auto-complementación formará rápidamente una molécula de ADN de doble cadena en virtud de sus secuencias de complementación parcial (p. ej., que complementan cadenas codificantes y no codificantes de un transgén). En algunas realizaciones, la invención
15 proporciona una partícula viral de AAV que comprende un genoma de AAV, en donde el genoma de rAAV comprende una primera secuencia de polinucleótido heteróloga (p. ej., un ARNi de la presente descripción) y una segunda secuencia de polinucleótido heteróloga (p. ej., cadena antisentido de un ARNi de la presente descripción) en donde la primera secuencia de polinucleótido heteróloga puede formar pares de base intrahebra con la segunda secuencia
20 de polinucleótido a lo largo de la mayor parte o de toda su longitud. En algunas realizaciones, la primera secuencia de polinucleótido heteróloga y a segunda secuencia de polinucleótido heteróloga están conectadas por una secuencia que facilita el emparejamiento de bases intrahebra; p. ej., una estructura de ADN en horquilla. Las estructuras en horquilla son conocidas en la técnica, por ejemplo en moléculas de miARN o ARNip. En algunas
25 realizaciones, la primera secuencia de polinucleótido heteróloga y a segunda secuencia de polinucleótido heteróloga están conectadas por una ITR mutada (p. ej., la ITR de la derecha). En algunas realizaciones, la ITR comprende la secuencia de polinucleótido 5'-CACTCCCTCTCTGCGGCTCGCTCGCTCACTGAGCCGGGCGACCAAAGGTCG CCCACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCG – 3' (SEQ ID NO:12). La ITR mutada comprende
30 una delección de la región D que comprende la secuencia de resolución terminal. Como resultado, al replicar un genoma viral de AAV, las proteínas rep no escindirán el genoma viral en la ITR mutada y como tal, se empaquetará un genoma viral recombinante que comprende lo siguiente en orden 5' a 3' en una cápside viral: una ITR de AAV, la primera secuencia de polinucleótido heteróloga incluyendo secuencias reguladoras, la ITR de AAV
35 mutada, el segundo polinucleótido heterólogo en orientación inversa al primer polinucleótido heterólogo y una tercera ITR de AAV. En algunas realizaciones, la invención proporciona

partículas virales de AAV que comprenden un genoma viral recombinante que comprende una ITR de AAV2 funcional, una primera secuencia de polinucleótido que codifica un ARNi de la presente descripción, una ITR de AAV2 mutada que comprende una delección de la región D y carece de una secuencia funcional de resolución terminal, una segunda secuencia de polinucleótido que comprende la secuencia complementaria a la secuencia que codifica un ARNi de la presente descripción, de la primera secuencia de polinucleótido y una ITR de AAV2 funcional.

En algunas realizaciones, la partícula viral es una partícula adenoviral. En algunas realizaciones, la partícula adenoviral es una partícula adenoviral recombinante, p. ej., un vector polinucleotídico que comprende un ARNi de la presente descripción entre dos ITR. En algunas realizaciones, la partícula adenoviral carece o contiene una copia defectuosa de uno o más genes E1, que rinda el adenovirus de replicación defectuosa. Los adenovirus incluyen un genoma de ADN linear, de doble cadena dentro de una cápside icosaédrica sin envoltura grande (~950Å). Los adenovirus tienen un genoma grande que puede incorporar más de 30kb de secuencia heteróloga (p. ej., en lugar de la región E1 y/o E3), haciéndolos únicamente adecuados para su uso con genes heterólogos más grandes. También son conocidos por infectar células en división y células que no están en división y no se integran naturalmente el genoma del anfitrión (aunque variantes híbridas pueden poseer esta capacidad). En algunas realizaciones, el vector adenoviral puede ser una primera generación de vector adenoviral con una secuencia heteróloga en lugar de E1. En algunas realizaciones, el vector adenoviral puede ser una segunda generación de vector adenoviral con mutaciones o delecciones adicionales en E2A, E2B, y/o E4. En algunas realizaciones, el vector adenoviral puede ser una tercera generación o vector adenoviral vaciado que carece de genes codificantes, conservando solo las ITR y la señal de empaquetamiento y requiriendo un adenovirus auxiliar *en trans* para la replicación, y el empaquetamiento. Las partículas adenovirales han sido investigadas para su uso como vectores para la transfección transitoria de células de mamífero y también como vectores para terapia génica. Para una descripción adicional, véanse, p. ej., Danthinne, X. e Imperiale, M.J. (2000) *Gene Ther.* 7:1707-14 y Tatsis, N. y Ertl, H.C. (2004) *Mol. Ther.* 10:616-29.

En algunas realizaciones, la partícula viral es una partícula adenoviral recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un ARNi de la presente descripción. El uso de cualquier serotipo de adenovirus es considerado dentro del alcance de la presente invención. En algunas realizaciones, el vector adenoviral recombinante es un vector derivado de un serotipo de adenovirus, incluyendo sin limitación, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu5, AdHu7, AdHu11, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad bovino tipo 3, Ad canino tipo 2, Ad

ovino, y Ad porcino tipo 3. La partícula adenoviral también comprende proteínas de la cápside. En algunas realizaciones, las partículas virales recombinantes comprenden una partícula adenoviral combinada con una o más proteínas de la cápside viral foráneas. Tales combinaciones pueden ser referidas como partículas adenovirales recombinantes pseudotipificadas. En algunas realizaciones, las proteínas de la cápside viral foráneas utilizadas en las partículas adenovirales recombinantes pseudotipificadas derivan de un virus foráneo o de otro serotipo de adenovirus. En algunas realizaciones, las proteínas de la cápside viral foráneas derivan de, incluyendo sin limitación, reovirus tipo 3. Los ejemplos de las combinaciones de vector y proteína de la cápside utilizados en las partículas de adenovirus pseudotipificadas se pueden encontrar en las siguientes referencias (Tatsis, N. *et al.* (2004) *Mol. Ther.* 10(4):616-629 y Ahi, Y. *et al.* (2011) *Curr. Gene Ther.* 11(4):307-320). Se pueden utilizar adenovirus de serotipo diferente para optimizar la transducción de células diana concretas o para dirigirse a tipos celulares específicos dentro de un tejido diana concreto (p. ej., un tejido enfermo). Los tejidos o células elegidos como diana por un serotipo de adenovirus específico, incluyen sin limitación, pulmón (p. ej. HuAd3), bazo e hígado (p. ej. HuAd37), músculo liso, sinoviocitos, células dendríticas, células cardiovasculares, líneas de células tumorales (p. ej. HuAd11), y células dendríticas (p. ej. HuAd5 pseudotipificadas con *reovirus tipo 3*, *HuAd30*, o *HuAd35*). Para una descripción adicional, véanse Ahi, Y. *et al.* (2011) *Curr. Gene Ther.* 11(4):307-320, Kay, M. *et al.* (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40, y Tatsis, N. *et al.* (2004) *Mol. Ther.* 10(4):616-629. Los vectores adenovirales han sido administrados mediante administración intraestriatal (véanse, p. ej., Mittoux, V. *et al.* (2002) *J. Neurosci.* 22:4478-86).

En algunas realizaciones, la partícula viral es una partícula lentiviral. En algunas realizaciones, la partícula lentiviral es una partícula lentiviral recombinante, p. ej., un vector polionucleotídico que codifica un ARNi de la presente descripción entre dos LTR. Los lentivirus son retrovirus con, ARNhs de sentido positivo con a genoma de aproximadamente 10 kb. Se sabe que los lentivirus se integran en el genoma de células en división y que no están en división. Las partículas lentivirales se pueden producir, por ejemplo, transfectando múltiples plásmidos (típicamente el genoma lentiviral y los genes requeridos para la replicación y/o el empaquetamiento están separados para prevenir la replicación viral) a una línea celular de empaquetamiento, que empaqueta el genoma lentiviral modificado en partículas lentivirales. En algunas realizaciones, una partícula lentiviral puede referirse a un vector de primera generación que carece de proteína de la envoltura. En algunas realizaciones, una partícula lentiviral puede referirse a un vector de segunda generación que carece de todos los genes excepto las regiones gag/pol y tat/rev. En algunas realizaciones, una partícula lentiviral puede referirse a un vector de tercera generación que solo contiene

los genes rev, gag, y pol endógenos y tiene una LTR quimérica para la transducción sin el gen tat (véase Dull, T. *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:8463-71). Para una descripción adicional, véase Durand, S. y Cimorelli, A. (2011) *Viruses* 3:132-59.

En algunas realizaciones, la partícula viral es una partícula lentiviral recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un ARNi de la presente descripción. El uso de cualquier vector lentiviral se considera dentro del alcance de la presente invención. En algunas realizaciones, el vector lentiviral deriva de un lentivirus incluyendo, sin limitación, el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1), el virus de la inmunodeficiencia humana-2 (HIV-2), el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV), el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), el virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV), el virus de la enfermedad de Jembrana (JDV), virus visna (VV), y virus de la artritis encefalitis caprina (CAEV). La partícula lentiviral también comprende proteínas de la cápside. En algunas realizaciones, las partículas virales recombinantes comprenden un vector de lentivirus combinado con una o más proteínas de la cápside viral foráneas. Tales combinaciones pueden ser referidas como partículas lentivirales recombinantes pseudotipificadas. En algunas realizaciones, las proteínas de la cápside viral foráneas utilizadas en las partículas lentivirales derivan de un virus foráneo. En algunas realizaciones, la proteína de la cápside viral utilizada en las partículas lentivirales recombinantes pseudotipificadas es la Glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-GP). La VSV-GP interactúa con un receptor celular ubicuo, proporcionando un amplio tropismo de tejido a partículas lentivirales recombinantes pseudotipificadas. Además, se piensa que VSV-GP proporciona mayor estabilidad a las partículas lentivirales recombinantes pseudotipificadas. En otras realizaciones, las proteínas de la cápside viral foráneas derivan de, incluyendo sin limitación, el Virus Chandipura, el Virus de la rabia, el Virus Mokola, el Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), el Virus Ross River (RRV), el Virus Sindbis, el Virus del bosque Semliki (SFV), el Virus de la encefalitis equina venezolana, el Virus del Ébola Reston, el Virus del Ébola Zaire, el Virus Marburg, el Virus Lassa, Virus de la leucosis aviar (ALV), el Retrovirus Jaagsiekte de las ovejas (JSRV), el Virus de la leucemia murina de Moloney (MLV), el virus de la leucemia de monos gibones (GALV), el Retrovirus endógeno felino (RD114), el Virus humano linfotrópico T-1 (HTLV-1), el Virus espumoso humano, el virus Maedi-visna (MVV), SARS-CoV, el Virus Sendai, el Virus respiratorio sincitial (RSV), el Virus de parainfluenza humana tipo 3, el Virus de la Hepatitis C (HCV), el Virus de la influenza, el Virus de la peste aviar (FPV), o el Virus de la polihedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV). Los ejemplos de las combinaciones de vector y proteína de la cápside utilizadas en las partículas de Lentivirus pseudotipificadas se pueden encontrar, por ejemplo, en Cronin, J. *et al.* (2005). *Curr. Gene*

Ther. 5(4):387-398. Se pueden utilizar diferentes partículas lentivirales recombinantes pseudotipificadas para optimizar la transducción de células diana concretar o para dirigirse a tipos celulares específicos dentro de un tejido diana concreto (p. ej., un tejido enfermo). Por ejemplo, los tejidos elegidos como diana por partículas lentivirales recombinantes pseudotipificadas específicas, incluyen sin limitación, hígado (p. ej. pseudotipificado con una proteína de VSV-G, LCMV, RRV, o SeV F), pulmón (p. ej. pseudotipificado con una proteína de Ébola, Marburg, SeV F y HN, o JSRV), células de los islotes pancreáticos (p. ej. pseudotipificadas con una proteína LCMV), sistema nervioso central (p. ej. pseudotipificado con una proteína de VSV-G, LCMV, Rabies, o Mokola), retina (p. ej. pseudotipificado con una proteína de VSV-G o Mokola), monocitos o músculo (p. ej. pseudotipificados con una proteína de Mokola o Ébola), sistema hematopoyético (p. ej. pseudotipificado con una proteína de RD114 o GALV), o células cancerosas (p. ej. pseudotipificadas con una proteína de GALV o LCMV). Para una descripción adicional, véase Cronin, J. *et al.* (2005). *Curr. Gene Ther.* 5(4):387-398 y Kay, M. *et al.* (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40.

En algunas realizaciones, la partícula viral es una partícula del virus del herpes simplex (HSV). En algunas realizaciones, la partícula de HSV es una partícula de rHSV, p. ej., un vector polionucleotídico que codifica un ARNi de la presente descripción entre dos TR. El HSV es un virus con ADN de doble cadena, con envoltura con un genoma de aproximadamente 152 kb. Ventajosamente, aproximadamente la mitad de sus genes no son esenciales y se pueden suprimir para acomodar la secuencia heteróloga. Las partículas de HSV infectan células que no están en división. Además, establecen naturalmente latencia en neuronas, viajan mediante transporte retrógrado, y pueden ser transferidas a través de las sinapsis, haciéndolas ventajosas para la transfección de neuronas y/o enfoques de terapia génica que implican al sistema nervioso central. En algunas realizaciones, la partícula de HSV puede ser de replicación defectuosa o de replicación competente (p. ej., competente para un solo ciclo de replicación a través de la inactivación de uno o más genes tardíos). Para una descripción adicional, véase Manservigi, R. *et al.* (2010) *Open Virol. J.* 4:123-56.

En algunas realizaciones, la partícula viral es una partícula de rHSV que comprende un ácido nucleico que codifica un ARNi de la presente descripción. El uso de cualquier vector de HSV se considera dentro del alcance de la presente invención. En algunas realizaciones, el vector de HSV deriva de un serotipo de HSV, incluyendo sin limitación, HSV-1 y HSV-2. La partícula de HSV también comprende proteínas de la cápside. En algunas realizaciones, las partículas virales recombinantes comprenden un vector de HSV combinado con una o más proteínas de la cápside viral foráneas. Tales combinaciones pueden ser referidas como partículas de rHSV pseudotipificadas. En algunas realizaciones, las proteínas de la cápside viral foráneas utilizadas en las partículas de rHSV

pseudotipificadas derivan de un virus foráneo o de otro serotipo de HSV. En algunas realizaciones, la proteína de la cápside viral foránea utilizada en una partícula de rHSV pseudotipificada es una glicoproteína del Virus de la estomatitis vesicular (VSV-GP). La VSV-GP interactúa con un receptor celular ubicuo, proporcionando amplio tropismo de tejido a las partículas de rHSV pseudotipificadas. Además, se piensa que la VSV-GP proporciona mayor estabilidad a las partículas de rHSV pseudotipificadas. En otras realizaciones, la proteína de la cápside viral foránea puede ser de un serotipo de HSV diferente. Por ejemplo, un vector de HSV-1 puede contener una o más proteínas de la cápside de HSV-2. Se pueden utilizar diferentes serotipos de HSV para optimizar la transducción de células diana concretas o para dirigirse a tipos celulares específicos dentro de un tejido diana concreto (p. ej., un tejido enfermo). Los tejidos o células elegidos como diana por serotipos de adenovirus específicos incluyen sin limitación, sistema nervioso central y neuronas (p. ej. HSV-1). Para una descripción adicional, véanse Manservigi, R. *et al.* (2010) *Open Virol J* 4:123-156, Kay, M. *et al.* (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40, y Meignier, B. *et al.* (1987) *J. Infect. Dis.* 155(5):921-930.

Producción de partículas virales

Las partículas de rAAV se pueden producir utilizando métodos conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.566.118; 6.989.264; y 6.995.006. En la práctica de la invención, las células anfitrionas para producir partículas de rAAV incluyen células de mamífero, células de insecto, células vegetales, microorganismos y levaduras. Las células anfitrionas pueden ser también células de empaquetamiento en las que los genes rep y cap de AAV son mantenidos establemente en la célula anfitriona o células productoras en las que el genoma del vector de AAV es mantenido establemente. Las células de empaquetamiento y productoras ilustrativas están derivadas de células 293, A549 o HeLa. Los vectores de AAV se purifican y se formulan utilizando mecanismos convencionales conocidos en la técnica.

Los métodos conocidos en la técnica para la producción de vectores de rAAV incluyen pero no se limitan a transfección, producción de líneas celulares estables, y sistemas de producción de virus híbridos infecciosos que incluyen híbridos de adenovirus-AAV, híbridos de herpesvirus-AAV (Conway, JE *et al.*, (1997) *J. Virology* 71(11):8780-8789) e híbridos de baculovirus-AAV. Los cultivos de producción de rAAV para la producción de partículas de virus rAAV requieren todos; 1) células anfitrionas adecuadas, incluyendo, por ejemplo, líneas celulares derivadas de seres humanos tales como células HeLa, A549, o 293, o líneas celulares derivadas de insecto tales como SF-9, en el caso de los sistemas de producción de baculovirus; 2) función de virus auxiliar adecuada, proporcionada por adenovirus de tipo salvaje o mutante (tal como adenovirus sensible a la temperatura), herpes

virus, baculovirus, o un constructo plasmídico que proporciona funciones auxiliares; 3) genes rep y cap de AAV y productos génicos; 4) un ácido nucleico (tal como un ácido nucleico terapéutico) flanqueado por al menos una secuencia ITR de AAV; y 5) medios adecuados y componentes de los medios para soportar la producción de rAAV. En algunas realizaciones, los productos génicos rep y cap de AAV pueden ser de cualquier serotipo de AAV. En general, pero no obligatoriamente, el producto génico rep de AAV es del mismo serotipo que las ITR del genoma del vector de rAAV con tal que los productos del gen rep puedan funcionar para replicar y empaquetar el genoma de rAAV. Los medios adecuados conocidos en la técnica se pueden utilizar para la producción de los vectores de rAAV. Estos medios incluyen, sin limitación, medios producidos por Hyclone Laboratories y JRH incluyendo Medio de Eagle Modificado (MEM), Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), formulaciones personalizadas tales como las descritas en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.566.118, y medio SFM Sf-900 II como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.723.551, cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad, particularmente con respecto a formulaciones de medios personalizados para su uso en la producción de vectores de AAV recombinantes. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV son proporcionadas por adenovirus o HSV. En algunas realizaciones, las funciones auxiliares de AAV son proporcionadas por baculovirus y la célula anfitriona es una célula de insecto (p. ej., células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9)).

En algunas realizaciones, las partículas de rAAV se pueden producir mediante un método de transfección triple, tal como el método de transfección triple ilustrativo proporcionado más abajo. En resumen, un plásmido que contiene un gen rep y un gen de la cápside, junto con un plásmido adenoviral auxiliar, se pueden transfectar (p. ej., utilizando el método del fosfato de calcio) a una línea celular (p. ej., células HEK-293), y los virus se puede recoger y opcionalmente purificar. Como tal, en algunas realizaciones, la partícula de rAAV se produjo mediante transfección triple de un ácido nucleico que codifica el vector de rAAV, un ácido nucleico que codifica rep y cap de AAV, y un ácido nucleico que codifica funciones de virus auxiliar de AAV a una célula anfitriona, en donde la transfección de los ácidos nucleicos a las células anfitrionas genera una célula anfitriona capaz de producir partículas de rAAV.

En algunas realizaciones, las partículas de rAAV pueden ser producidas mediante un método de línea celular productora, tal como el método de línea celular productora ilustrativo proporcionado más abajo (véase también (referenciado en Martin *et al.*, (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269). En resumen, una línea celular (p. ej., una línea de células HeLa) puede ser transfectada establemente con un plásmido que contiene un gen

rep, un gen de la cápside, y una secuencia de ácido nucleico promotora-heteróloga. Las líneas celulares se pueden escrutar para seleccionar un clon principal para la producción de rAAV, que a continuación se puede expandir a un bioreactor de producción e infectar con un adenovirus (p. ej., un adenovirus de tipo salvaje) como auxiliar para iniciar la producción de rAAV. El virus puede ser cosechado con posterioridad, el adenovirus se puede inactivar (p. ej., con calor) y/o eliminar, y las partículas de rAAV se pueden purificar. Como tal, en algunas realizaciones, la partícula de rAAV fue producida por una línea celular productora que comprende una o más del ácido nucleico que codifica el vector de rAAV, un ácido nucleico que codifica rep y cap de AAV, y un ácido nucleico que codifica las funciones del virus auxiliar de AAV.

En algunos aspectos, se proporciona un método para producir cualquier partícula de rAAV en la presente memoria que comprende (a) cultivar una célula anfitriona en las condiciones en las que se producen partículas de AAV, en donde la célula anfitriona comprende (i) uno o más genes de empaquetamiento de AAV, en donde cada uno de dichos genes de empaquetamiento de AAV codifica una proteína replicación y/o encapsidación de AAV; (ii) un pro-vector de rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un ARNi de la presente descripción como se describe en la presente memoria flanqueado por al menos una ITR de AAV, y (iii) una función auxiliar de AAV; y (b) recuperar las partículas de rAAV producidas por la célula anfitriona. En algunas realizaciones, el ARNi comprende la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO:7. En algunas realizaciones, dicha al menos una ITR de AAV se selecciona del grupo que consiste en las ITR de la cápside de AAV de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino, o AAV de ratón o similares. En algunas realizaciones, dicha proteína de encapsidación se selecciona del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6 (p. ej., una cápside de AAV6 de tipo salvaje, o una cápside de AAV6 variante tal como ShH10, como se describe en la Publicación de los Estados Unidos Pre-Concedida Núm. 2012/0164106), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9 (p. ej., una cápside de AAV9 de tipo salvaje, o una cápside de AAV9 modificada como se describe en la Publicación de los Estados Unidos Pre-Concedida Núm. 2013/0323226), AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, un mutante de la cápside de tirosina, un mutante de la cápside de unión a heparina, una cápside AAV2R471A, una cápside AAVAAV2/2-7m8, una cápside AAV DJ (p. ej., una cápside AAV-DJ/8, una cápside AAV-DJ/9, o cualquier otra de las cápsides descritas en la Publicación de los Estados Unidos Pre-Concedida Núm. 2012/0066783), una cápside de AAV2 N587A, una cápside de AAV2 E548A, una cápside de AAV2 N708A, una cápside de AAV V708K, una cápside de AAV de cabra, una cápside quimérica de

AAV1/AAV2, una cápside de AAV bovina, una cápside de AAV de ratón, una cápside rAAV2/HBoV1, o una cápside de AAV descritas en la Patente de los Estados Unidos Núm. 8.283.151 o la Publicación Internacional Núm. WO/2003/042397. En algunas realizaciones, una proteína de la cápside mutante mantiene la capacidad de formar una cápside de AAV. En algunas realizaciones, la proteína de encapsidación es una proteína de la cápside mutante en la tirosina de AAV5. En realizaciones adicionales, la partícula de rAAV comprende proteínas de la cápside de un serotipo de AAV de los Clados A-F. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside de AAV1 y un genoma recombinante que comprende ITR de AAV2, un mutante de ITR de AAV2 y un ácido nucleico que codifica un ARNi de la presente descripción. En una realización adicional, las partículas de rAAV son purificadas. El término “purificada” según se utiliza en la presente memoria incluye una preparación de partículas de rAAV desprovistas de al menos alguno de los otros componentes que también pueden estar presentes cuando las partículas de rAAV aparecen naturalmente o son preparadas inicialmente. De este modo, por ejemplo, las partículas de rAAV aisladas se pueden preparar utilizando una técnica de purificación para enriquecerlas a partir de una mezcla de origen, tal como un producto lisado de cultivo o sobrenadante de cultivo de producción. El enriquecimiento se puede medir de varias formas, tal como, por ejemplo, mediante la proporción partículas resistentes de ADNasa (DRP) o copias de genoma (cg) presentes en una solución, o mediante infectividad, o se puede medir con respecto a una segunda sustancia, potencialmente interferente presente en la mezcla de origen, tal como contaminantes, incluyendo la producción de contaminantes de cultivo o contaminantes del procedimiento, incluyendo virus auxiliares, componentes del medio, y similares.

Numerosos métodos son conocidos en la técnica para la producción de partículas de vectores adenovirales. Por ejemplo, para un vector adenoviral vaciado, el genoma del vector adenoviral y un genoma de adenovirus auxiliar se pueden transferir a una línea celular de empaquetamiento (p. ej., una línea celular 293). En algunas realizaciones, el genoma de adenovirus auxiliar puede contener sitios de recombinación que flanquean su señal de empaquetamiento, y ambos genomas se pueden transfectar a una línea celular de empaquetamiento que expresa una recombinasa (p. ej., se puede utilizar el sistema Cre/loxP), de manera que el vector adenoviral de interés es empaquetado más eficientemente que el adenovirus auxiliar (véanse, p. ej., Alba, R. *et al.* (2005) *Gene Ther.* 12 Suppl 1:S18-27). Los vectores adenovector pueden ser cosechados y purificados utilizando métodos convencionales, tales como los descritos en la presente memoria.

Numerosos métodos son conocidos en la técnica para la producción de partículas de vectores lentivirales. Por ejemplo, para un vector lentiviral de tercera generación, un vector

que contiene el genoma lentiviral de interés con los genes gag y pol puede ser co-transfectado a una línea celular de empaquetamiento (p. ej., una línea celular 293) junto con un vector que contiene un gen rev. El genoma lentiviral de interés también contiene una LTR quimérica que promueve la transcripción en ausencia de Tat (véase Dull, T. *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:8463-71). Los vectores lentivirales pueden ser cosechados y purificados utilizando métodos (p. ej., Segura MM, *et al.*, (2013) *Expert Opin Biol Ther.* 13(7):987-1011) descritos en la presente memoria.

Numerosos métodos son conocidos en la técnica para la producción de partículas de HSV. Los vectores de HSV pueden ser cosechados y purificados utilizando métodos convencionales, tales como los descritos en la presente memoria. Por ejemplo, para un vector de HSV de replicación defectuosa, un genoma de HSV de interés que carece de todos los genes tempranos inmediatos (IE) puede ser transfectado a una línea celular de complementación que proporciona los genes requeridos para la producción de virus, tal como ICP4, ICP27, y ICP0 (véase, p. ej., Samaniego, L.A. *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:3307-20). Los vectores de HSV pueden ser cosechados y purificados utilizando los métodos descritos (p. ej., Goins, WF *et al.*, (2014) *Herpes Simplex Virus Methods in Molecular Biology* 1144:63-79).

También se proporcionan en la presente memoria composiciones farmacéuticas que comprenden una partícula viral recombinante que comprende un transgén que codifica un ARNi de la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas para cualquier modo de administración descrito en la presente memoria. Una composición farmacéutica de una partícula viral recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un ARNi de la presente descripción puede ser introducida al cerebro. Por ejemplo, una partícula viral recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un ARNi de la presente descripción puede ser administrada intraestriatalmente. Se puede utilizar cualquiera de las partículas virales recombinantes de la presente descripción, incluyendo partículas de rAAV, adenovirales, lentivirales, y de HSV.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden una partícula viral recombinante que comprende un transgén que codifica un ARNi de la presente descripción descrito en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable son adecuadas para su administración a seres humanos. Tales portadores son bien conocidos en la técnica (véanse, p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª Edición, págs. 1035-1038 y 1570-1580). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden un rAAV descrito en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable son adecuadas para la inyección al cerebro de un mamífero (p. ej., administración

intraestriatal). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden una partícula lentiviral recombinante descrita en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable son adecuadas para su inyección al cerebro de un mamífero (p. ej., administración intraestriatal). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden una partícula adenoviral recombinante descrita en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable son adecuadas para su inyección al cerebro de un mamífero (p. ej., administración intraestriatal). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden una partícula de HSV recombinante descrita en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable son adecuadas para su inyección al cerebro de un mamífero (p. ej., administración intraestriatal).

Tales portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceite, incluyendo aquellos que tienen origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, y similares. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa, polietilenglicol (PEG) y glicerol como portadores líquidos, particularmente para las soluciones inyectables. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente ingredientes adicionales, por ejemplo conservantes, tampones, agentes isotónicos, antioxidantes y estabilizadores, agentes humectantes o clarificantes, agentes para aumentar la viscosidad, y similares. Las composiciones farmacéuticas descrita en la presente memoria se pueden envasar en formas de dosificación unitaria o multidosis. Las composiciones se formulan generalmente en forma de solución estéril y sustancialmente isotónica.

VII. Artículos de Manufactura y Kits

También se proporcionan kits o artículos de manufacture para su uso en los métodos descritos en la presente memoria. En algunos aspectos, los kits comprenden las composiciones descritas en la presente memoria (p. ej., una partícula viral recombinante de la presente descripción, tal como una partícula de rAAV que comprende ácido nucleico que codifica un ARNi de la presente descripción) en envases adecuados. Los envases adecuados para las composiciones (tales como composiciones intraestriatales) descritas en la presente memoria son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, viales (tales como viales sellados), vasos, ampollas, botellas, frascos, empaquetamiento flexible (p. ej., bolsas de Mylar o plástico selladas), y similares. Estos artículos de manufactura se pueden esterilizar y/o sellar adicionalmente.

La presente invención también proporciona kits que comprende las composiciones descritas en la presente memoria y pueden comprender adicionalmente instrucciones sobre los métodos de uso de la composición, tales como los usos descritos en la presente memoria. Los kits descritos en la presente memoria pueden incluir adicionalmente otras sustancias

deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos con instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el kit comprende una composición de partículas virales recombinantes que comprenden un transgén que codifica un ARNi de la presente descripción para el suministro de al menos 1×10^9 copias de genoma al cerebro de un mamífero (p. ej., a través de administración intraestriatal) a un primate como se describe en la presente memoria, un portador farmacéuticamente aceptable adecuado para su inyección al cerebro de un primate, y uno o más de: un tampón, un diluyente, un filtro, una aguja, una jeringa, y un prospecto con instrucciones para llevar a cabo las inyecciones al cerebro de un primate (p. ej., administración intraestriatal). En algunas realizaciones, el kit comprende instrucciones para el tratamiento de la enfermedad de Huntington con las partículas virales recombinantes descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, el kit que comprende instrucciones para el uso de las partículas virales recombinantes descrita en la presente memoria de acuerdo con uno cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

EJEMPLOS

La invención se comprenderá más completamente mediante la referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, éstos no se deben considerar limitantes del alcance de la invención. Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritos en la presente memoria tienen fines meramente ilustrativos y que, a la luz de los mismos, serán sugeridos modificaciones o cambios a los expertos en la técnica y se deben incluir dentro del espíritu y el ámbito de esta solicitud y el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: AAV2/1-miARN-Htt reduce la expresión de Htt *in vitro*.

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa dominante autosómica fatal causada por el incremento en el número de restos de poliglutamina en la proteína huntingtina (Htt). Con la identificación de la base subyacente de la EH, se están desarrollando terapias que reducen la expresión de la Htt mutante causal. El ARN de interferencia (ARNi) que pretende reducir selectivamente la expresión de tales agentes causantes de la enfermedad está emergiendo como una estrategia terapéutica potencial para este trastorno y trastornos similares. Con el fin de examinar los beneficios de la terapia con ARNi en un modelo de ratón de EH, se incluyó una secuencia de direccionamiento que se había demostrado previamente que dirigía de manera eficaz los ARN de Htt de ratón y humano (McBride *et al.*, (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:5868-5873) en un esqueleto de miARN artificial y se clonó en un vector previral.

Métodos

Animales

Todos los procedimientos se llevaron a cabo utilizando un protocolo aprobado por el Institutional Animal Care and Use Committee at Genzyme, una Compañía de Sanofi (Department of Health and Human Services, Publicación NIH 86–23). Los ratones utilizados incluyeron ratones YAC128 (un cromosoma artificial de levadura que alberga el transgén *HTT* mutante humano completo con 128 repeticiones CAG en un fondo de FVB/NJ puro) y ratones de la camada FVB/NJ (Slow *et al.*, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567; Van Raamsdonk *et al.*, (2005) *Hum. Mol. Genet.* 3823-3835). Tanto los ratones YAC128 como las camadas FVB/NJ se obtuvieron de una colonia de Genzyme que estaba alojada en los Laboratorios Charles River. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h con alimento y agua disponibles *ad libitum*. Todo el ensayo de comportamiento se llevó a cabo durante el ciclo de luz de los animales (entre las horas 8 am y 4 pm).

Vectores plasmídicos y virales

Para generar vectores de serotipo AAV2/1 recombinante que codifican horquillas basadas en miARN contra el gen de huntingtina (AAV2/1-miARN-Htt), se clonó el miARN para la *HTT* humana en un plásmido lanzadera que contenía las repeticiones terminales invertidas (ITR) AAV2, la poliA de la hormona de crecimiento bovina, y el potenciador de citomegalovirus de 1,6 kb/promotor de β -actina de pollo (CBA). El armazón para el miARN fue el Invitrogen™ BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA). Los vectores de control contenían el esqueleto del vector vacío (AAV2/1-Nulo) o expresaban una proteína fluorescente verde intensificada bajo el control del mismo promotor (AAV2/1-eGFP). Todos los vectores virales fueron generados mediante la triple co-transfección del plásmido de células 293 humanas como se ha descrito previamente (Xiao *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:2224-2232), y los viriones recombinantes fueron purificados en columna como se ha descrito previamente (Passini *et al.*, (2001) *J. Virol.* 75:12382-12392). Se determinó que el título resultante de AAV2/1-miARN-Htt era de $4,5 \times 10^{12}$ vg/ml, y el título de AAV2/1-Nulo era $2,3 \times 10^{12}$ vg/ml utilizando la PCR cuantitativa.

Procedimientos quirúrgicos

Los animales se anestesiaron utilizando isoflurano al 3% y se colocaron en una marco estereotáxico. Las inyecciones intracraneales se llevaron a cabo como se ha descrito previamente (Treleaven, C.M. *et al.* (2012) *Mol. Ther.* 20:1713-1723). En resumen, se inyectaron 2 μ l de los vectores virales recombinantes (AAV2/1-eGFP o AAV2/1-miARN-Htt) en el cuerpo estriado (AP, +0,50; ML, $\pm$ 2,00; DV, -2,5 desde el bregma y la dura; varilla de incisión, 0,0) utilizando una jeringa Hamilton de 10 μ l a la velocidad de 0,5 μ l/min. La aguja se dejó en el lugar duran 1 minuto después de completar la infusión. Una

hora antes de la cirugía y 24 h después de la cirugía, se administró subcutáneamente cetoprofeno (5 mg/kg) a los ratones para la analgesia.

Perfusión del animal y recogida de tejido

Los ratones fueron perfundidos a través del corazón con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar toda la sangre. Los cerebros se cortaron sagitalmente a lo largo de la línea media, y el hemisferio izquierdo se fijó posteriormente en paraformaldehído al 4% seguido de sacarosa al 30% y después se seccionó en secciones de 20 µm utilizando un criostato. El hemisferio derecho se cortó a lo largo del eje coronal en porciones de 2-mm utilizando una matriz de cerebro de ratón (Harvard Apparatus, Holliston, MA) y después se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso. Para el análisis de los agregados de Htt, los cerebros se fijaron posteriormente en paraformaldehído al 4% durante 48 h, se lavaron con PBS, y a continuación se seccionaron en secciones coronales de 40 µm utilizando vibratomo.

Cultivo celular y transfección

Se infectaron células HEK293 con 5 x 10⁹ vg de AAV2/1-eGFP o AAV2/1-miARN-Htt y se cosecharon 3 días más tarde. Se midieron los niveles de ARN mediante RT-PCR en tiempo real cuantitativa. El ARN total se aisló utilizando TaqMan® Cells-to-CT™ Kit (Ambion). Las reacciones de Q-PCR se llevaron a cabo y se analizaron en un ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems) como se ha descrito previamente (Kordasiewicz, H.B. *et al.* (2012) *Neuron* 74:1031-1044). Los niveles de expresión se normalizaron a los niveles de PPIA (peptidilprolil isomerasa).

PCR en tiempo real cuantitativa (TaqMan)

Los niveles de ARN se midieron mediante RT-PCR en tiempo real cuantitativa. Se utilizaron muestras de tejido de cerebro de la porción de cerebro 2 para todos los análisis de RT-PCR. El ARN total se extrajo utilizando el QIAGEN RNEasy Mini Kit y después se sometió a transcripción inversa y se amplificó utilizando TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para detectar el ARNm de Htt de ratón, se utilizó el siguiente conjunto de sondas: Mm01213820_m1 (Life Technologies Núm. Cat. 4331182). Para detectar el ARNm de Htt humana, se utilizaron los siguientes oligos: 5'- ctccgtccggtagacatgct -3' (cebador directo, SEQ ID NO: 9); 5'- ggaaatcagaaccctcaaatgg-3' (cebador inverso, SEQ ID NO: 10); y 5'- ttagcactgttcaactgtgtatcgga-3' (sonda, SEQ ID NO: 11). Las reacciones de RT-PCR cuantitativa se llevaron a cabo y se analizaron en un ABI PRISM® 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Los niveles de expresión del ARNm de Htt se normalizaron a los niveles de ARNm de hipoxantina guanina fosforribosil transferasa 1 (Hprt1). Se generaron curvas patrón utilizando diluciones seriadas 1:5 de ADNc de cerebro de ratón.

Cada muestra se ejecutó pro duplicado. La expresión génica relativa se determinó utilizando la curva patrón o el método $\Delta\Delta CT$ y normalizando a los niveles de ARNm de Hprt1.

Transferencia Western

Los tejidos se homogeneizaron a una concentración final de 50 mg/ml en tampón de lisis T-Per (Pierce) y contenían el cóctel inhibidor de proteasa completo (Roche). Los productos homogeneizados se aclararon mediante centrifugación a $10.000 \times g$ durante 6 min a 4°C. La concentración de proteína se midió utilizando el análisis BSA (Pierce). Se resolvieron de veinte a treinta microgramos de los productos homogeneizados sobre un gel de tris-acetato Novex al 3-8% y a continuación se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se sondearon con un anticuerpo monoclonal anti-huntingtina de ratón (Mab2166; dilución 1:2.000, Millipore) y anticuerpo policlonal anti- β -tubulina de conejo (dilución 1:750, Santa Cruz Biotechnology). Las membranas se incubaron a continuación con anticuerpos secundarios infrarrojos (dilución 1:20.000, Rockland), y las proteínas se visualizaron mediante fluorescencia cuantitativa utilizando Odyssey (LI-COR Biosciences). Para controlar las diferencias de carga, la proteína Htt se normalizó a β -tubulina y se expresó como un porcentaje de animales no tratados y tratados con solución salina. Se utilizaron marcadores de peso molecular para verificar la identidad de las proteínas.

Citometría de flujo y clasificación celular (clasificación celular FCM)

Se analizaron suspensiones de una sola célula y se aislaron utilizando el clasificador celular FACS Aria II (BD Biosciences San Jose, CA) con una boquilla de 100 μm en Genzyme Flow Cytometry Core Facility (una Compañía de Sanofi). El análisis de las células se realizó discriminando las células individuales vivas de los desechos celulares mediante selección en el Forward Scatter (FWD-Sc) y el Side Scatter (SSC). Las células positivas para EGFP se recogieron utilizando el detector E con un filtro 530/30 BP 505LP. El perfil de datos de la fluorescencia de la EGFP se presentó como un histograma de un solo parámetro y las decisiones de la clasificación se basaron en EGFP⁻ y EGFP⁺. Las células clasificadas se recogieron en medio de cultivo de tejidos que contenía suero bovino fetal al 5% y se cultivaron en placa sobre portaobjetos con cámaras de 4 pocillos (LabTek, Nalge Nunc International, Naperville, Ill) a una concentración de 50.000 células/pocillo.

Inmunohistoquímica

Las secciones del vibratomo se procesaron para la inmunotinción mediante EM48, un anticuerpo que reconoce preferentemente la huntingtina agregada (Gutekunst *et al.*, (1999) *J. Neurosci.* 19:2522-2534). Las secciones que flotaban libremente se trataron primero con Dual Endogenous Enzyme Block (Dako) durante 30 min para bloquear la actividad peroxidasa endógena. A continuación se lavaron con PBS 0,01 M PBS (3 min)

seguido de tres lavados con Triton X-100 al 0,5% en PBS de 10 min cada uno. Los sitios no específicos se bloquearon incubando las secciones en Rodent Block M durante 1 h a la temperatura ambiente. Las secciones se sondearon con el anticuerpo EM48 (Millipore, dilución 1:25 en PBS) incubando en una cámara fría a 4°C sobre un aparato de balanceo suave durante la noche. Al día siguiente, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario (MM HRP Polymer, Biocare Medical) durante 1 h a la temperatura ambiente en un aparato de balanceo. Después de tres lavados en PBS de 15 min cada uno, se detectó la señal utilizando DAB Peroxidase Substrate Kit (Vector). Después de los lavados, las secciones se montaron sobre portaobjetos Superfrost Plus, se secaron durante la noche y se cubrieron con medio de montaje Acrytol.

Análisis de comportamiento

Ensayo de la varilla de rotación en aceleración: La coordinación motora y el aprendizaje motor se evaluaron en un aparato con varilla de rotación en aceleración (AccuScan Instruments). Los ratones se entrenaron sobre la varilla de rotación con tres pruebas al día durante 3 días consecutivos. El primer día de entrenamiento, la varilla de rotación se ajustó para que acelerara de 0 a 5 RPM a lo largo de 300 seg. Los ratones que cayeron de la varilla antes de completarse el período de tiempo de 300 seg se volvieron a colocar sobre la varilla hasta que hubo expirado el período de 300 seg completo. El segundo y el tercer día de entrenamiento, la varilla de rotación se ajustó para que acelerara de 0 a 40 RPM a lo largo de 300 seg, requiriendo de nuevo que todos los ratones completaran los 300 seg completos sobre la varilla. El cuarto día (día del ensayo), los ratones se colocaron sobre la varilla de rotación ajustada para acelerar de 0 a 40 RPM a lo largo de 300 seg. Los animales no se recolocaron después de caer, y se registró la latencia en la caída en los tres ensayos. La latencia en la caída se definió por el tiempo transcurrido hasta que el animal cayó de la varilla de rotación.

Ensayo de natación de Porsolt: La inmovilidad en el ensayo de natación de Porsolt se utilizó como una medida de la depresión en roedores (Porsolt *et al.*, (1977) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 229:327-336, Cryan *et al.*, (2002a) *Trends Pharmacol. Sci.* 23:238-245, Cryan *et al.*, (2002b) *Eur. J. Pharmacol.* 436:197-205). El ensayo se llevó a cabo colocando los ratones en cilindros de vidrio individuales (20 cm altura × 10 cm de diámetro) llenos de agua a 23°C hasta una altura de 15 cm. Los ratones se colocaron dentro de los cilindros durante un período de 7 min. Los primeros 3 min de este período se consideraron un período de aclimatación, momento durante lo cual no se recogieron datos. Durante los últimos 4 min de la sesión de ensayo, se puntuó la actuación de los ratones por un observador ciego utilizando una técnica de muestreo en el tiempo para clasificar el comportamiento predominante a lo largo de intervalos de 10 seg. Los comportamientos de natación e

inmovilidad se midieron y se registraron al final de cada 10 seg, lo que dio como resultado 24 puntos de datos por ensayo. El porcentaje de tiempo empleado en un estado inmóvil se calculó para cada ratón

Estadística

5 Se utilizaron los valores medios para los análisis estadísticos. Los datos se expresan como la media $\pm$ ETM. Para los estudios que utilizaban dos, se utilizó el Test de la t de Student para la comparación estadística. Para las comparaciones de más de dos grupos, se utilizó ANOVA de una vía, seguido de Test post-hoc de comparación múltiple de Tukey (Prism GraphPad). $p < 0,05$ se consideró una diferencia estadísticamente significativa.

10 Resultados

El plásmido se modificó genéticamente para expresar el miARN que se dirigía a Htt y un gen informador de GFP potenciado (eGFP) bajo el control transcripcional de un promotor de de beta-actina de pollo (CBA) (pSP70-CBA-EGFP) como se ilustra en la **FIG. 1A**. La secuencia de direccionamiento candidata, que se seleccionó a partir de la región codificante de Htt, fue 5'- TAGACAATGATTACACGGT -3'. Se generaron vectores AAV2/serotipo 1 recombinantes de alto título que codificaban la secuencia de direccionamiento (AAV2/1-miARN-Htt) y vectores de control (AAV2/1-eGFP y AAV2/1-Nulo) y se sometieron a ensayo sus actividades de silenciamiento génico infectando células 293 de riñón embrionario humano (HEK). Las células se infectaron con 5×10^9 vg de vectores AAV. Utilizando el análisis de clasificación celular activado por fluorescencia (FACS) se confirmó que esta dosis daba como resultado eficacias de infección de más de 90% en las células HEK293 después de la infección con AAV-eGFP-miARN-HTT (**FIGS. 2A-D**). Las células infectadas con AAV2/1-eGFP no mostraron ninguna reducción de los niveles de Htt endógena cuando se analizaron mediante PCR en tiempo real a los 3 días de la infección; sin embargo, las células infectadas con AAV2/1-miARN-Htt mostraron una reducción de aproximadamente 40% en los niveles de ARNm de Htt (**FIG. 1B**).

Ejemplo 2: La inyección de AAV2/1-miARN-Htt en ratones YAC128 da como resultado una transducción estriatal generalizada y una reducción del ARNm de Htt.

Tras la verificación de la capacidad de AAV2/1-miARN-Htt para suprimir los niveles de ARNm de Htt *in vitro*, se evaluó la capacidad de este vector para silenciar la expresión de Htt en el cuerpo estriado de ratones YAC128. Para determinar el porcentaje de transducción de las células dentro del cuerpo estriado después de las inyecciones intra-estriales de AAV2/1-miARN-Htt, se empleó la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1.

35 Resultados

Los ratones YAC128 adultos recibieron inyecciones intra-estriatales bilaterales de AAV2/1-eGFP-miARN-Htt ($4,5 \times 10^{12}$ vg/ml) o el vector de control, AAV2/1-eGFP ($5,6 \times 10^{12}$ vg/ml). Un mes después de la inyección, la región estriatal de cada animal se microdisecionó y las células que contenían eGFP frente a las que no contenían eGFP se clasificaron y se cuantificaron mediante análisis FACS (**FIGS. 3A&B**). Los datos demostraron que más de 80% del cuerpo estriado había sido transducido por el vector como demuestra la presencia de eGFP dentro de la mayoría de las células estriatales clasificadas (**FIG. 3C**).

Con el fin de evaluar la capacidad del vector para reducir Htt *in vivo* y controlar la longevidad de la respuesta, los ratones adultos recibieron inyecciones intra-estriatales bilaterales de AAV2/1-miARN-Htt ($4,5E12$ vg/ml) (N=16, N=8+8 por punto temporal) o el vector de control AAV2/1-Nulo ($2,3E12$ vg/ml) (N=8), y los cerebros se analizaron 1 o 5 meses después del tratamiento. El análisis de microscopía de fluorescencia de las secciones de cerebro de los ratones tratados con AAV2/1-miARN-Htt en ambos puntos temporales mostró una fluorescencia de eGFP generalizada en todo el cuerpo estriado y las regiones circundantes del cerebro, compatible con el análisis FACS sugiriendo una transducción estriatal casi completa (**FIG. 3D**). Los niveles de expresión de eGFP en los cerebros de los ratones alcanzados 1 mes después del tratamiento parecían no disminuir en el momento puntual de 5 meses (**FIG. 3D**). Los niveles estriatales de ARNm de Htt humana mutante se redujeron significativamente en los ratones a los que se había inyectado AAV2/1-miARN-Htt cuando se compararon con los controles tratados con AAV2/1-Nulo y se observó un grado equivalente de reducción (aproximadamente 45%, $p<0,01$) en ambos puntos temporales (**FIG. 3E**). Los niveles estriatales de ARNm de Htt de ratón endógeno se redujeron significativamente después de AAV2/1-miARN-Htt cuando se compararon con los controles tratados con AAV2/1-Nulo. Se observó un grado equivalente de reducción (aproximadamente 45%, $p<0,01$) en ambos puntos temporales (**FIG. 4**).

Ejemplo 3: La inyección con AAV2/1-miARN-Htt en ratones YAC128 no causa toxicidad manifiesta en el cerebro.

Para determinar si las inyecciones de AAV2/1-miARN-Htt y la posterior reducción de Htt conferían neurotoxicidad e inflamación, se examinaron la morfología y la integridad celulares de las secciones estriatales por medio de tinción con hematoxilina y eosina (H y E) de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1. También se examinaron los niveles de los marcadores neuroinflamatorios proteína ácida fibrilar glial (GFAP, un marcador de astrocitos) a Iba-1 (un marcador de microglia) a los 1 y 5 meses del tratamiento.

Resultados

El análisis mediante H y E no mostraron cambios histopatológicos notables en las regiones del cerebro que habían recibido inyección (**FIGS. 5A-C**). No se observaron incrementos notables en el número de astrocitos GFAP positivos (visualizados mediante inmunohistoquímica) o en los niveles de ARNm de GFAP (cuantificados mediante QPCR) en las regiones que habían recibido inyecciones a los 1 o 5 meses de la inyección cuando se compararon con los animales tratados con AAV2/1-Nulo (**FIGS. 5D-F; FIG. 5J**). No obstante, se observó un incremento en la cantidad de microglia activada, evidenciado por un incremento en la inmunotinción de Iba-1 (**FIG. 5H**) y los niveles de ARNm de Iba-1 en el cuerpo estriado 1 mes después de la inyección (**FIG. 5K**). Curiosamente, a los 5 meses de la inyección, la activación de la microglia volvió a los niveles de control (**FIGS. 5I y 5K**), sugiriendo que la respuesta era transitoria. Sin desear estar ligado a ninguna teoría, como el vector de control AAV2/1-Nulo utilizado en este estudio no albergaba un gen eGFP, se pensó que la expresión de eGFP a partir de AAV2/1-miARN-Htt era probablemente responsable de la activación transitoria de la microglía.

Tomados juntos, estos resultados corroboran y amplían los descubrimientos de que AAV2/1-miARN-Htt es capaz de mediar el silenciamiento de Htt sostenido no solamente *in vitro* si no también en el cuerpo estriado de ratones YAC128. Por otra parte, la supresión parcial de los niveles de Htt hasta durante 5 meses no condujo a toxicidad manifiesta o a neuroinflamación en el cerebro de ratón.

Ejemplo 4: La liberación estriatal de AAV2/1-miARN-Htt corrige el comportamiento aberrante y los perfiles neuroquímicos en ratones YAC128.

También se examinó el impacto de la reducción mediada por AAV de los niveles de Htt mutante sobre los déficits fenotípicos bien caracterizados que están presentes en el modelo de ratón YAC128 de EH de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1. Se ha informado de que los ratones YAC128 muestran déficits de coordinación motora (que pueden ser revelados utilizando el ensayo de la varilla giratoria) y un fenotipo depresivo (utilizando el ensayo de natación de Porsolt) que comienzan a los 3 meses de edad (Slow *et al.*, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567; Van Raamsdonk *et al.*, (2007) *Neurobiol Dis* 26:189-200).

Resultados

Ratones de la misma camada YAC128 y de tipo salvaje de edades coincidentes (2 meses de edad) recibieron inyecciones intraestriatales bilaterales de AAV2/1-miARN-Htt o vector AAV2/1-Nulo y a continuación se sacrificaron a los 3 meses de tratamiento (**FIG. 6A**). Como se esperaba, un análisis de las secciones de los cerebros demostró la expresión de eGFP en todo el cuerpo estriado y en las regiones circundantes, como se había observado previamente (**FIG. 6B**). El análisis de transferencia Western de los productos

homogeneizados de cerebro mostró que los niveles de las proteínas Htt tanto humana mutante como de ratón endógena se habían reducido significativamente en los cuerpos estriados de los ratones YAC128 como de tipo salvaje a los que se había inyectado AAV2/1-miARN-Htt (aproximadamente una reducción de 55%, $p<0,01$) cuando se compararon con
5 controles tratados con AAV2/1-Nulo (**FIGS. 6C y D**). El análisis por PCR cuantitativo en tiempo real indicó que también se había logrado una reducción proporcional en los niveles de ARNm.

El ensayo con la varilla giratoria de los ratones YAC128 tratados con AAV2/1-Nulo a los 2 meses de la inyección mostró déficits de coordinación motora significativos cuando
10 se compararon con camadas de tipo salvaje tratadas con AAV2/1-Nulo o AAV2/1-miARN-Htt (ANOVA, $p<0,01$) (**FIG. 6E**). Sin embargo, los ratones YAC128 que habían sido tratados con AAV2/1-miARN-Htt mostraron niveles de actuación que no eran distinguibles de los de los ratones de tipo salvaje (ANOVA, post-hoc de Tukey; WT Htt vs. YAC128 Htt, $p=NS$; WT Nulo vs. YAC128 Nulo, $p<0,05$). Por consiguiente, una disminución parcial de
15 los niveles de Htt mutante fue suficiente para corregir los déficits motores de los ratones YAC128. No hubo diferencias significativas en la actuación en la varilla giratoria entre los ratones de tipo salvaje que recibieron AAV2/1-miARN-Htt y los ratones de tipo salvaje que recibieron AAV2/1-Nulo.

Los informes anteriores indicaron que los ratones YAC128 (empezando a los 3
20 meses de edad) muestran un fenotipo depresivo que puede ser detectado utilizando el ensayo de natación de Porsolt (Pouladi *et al.*, (2009) *Brain* 132:919-932). Se considera que los animales muestran un estado depresivo si permanecen inmóviles durante un período de tiempo prolongado cuando se colocan en un recipiente con agua. Utilizando un ensayo de velocidad de natación básico (en el que se midió la latencia al nadar para alcanzar una
25 plataforma), los investigadores han demostrado que este fenotipo depresivo en el ensayo de natación de Porsolt no está relacionado con la capacidad para nadar de los ratones YAC128 y es independiente de los déficits de coordinación motora bien documentados observados en este modelo (Pouladi *et al.*, (2009) *Brain* 132:919-932). Se inyectaron a ratones de una camada YAC128 y WT de dos meses de edad vectores AAV2/1-miARN-Htt o AAV2/1-
30 Nulo y se sometieron a ensayo 3 meses más tarde en el ensayo de natación de Porsolt. Los ratones YAC128 no tratados presentaron un aumento del período de tiempo en estado inmóvil cuando se compararon con los ratones YAC tratados con AAV2/1-miARN-Htt o con animales de tipo salvaje tratados con AAV2/1-Nulo (**FIG. 6F**; ANOVA $p<0,05$). De nuevo, no hubo diferencias significativas en la actuación de los ratones de tipo salvaje que
35 recibieron AAV2/1-miARN-Htt o AAV2/1-Nulo. Los ratones YAC128 a los que se había inyectado AAV2/1-miARN-Htt emplearon significativamente menos tiempo en el estado

inmóvil que los controles tratados con AAV2/1-Nulo. En efecto, la actuación de los ratones YAC128 tratados con AAV2/1-miARN-Htt fue similar al de sus hermanos de camada de tipo salvaje, sugiriendo una corrección casi completa de este fenotipo aberrante (ANOVA, post-hoc de Tukey; YAC Htt vs. YAC Nulo, $p<0,05$) (FIG. 6F).

5 **Ejemplo 5: El tratamiento utilizando AAV2/1-miARN-Htt corrige parcialmente la disregulación transcripcional de DARPP-32 y el receptor D1 en ratones YAC128.**

Se ha observado la disregulación transcripcional de numerosos genes enriquecidos en el cuerpo estriado en cerebros de EH (Richfiel *et al.*, (1995) *Ann. Neurol.* 37:335-343; Augood *et al.*, (1997) *Ann. Neurol.* 42:215-221; Sugars *et al.*, (2004) *J. Biol. Chem.* 279:4988-4999; Desplats *et al.*, (2006) *J. Neurochem.* 96:743-757). Esta aberración también es evidente en ratones YAC128, como ilustran, en particular, sus niveles estriatales significativamente menores de DARPP-32 y receptores de dopamina D1 en comparación con los animales de tipo salvaje (Pouladi *et al.*, (2012) *Mol. Genet.* 21:2219-2232). Para examinar si la supresión de los niveles de Htt en ratones YAC128 corregía este perfil transcripcional alterado, se llevó a cabo un análisis por PCR cuantitativa en tiempo real sobre tejidos estriatales de ratones YAC128 que habían sido tratados a los 2 meses de edad con AAV2/1-miARN-Htt y analizaron 3 meses más tarde de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1.

Resultados

20 Un análisis de los extractos de cerebro de ratones YAC 128 tratados con AAV2/1-Nulo indicó que los niveles de ARNm de DARPP-32 y receptor de dopamina D1 (D1R) fueron significativamente inferiores cuando se compararon con controles de tipo salvaje de edad coincidente (ANOVA, post-hoc de Tukey; WT Nulo vs. YAC128 Nulo, $p<0,05$) (FIGS. 7A y B). Los ratones YAC128 a los que se había administrado AAV2/1-miARN-Htt mostraron niveles superiores de ARNm de DARPP-32 y D1R que aquellos tratados con el vector AAV2/1-Nulo; sin embargo, estos niveles todavía fueron inferiores a los observados en los controles de tipo salvaje (ANOVA, post-hoc de Tukey; WT Nulo vs. YAC Htt, $p=NS$). De este modo, la reducción mediada por AAV2/1-miARN-Htt de los niveles de Htt en ratones YAC128 confirió una corrección parcial del perfil transcripcional estriatal aberrante. Es posible que el examen en los últimos puntos temporales (más de 5 meses después del tratamiento) pueda revelar una corrección más completa de este perfil aberrante.

Juntos, estos resultados corroboran los primeros descubrimientos *in vitro* e *in vivo* de que AAV2/1-miARN-Htt es capaz de mediar una disminución sostenida de los niveles de Htt. De manera importante, se demostró que esta reducción en los niveles de Htt estriatales en ratones YAC 128 da como resultado mejoras medibles en la función motora y el

comportamiento así como una corrección parcial de la desregulación transcripcional bien caracterizada en el cuerpo estriado.

Ejemplo 6: El suministro estriatal de AAV2/1-miARN-Htt reduce los agregados de Htt en los cerebros de ratones YAC128.

5 La apariencia de los agregados de Htt y cuerpos de inclusión en el SNC es un sello neuropatológico de la EH. La disminución de los niveles de estos agregados en ratones con EH se ha correlacionado con mejoras notables en la patología (Harper *et al.*, (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5820-5825; Rodriguez-Lebron *et al.*, (2005) *Mol. Ther.* 12:618-633). El modelo de ratón YAC128 supuestamente muestra una acumulación significativa y
10 generalizada de agregados de Htt en el cuerpo estriado a los 12 meses de edad (Slow *et al.*, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567, Pouladi *et al.*, (2012) *Hum. Mol. Genet.* 21:2219-2232). El impacto del suministro de AAV2/1-miARN-Htt sobre los agregados de Htt en ratones YAC128 se examinó de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1.

Resultados

15 La tinción inmunohistoquímica de secciones de cerebro de ratones YAC128 de 6, 9, y 24 meses de edad utilizando el anticuerpo anti-Htt EM48 mostró evidencia de agregados tanto en el cuerpo estriado como en el córtex tan pronto como a los 6 meses de edad que progresaron con el tiempo (**FIG. 8A**). También se analizaron tejidos de doce meses de edad (secciones congeladas de 16 micras) y se demostró que tenían un grado similar de agregados
20 que la cohorte de 24 meses de edad; no obstante, la tinción de fondo no específica en las secciones congeladas fue significativamente superior que en las secciones de vibratomo (datos no mostrados).

 Para examinar si la reducción mediada por AAV de los niveles de Htt mutante disminuían el grado de acumulación de agregados de Htt en los cerebros de ratones YAC128
25 post-sintomáticos (7 meses de edad) y, a su vez, corregía los déficits motores y de comportamiento, los ratones se sometieron a inyecciones intra-estriatales bilaterales de AAV2/1-miARN-Htt o AAV2/1-GFP. Los animales se sometieron a ensayo sobre la varilla giratoria a los 3 meses de la inyección (los animales tenían 10 meses de edad) y se sacrificaron a los 5 meses de la inyección (cuando los ratones tenían 12 meses de edad)
30 (**FIG. 8B**). Los ratones YAC128 tratados con AAV2/1-miARN-Htt sobre la varilla giratoria mostraron un nivel de competición que era comparable al de los miembros de sus camadas de tipo salvaje (**FIG. 8C**; ANOVA, post-hoc de Tukey; $p=NS$). No obstante, estos resultados no alcanzaron una significación estadística debido al bajo número de ratones utilizados en el estudio (N=4 WT; N=6 YAC128). la tinción inmunohistoquímica de las secciones estriatales
35 utilizando el anticuerpo EM48 mostraron la presencia de significativamente menos agregados de Htt en los ratones tratados con YAC128 AAV2/1-miARN-Htt que en los

tratados con AAV2/1-GFP (**FIG. 8D**). Los cerebros de los ratones YAC128 tratados con AAV-miARN-Htt fueron esencialmente indistinguibles de los de ratones de tipo salvaje.

Para confirmar que la reducción observada en los agregados con AAV2/1-miARN-Htt no se debía a la pérdida neuronal o a la neurotoxicidad potencial, se llevaron a cabo la tinción con H y E así como la tinción inmunohistoquímica para NeuN (marcador neuronal), GFAP (marcador astrocítico), y Iba1 (marcador microglial) sobre secciones de cerebro sagitales adyacentes. En comparación con los controles a los que se había inyectado AAV-2/1-Nulo, los animales a los que se había inyectado AAV2/1-miARN-Htt mostraron la misma abundancia de neuronas positivas para NeuN en el cuerpo estriado mediante microscopía fluorescente. Utilizando la microscopía óptica, la tinción con H y E de secciones de cerebro coronales adyacentes también parecía normal y proporcionaba una prueba fehaciente de esta carencia de pérdida neuronal; sin embargo, debido a que no se realizó la estereología, estos resultados no pudieron ser cuantificados. Adicionalmente, como se observó en estudios anteriores, no se detectó un incremento en la tinción de GFAP o Iba-1 en ratones tratados con AAV2/1-miARN-Htt a los 5 meses de la inyección.

Conclusiones

El presente estudio demostró que la disminución de los niveles de Htt mutante era una estrategia terapéutica para la EH y demostró que la reducción parcial de Htt mutante en el cuerpo estriado producía mejoras de comportamiento, bioquímicas, y neuropatológicas en un modelo de ratón completamente transgénico de EH, el modelo de ratón YAC128. Los esfuerzos anteriores en la evaluación de esta estrategia terapéutica se realizaron sobre modelos de ratón que albergaban fragmentos del gen *HTT* mutante, tales como los ratones con EH R6/1 y N171-82Q (Harper *et al.*, (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5820-5825, Rodriguez-Lebron *et al.*, (2005) *Mol. Ther.* 12:618-633, Machida *et al.*, (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:190-197). Una reducción parcial en los niveles de Htt mutante confería una modesta ventaja de supervivencia en algunos de los modelos más graves, tales como el modelo de ratón con EH N171-82Q, pero no en otros (p. ej., el modelo de ratón R6/1) (Harper *et al.*, (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5820-5825, Rodriguez-Lebron *et al.*, (2005) *Mol. Ther.* 12:618-633, Machida *et al.*, (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:190-197). También se observaron mejoras motoras en estos estudios utilizando los ensayos de la varilla giratoria y de la longitud de la zancada; sin embargo, la gravedad de estos modelos excluía la evaluación a largo plazo del tratamiento sobre las aberraciones del comportamiento, neuropatológicas, y bioquímicas.

El presente estudio utilizó el modelo de ratón YAC128 (este modelo alberga un gen *HTT* humano mutante que contiene 128 repeticiones CAG), que desarrolla anomalías motoras progresivas y neuropatología dependiente de la edad. En comparación con otros

modelos de ratón con EH, los ratones YAC128 están bien adaptados para someter a ensayo la eficacia terapéutica debido a que recapitulan los rasgos genéticos y clínicos destacados de la enfermedad en seres humanos. La historia natural de los cambios relacionados con la edad en ratones YAC128 está bien definida, y los animales muestran características de la enfermedad fenotípicamente uniformes que tienen una baja variabilidad entre animales. Los ratones YAC128 desarrollan un perfil transcripcional estriatal alterado, un rasgo que no se observa en otros modelos de ratón similares, tales como los ratones de EH BAD (Pouladi *et al.*, (2012) *Hum. Mol. Genet.* 21:2219-2232), y muestran una neurodegeneración estriatal dependiente de la edad. Como tal, el ensayo de las intervenciones terapéuticas y la medición de los resultados de este modelo pueden tener un valor más predictivo para la traducción clínico (Slow *et al.*, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567).

Utilizando los ratones YAC128, estos estudios demostraron que la expresión mediada por AAV2/1 de un miARN que se dirige a Htt humana mutante condujo a una reducción significativa en los niveles estriatales de ARNm y proteína Htt. Asociadas con la disminución de esta entidad objetable se encontraron las mejoras significativas de la función evaluadas utilizando los ensayos de la varilla giratoria y de natación de Porsolt a los 5 meses del tratamiento así como una reducción significativa en los productos agregados de Htt dentro del cuerpo estriado. Resulta notable que el nivel de reducción de Htt observado en estos estudios era solo aproximadamente 40% del control, indicando que una reducción parcial de la Htt mutante era suficiente para producir un beneficio terapéutico significativo en este modelo de ratón. Por otra parte, una transducción de 80% del cuerpo estriado con el vector AAV condujo solo a una reducción parcial de Htt. Se observó un fenómeno similar en células HEK293 en cultivo en las que eficacias de transducción de aproximadamente 90-95% solamente produjeron una reducción consiguiente de 40-50% en los niveles de Htt endógena (véanse las **FIGS. 2A-D**). Estos descubrimientos son compatibles con los estudios previos en roedores y primates que muestran solo una reducción parcial de los niveles de Htt utilizando estrategias comparables de silenciamiento basado en miARN (McBride *et al.*, (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:5868-5873; Boudreau *et al.*, (2009b) *Mol. Ther.* 17:1053-1063; McBride *et al.*, (2011) *Mol. Ther.* 19:2152-2162; Grondin *et al.*, (2012) *Brain* 135:1197-1209). Sin desear estar ligado a ninguna teoría, existen numerosas hipótesis potenciales en cuanto a por qué el miARN solamente produce una reducción parcial de la diana en la región transducida. El formato de tallo-bucle del miARN utilizado para mediar el silenciamiento de Htt requiere el procesamiento por la célula antes de generar ARN de interferencia pequeños funcionales. Este requerimiento de procesamiento celular puede de este modo ajustar los límites naturales sobre el grado de silenciamiento de ARN conferido por las horquillas basadas en miARN. Un informe de Boudreau *et al.* (Boudreau *et al.*,

(2009a) *Mol. Ther.* 17:169-175) describe la mayor seguridad de las plataformas basadas en miARN para el silenciamiento terapéutico en el cerebro de mamífero y destaca los mejores perfiles de toxicidad de los miARN en comparación con las estructuras en horquilla corta tradicionales. Esta mejora en la seguridad podría ser debida a la dependencia de los miARN de los mecanismos de procesamiento celular endógenos (Boudreau *et al.*, (2009a) *Mol. Ther.* 17:169-175). A pesar de estas hipótesis propuestas, todavía se desconoce qué mecanismos exactos están detrás del silenciamiento de Htt basado en miARN en el cerebro; no obstante los datos presentados aquí demuestran que la reducción parcial de Htt puede lograr beneficios terapéuticos, al menos en un modelo de ratón de EH.

Puesto que el papel funcional de Htt todavía no está claro, existe un problema obvio asociado con la utilización de estrategias terapéuticas que confieren silenciamiento no específico del alelo. Los estudios descritos en la presente memoria indicaron que la disminución parcial de la Htt de ratón endógena en el SNC de ratones de tipo salvaje, así como ratones YAC128 enfermos, hasta durante 5 meses, fue bien tolerada. La administración de AAV-miARN-Htt redujo la Htt del ratón de tipo salvaje y mutante humana aproximadamente 40%, permitiendo de ese modo la conservación de al menos 60% de los niveles de Htt de tipo salvaje, mientras todavía mantenía los beneficios terapéuticos del silenciamiento de la Htt tóxica mutante. No se observaron toxicidad manifiesta ni comportamientos aberrantes. Los datos actuales son compatibles con estudios previos que muestran una carencia similar de toxicidad después del silenciamiento de Htt no específico del alelo en ratones con EH y ratones de tipo salvaje hasta durante 9 meses después del tratamiento (Boudreau *et al.*, (2009b) *Mol. Ther.* 17:1053-1063). La seguridad de la supresión parcial de la Htt de tipo salvaje también ha sido referida en primates no humanos (McBride *et al.*, (2011) *Mol. Ther.* 19:2152-2162; Grondin *et al.*, (2012) *Brain* 135:1197-1209), proporcionando una mayor confianza en que la disminución parcial de niveles de Htt normal puede no conducir a consecuencias perjudiciales significativas. Este estudio demuestra adicionalmente que la supresión parcial (~40%) de Htt tanto mutante como de tipo salvaje en los ratones YAC128 fue terapéutica, como evidencia su actuación en una variedad de pruebas de comportamiento y no estaba asociada con ninguna cuestión adversa obvia. Los informes anteriores habían sugerido un papel para Htt en la embriogénesis y en la neurogénesis postnatal (Bhide *et al.*, (1996) *J. Neurosci.* 16:5523-5535; Reiner *et al.*, (2003) *Mol. Neurobiol.* 28:259-276; Cattaneo *et al.*, (2005) *Nat. Rev. Neurosci.* 6:919-930). Sin embargo, hasta la fecha varios estudios preclínicos demuestran que la reducción parcial de los niveles de Htt de tipo salvaje en cerebro adulto, parece ser bien tolerada tanto en ratones como en primates no humanos (Boudreau *et al.*, (2009b) *Mol. Ther.* 17:1053-1063; McBride *et al.*, (2011) *Mol. Ther.* 19:2152-2162; Grondin *et al.*, (2012) *Brain* 135:1197-1209).

Un distintivo notable de la patología de EH tanto en modelos de ratón como en pacientes humanos es la presencia de agregados inmunorreactivos (IR) con Htt mutante (DiFiglia *et al.*, (1997) *Science* 277:1990-1993; Scherzinger *et al.*, (1997) *Cell* 90:549-558). El papel preciso de los agregados dentro de la cascada de eventos patofisiológicos en la EH continúa siendo materia de debate (Lansbury *et al.*, (2006) *Nature* 443:774-779) y la sugerencia de una reacción causal entre los agregados de Htt mutante y la enfermedad siguen produciendo controversia (Bates, (2003) *Lancet* 361:1642-1644; Arrasate *et al.*, (2004) *Nature* 431:805-810). No obstante, existe el consenso de que la formación de agregados de proteína insoluble confiere un aumento de la carga sobre los procesos degradativos celulares (Yamamoto *et al.*, (2000) *Cell* 101:57-66). Los estudios descritos en la presente memoria demostraron que los ratones YAC128 presentaban agregados estriatales diseminados tan pronto como a los 6 meses de edad (antes de lo que se había referido anteriormente) y la inyección de AAV2/1-miARN-Htt a los 7 meses de edad (una vez que los agregados ya se han formado) redujo significativamente el número de agregados de Htt positivos para EM48 dentro del cuerpo estriado casi hasta los niveles de tipo salvaje. Estos datos sugieren, sin desear estar ligado a una teoría, que el tratamiento con AAV2/1-miARN-Htt puede disminuir la reserva disponible e Htt, aliviando significativamente la carga de los agregados de Htt mutante y contribuyendo potencialmente de ese modo a las mejoras funcionales observadas en este modelo de ratón.

Además de la eliminación sustancial de los agregados de Htt, el tratamiento con AAV-miARN-Htt también confirió una ventaja de comportamiento a los ratones YAC128. Los ratones YAC128 comienzan a mostrar déficits en el Rotarod que comienzan a los 3 meses de edad, y a los 7 meses muestran un deterioro grave (Slow *et al.*, (2003) *Hum. Mol. Genet.* 12:1555-1567). Los ratones YAC128 tratados con AAV2/1-miARN-Htt a los 7 meses de edad (cuando la coordinación motora estaría significativamente deteriorada) mostraron mejoras en el ensayo del Rotarod lo que sugería que se había obtenido una reversión de los déficits motores establecidos. Aunque las reducciones en los agregados de Htt han sido referidas previamente (modelos de fragmentos N171 y R6/2) (Rodriguez-Lebron *et al.*, (2005) *Mol. Ther.* 12:618-633; Machida *et al.*, (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:190-197), los presentes estudios demuestran una mejora de los agregados y mejoras de comportamiento concomitantes en un modelo de ratón de EH completo. Asimismo se observó una mejora significativa en la prueba de natación de Porsolt después de la inyección de AAV-miARN-Htt en el cuerpo estriado. Este es el primer informe para demostrar una mejora en este fenotipo depresivo después de AAV-ARNi y de manera importante estos resultados sugieren, sin desear estar ligados a la teoría, que la reducción de los niveles de Htt en el cuerpo estriado era suficiente para mejorar el fenotipo depresivo mostrado en el modelo

YAC128. Finalmente, cuando se trataron ratones YAC128 de 7 meses de edad con AAV-miARN-Htt (tratamiento post-sintomático) se observó una reducción significativa en los agregados de Htt en el cuerpo estriado y una reversión potencial del déficit de coordinación motora mostrado por este modelo. Sin desear estar ligado a la teoría, estos datos indican que el tratamiento post-sintomático con AAV2/1-miARN-Htt puede aliviar la carga de mHtt dentro de las células y proporcionar un beneficio terapéutico incluso después de que se hayan formado los agregados de mHtt.

La supresión de la Htt estriatal también dio como resultado una modesta corrección de los niveles de ARNm de DARPP-32 y receptor D1, 2 transcritos que disminuyen progresivamente con la edad en ratones YAC128 y en pacientes humanos con EH. Se sabe que la Htt mutante frustra numerosos procesos celulares lo que conduce a la disfunción neuronal y a la disregulación transcripcional (Cha, (2000) *Trends Neurosci.* 23:387-392).

En resumen, estos estudios demuestran que la ARNi mediada por AAV mejora significativamente las anomalías de comportamiento relacionadas con la EH en el modelo de ratón de EH YAC128. Además, también se sabe que el suministro mediado por AAV de un miARN que se dirige a Htt puede conducir a la supresión sostenida de los niveles de Htt, la corrección de las aberraciones celulares y neuropatológicas, y a mejoras en los déficits motores y de comportamiento en un modelo de ratón transgénico de EH sin toxicidad manifiesta.

ARNi mejorado por la modificación del emparejamiento de bases de ARNip

El presente estudio utilizó un vector de AAV2/1 recombinante para codificar una horquilla corta contra el gen de Htt incluido en un almacén de miARN (miR-155). La secuencia de ARNip utilizada se modificó a partir de la secuencia publicada anterior mirR2.4, que dirige el exón 2 de los transcritos de htt de ratón y humano (McBride *et al.*, (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:5868-5873). Las modificaciones de los ARN en horquilla pequeños han sido utilizadas para incrementar la estabilidad y la actividad biológica, minimizar los efectos inespecíficos, y reducir las respuestas inmunitarias innatas (Castanotto *et al.*, (2009) *Nature* 457:426-433; Jackson *et al.*, (2010) *Nature Rev. Drug Disc.* 9:57-67). La secuencia modificada utilizada en el presente estudio contenía la misma secuencia de la cadena guía que miR2.4 (**FIG. 9A**); sin embargo, el constructo fue modificado genéticamente para que tuviera un nucleótido de adenina (A) adicional en el extremo 3' de la secuencia semilla, que no tenía un nucleótido de timina (T) correspondiente en la cadena guía (**FIG. 9B**). Sin desear estar ligado a una teoría, el modelado termodinámico sugiere que la adición de una secuencia de la protuberancia en la cadena no guía opuesta de la secuencia semilla en la cadena guía puede mejorar aspectos del funcionamiento de ARNi. Por consiguiente, los autores de la invención también han

desarrollado un avance que se puede utilizar para generar terapias de ácidos nucleicos transformativas novedosas para el tratamiento de una variedad de trastornos.

Ejemplo 7. Reducción del silenciamiento génico inespecífico

El ARN de interferencia (ARNi) proporciona un enfoque para el tratamiento de muchas enfermedades humanas. No obstante, la seguridad de las terapias basadas en ARNi puede ser obstaculizada por la capacidad de los ARN inhibidores pequeños (ARNip) para unirse a ARNm no deseado y reducir su expresión, un efecto conocido como silenciamiento génico inespecífico. La inespecificidad se produce principalmente cuando la región semilla (nucleótidos 2–8 del ARN pequeño) se empareja con las secuencias de UTR 3' de los ARNm no deseados y dirige la represión traduccional y la desestabilización de esos transcritos. Hasta la fecha, las secuencias de ARNi terapéutico se seleccionan principalmente para la eficacia del silenciamiento génico, y más tarde se evalúa la seguridad. Aquí, al diseñar los ARNip para tratar la enfermedad de Huntington (EH), un trastorno neurodegenerativo dominante, se generaron dos nuevas secuencias con potenciales inespecíficos mínimos (es decir, aquellos con una escasez de complementos de siembra dentro de todas las UTR 3' de ser humano y mono rhesus conocidas) que muestran un potente silenciamiento en el cerebro de ratón con un bajo perfil inespecífico *in silico*.

Tabla 1. Secuencias de miARN

<u>ID</u> <u>miARN</u>	<u>Secuencia miARN</u> <u>(anti-sentido, 5'→3')</u>	<u>Inespecificidades</u> <u>#siSPOT</u> <u>R</u> <u>(humano)</u>	<u>Seq superior para clonación (5'→3')</u> <u>Tallo bucle que contiene secuencia miARN real, incluyendo salientes</u> <u>de sitios de restricción (subrayado)</u>
<u>Diseño original</u>			
<u>170X</u> <u>A</u>	<u>UAGACAAUGAUUCACAC</u> <u>GGU</u> <u>(SEQ ID NO:1)</u>	<u>6001</u>	<u>TGCTGTAGACAATGATTCACACGGTGT</u> <u>TTTTGGCCACTGACTG</u> <u>ACACCGTGTGTCATTGTCTAA</u> <u>(SEQ ID NO:20)</u>
<u>Modified to be low off-targeting:</u>			
<u>170XA</u> <u>L1</u>	<u>UCGACAAUGAUUCACA</u> <u>CGGU</u> <u>(SEQ ID NO:15)</u>	<u>786</u>	<u>TGCTGT</u> <u>CGACAATGATTCACACGGTGT</u> <u>TTTTGGCCACTGACTG</u> <u>ACACCGTGTGTCATTGTC</u> <u>GAA</u> <u>(SEQ ID NO:21)</u>
<u>170XA</u> <u>L2</u>	<u>UAGACGAUGAUUCACA</u> <u>CGGU</u> <u>(SEQ ID NO:17)</u>	<u>1223</u>	<u>TGCTGTAGAC</u> <u>GATGATTCACACGGTGT</u> <u>TTTTGGCCACTGACTG</u> <u>ACACCGTGTGTCAT</u> <u>CGTCTAA</u> <u>(SEQ ID NO:21)</u>

Se muestran en la **Tabla 1** la secuencia de miARN PS170XA original y dos versiones con poca inespecificidad modificadas de esta secuencia: 170XAL1 y 170XAL2. Las dos versiones de baja inespecificidad de PS170XA se diseñaron sustituyendo las bases dentro del heptámero entre las bases 2-8 para crear motivos CpG. (Boudreau *et al*, 2012). La

"A" de las posiciones se cambió por una C en 170XAL1 (5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3') (SEQ ID NO:15), y la "A" de la posición 6 se cambió por una "G" en 170XAL2 (5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3') (SEQ ID NO:17). Estas sustituciones dieron como resultado una puntuación de inespecificidad significativamente menor utilizando el algoritmo SiSPOTR, un algoritmo de diseño de ARNip centrado en la especificidad que identifica las secuencias candidato con potenciales de inespecificidad mínimos y potentes capacidades de silenciamiento (Boudreau *et al*, *Nucleic Acids Res.* 2013 Enero; 41(1) e9. La puntuación de SiSPOTR reducida pronosticaría que las nuevas secuencias tendrían un número inferior de inespecificidades humanas potenciales en comparación con la secuencia 170XA original.

La secuencia de miARN de PS170XA original es 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1). La siguiente secuencia, incluyendo la cadena guía, bucle interno mir-155 modificado (murino), y la cadena pasajera, se clonó en un vector de expresión: 5'TAGACAATGATTCACACGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCGTGTGTCATTGTCTAA-3' (SEQ ID NO:19). Se incluyó una "A" más en el extremo 3'. Las cadenas guía y pasajera están en negrita, y las bases 11 y 12 de la cadena guía no están complementadas con la inversa en la cadena pasajera, creando un pequeño bucle interno en el dúplex procesado, maduro. La "A" en las posiciones 2 se cambiaron por una C en 170XAL1, y la "A" de la posición 6 se cambió por una "G" en 170XAL2, por otra parte, 170XAL1 y 170XAL2 tienen la misma estructura que el PS170XA original. Las estructuras se muestran en la **FIG. 10**.

Se sometió a ensayo la capacidad de AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 y 170XAL2 para mediar la reducción de Htt in vitro en células de riñón embrionario humano (HEK293). Los plásmidos de expresión AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 y 170XAL2 así como un plásmido de control que contenía una secuencia de miARN no codificante (CTL3) se transfectaron a células HEK293 (8 réplicas por tratamiento). Las células se transfectaron utilizando el reactivo de transfección Eugene y se cosecharon 48 horas más tarde. El ARN total se aisló utilizando TaqMan® Cells-to-CT™ Kit (Ambion). Los niveles de ARN se midieron mediante RT-PCR en tiempo real cuantitativa (conducida y analizada en un ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems)). Los niveles de expresión se normalizaron a PPIA (peptidilprolil isomerasa) humana. Los niveles de ARNm de Htt humana se redujeron después de la transfección con ambos plásmidos 170XAL1 y 170XAL2 en comparación con CTL3 y controles no tratados, sin embargo, esta reducción no alcanzó significación estadística (FIG. 11).

Se evaluó la capacidad de AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 y 170XAL2 para silenciar la expresión de Htt en el cuerpo estriado de ratones YAC128. Los ratones YAC128

adultos recibieron inyecciones intra-estriatales bilaterales de AAV2/1-miARN-Htt 170XA (2E10 vgs/sitio), AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 (2E10 vgs/sitio), o AAV2/1-miARN-Htt 170XAL2 (3E10 vgs/sitio). El AAV2/1-miARN-Htt original 170XA sirvió como control positivo mientras otro grupo de no tratados (sin inyección) sirvió como control negativo. Un mes después de la inyección, los animales se sacrificaron y se perfundieron con PBS. Los cerebros se recogieron para los análisis histológicos y bioquímicos. Para los análisis bioquímicos se micro-disecionó la región estriatal de un hemisferio y se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido. Se evaluaron los niveles estriatales de ARNm y de proteína Htt de humano y ratón mutante mediante QPCR transferencia Western respectivamente. El ARNm de Htt humana y Htt de ratón mutante se redujo significativamente en los ratones a los que se había inyectado AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 y AAV2/1-miARN-Htt 170XAL2 cuando se compararon con animales de control no tratados (**FIGS. 12A y 12B**). PPIA sirvió como gen de control de normalización para todos los análisis de QPCR. La proteína Htt humana y de ratón mutante se redujo significativamente en todos los ratones a los que se había inyectado AAV2/1-miARN-Htt cuando se compararon con animales de control no tratados y se observó el grado de reducción equivalente (aproximadamente 50%, $p < 0,05$) para todos los tratamientos (**FIGS 12C y 12D**).

Se evaluaron los niveles de ARNm de GFAP e Iba1 en el cuerpo estriado por medio de QPCR para determinar si estos genes marcadores inflamatorios estaban regulados al alza después de la inyección de los vectores de AAV-miARN-Htt de los autores de la presente invención. GFAP es un marcador de astrogliosis e Iba1 sirve como marcador para la activación de la microglía. Los autores de la presente invención demuestran que las inyecciones intra-estriatales de AAV2/1-miARN-Htt 170XA dan como resultado un incremento significativo en los niveles de ARNm de GFAP (**FIG. 13A**) y de ARNm de Iba1 (**FIG. 13B**) en el cuerpo estriado 1 mes después de la inyección. No se observó incremento de GFAP o Iba1 después de la inyección de AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 o AAV2/1-miARN-Htt 170XAL2 y los niveles de ARNm de GFAP e Iba1 fueron equivalentes a los de los controles no tratados. La PPIA humana sirvió como gen de control de normalización. Los valores se proporcionan como las medias $\pm$ ETM. * Significativamente diferente de ratones de control no tratados, $p < 0,05$; ANOVA seguido de prueba post-hoc de Tukey.

La tinción inmunohistoquímica de GFAP e Iba1 se seccionó de tejido de cuerpo estriado de ratones YAC128 tratados con AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 o AAV2/1-miARN-Htt 170XAL2 1 mes después de la inyección confirmó que los niveles de las proteínas GFAP e Iba1 no eran elevados en el cuerpo estriado después de la inyección (**FIG. 14**). Se utilizó la microscopía fluorescente para evaluar el nivel de inmunotinción de GFAP e

Iba1 en el cerebro. Las inyecciones intra-estriatales de AAV2/1-miARN-Htt 170XA no dieron como resultado un incremento en la inmunorreactividad de GFAP e Iba-1 como se observa mediante microscopio de fluorescencia, sin embargo, los autores de la presente invención no observaron ningún incremento en la inmunotinción de GFAP o Iba1 después de la inyección de AAV2/1-miARN-Htt 170XAL1 o AAV2/1-miARN-Htt 170XAL2 donde el nivel e tinción fue equivalente al de los cerebros de control no tratados. Barra de escala = 50 μ M.

SECUENCIAS

Todas las secuencias de polipéptidos se presentan como N-terminales a C-terminales a menos que se indique de otro modo. Todas las secuencias de ácido nucleico se presentan como 5' a 3' a menos que se indique de otro modo.

- 5 Hebra antisentido de htt de miARN
UAGACAAUGAUUCACACGGU (SEQ ID NO:1)
Complemento de la cadena Pasajera de miARN
ACCGUGUGUCAUUGUCUAA (SEQ ID NO:2)
Secuencia diana efectora
- 10 Secuencia de ADN de la cadena antisentido de htt de miARN
TAGACAATGATTCACACGGT (SEQ ID NO:4)
Complemento de la cadena Pasajera de miARN
ACCGTGTGTCATTGTCTAA (SEQ ID NO:5)
- 15 Secuencia diana efectora
ACCGTGTGAATCATTGTCUTAA (SEQ ID NO:6)
Secuencia de ARN de 3A170
UGCUGUAGACAAUGAUUCACACGGUGUUUUGGCCACUGACUGACACCGUGUC
AUUGUCUAAACAGG (SEQ ID NO:7)
- 20 Secuencia de ADN de 3A170
TGCTGTAGACAATGATTCACACGGTGTGTTTGGCCACTGACTGACACCGTGTTCATT
GTCTAACAGG (SEQ ID NO:8)
Cebador directo de ARNm de Htt humana
Ctcggtccggtagacatgct (SEQ ID NO:9)
- 25 Cebador inverso de ARNm de Htt humana
Ggaaatcagaaccctcaaatgg (SEQ ID NO:10)
Sonda de ARNm de Htt humana
Tgagcactgttcaactgtgtgtatcgga (SEQ ID NO:11)
ITR de AAV variantes para vectores scAAV
- 30 CACTCCCTCTCTGCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGC
CCACGCCCCGGGCTTTGCCC
GGGCG (SEQ ID NO:12).
Secuencia de ADN del genoma del vector AAV completo
ttggccactccctctctgcgcgctcgctcactgagccgggcgaccaaaggctcgccgacgcccgggctttgcccgggagg
- 35 cctcagtgcgagcgagcgcgagagggagtgcccaactccatcactaggggtcctggagggtggagtcgtgacaattcg
cccttgggcctaggcaattggatcccggaccgtcgacattgattattgactagtattaatagtaataatcacgggtcattagttcatag

cccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaata
atgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaactgccacttggcagta
catcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgccagtacatgacctta
tgggactttctacttggcagtacatctacgtattagtcacgtattaccatggtcgaggtgagccccacgttctgcttactctccccat
5 ctccccccctcccccccccaattttgtatttatttttaattttttgtgcagcgalggggcgggggggggggggggcgcg
gccagggcgggggcgggcgggcgagggcgggggcgggcgagggcgagaggcgggcgagccaatcagagcgggcg
gctccgaaagtttcttttatggcgagggcgggcgggcgggcgccctataaaaagcgaagcgcgggcgggcgggagtcgctgc
ggctgccttcgccccgtgccccgtccgcccgcctcgcgccgccccggctctgactgaccggttactccacaggtga
gcgggcgggacggcccttctcctccggctgtaattagcgcttggttaatgacggcttggtttcttctgtggtgcgtgaaagccttga
10 ggggctccgggagggccctttgtgcgggggagcggtcggggggtgcgtgcgtgtgtgtgcgtggggagcgccgctgcg
gctccgcgctgccccggcggtgtgagcgctgcggcgcgggcgggcggtttgtgcgtccgcagtgctgcgaggggagcgcg
gccggggcggtgccccgcggtgcgggggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtcggggtgtgtgcgtgggggggtga
gcaggggggtgtggcgcgctcggtcggaacccccctgcacccccctccccagttgctgagcacggccccggttcgggtg
cggggctccgtacggggcggtgcgggggctcgccgtgcggggcggggggtggcgcgaggtgggggtgcggggcgggggcg
15 gggcgccctcgggccgggagggctcggggagggcgcgcgggccccggagcgccggcggtgtcgagggcgggcg
gccgcagccattgccttttatgtaatcggtgcgagagggcgagggacttctttgtcccaaatctgtcggagccgaaatctgggag
gcgcccgcaccccccttagcgggcgcgggcggaagcggtgcggcgccggcaggaaggaaatggcggggagggccttcgt
gctgcggcgccgcccgtcccccttctccttcagcctcggggtgtccgcgggggagcggtgccttcgggggggacggggc
agggcggggttcggttctggcgtgtgaccggcggtctagagcctctgtaacctgttcacgtccttcttttctacagctcctgg
20 gcaacgtgctggttattgtgctgtctcatcttttgcaagaattcttcgaagatctgtagcttaattaaccggctgccaccatggtg
agcaaggcgagggagctgttcaccggggtggtcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgt
ccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgcctggc
ccacctcgtgaccacctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttctcaagtcg
ccatgcccgaaggctacgtccaggagcgaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcgccgaggtgaagttcga
25 gggcgacacctggtgaaccgcatcgagctgaaggcgatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagta
caactacaacgccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaactcaagatccgccacaacatcg
aggacggcagcgtgcagctcgccaccactaccagcagaaccccccatcgcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccact
acctgagcaccagtcgcccctgagcaaaagaccccaacgagaagcgcatcacatggtcctgctggagtctgtgaccgcccggg
gatcactctcgcatggagagctgtacctggaggcttctgaaggctgtatgctgttagacaatgattcacacgggtgtttggccact
30 gactgacacctgtgtcattgtctaacaggacacaaggcctgttactagcactcacatggaacaaatggccatgcatctagagggccc
tattctatagtgtcacctaatgctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagtgtccagccatctgtgtttgcccctccccgt
gccttccttgacctggaagggtgccactcccactgtcctttctaataaaatgaggaattgcatgcattgtctgagtaggtgtcattcta
ttctgggggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggagctagagtcgacc
ggaccggtggaagtctcttctcggtgtccttgacttcaaaagggtctctccatttgctggagagaggggaagggtgggcatcacca
35 ggggtgagtgaaagtttgaagagtgtagcagaataagaacatgagtcctccctgagaagccctgagcccccttgacgacac
acatccctcgaggctcagcttcatctgttaaaagggtgctgaactgacctccaagctgccgaaaagattgtgtgggataattca

aaactagaggaagatgcagaatttctacatcgtggcgatgtcaggctaagagatgccatcgtggctgtgcattttattggaatcatatgt
ttatttgaggggtgtcttgatattacaaataaatgttgagcatcaggcatatttggtaccttctgtctaaggctccctgcccttgtaatt
ggcagctcagttattcatccagggcaaacattctgcttactattcctgagagctttcctcatcctctagattggcaggggaaatgcagatg
cctgagcagcctccctctgccataccaacagagcttcaccatcaggcatgcagagtggacaggggctcagggacccctgatcc
5 cagctttctcattggacagaaggaggagactggggctggagagggacctggggcccccactaaggccacagcagagccaggacttt
agctgtgctgactgcagcctggcttgctccactgccctccttgctcaagagcaaggagcctcagagtggaggaagcagcccct
ggccttgctcccacctcccctcccctatgctgtttcctgggacagtgggagctggcttagaatgccctggggccccaggacctg
gcattttaaccctcaggggcaggaaggcagcctgagatacagaagagtccatcacctgctgtatgccacacaccatccccacagt
acgtactagttcgaagccacgcgtccgaaggcggaattgtagataagtagcatggcgggttaataactacaaggaaccctagt
10 gatggagttggccactccctctctgcgcgtcgtcgtcactgaggccggcgaccaaaggctgcccgcgcccgggctttgcc
ggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagggagtgccaa

(SEQ ID NO:13)

Secuencia de ADN del armazón de miARN

ctggaggtctgctgaaggctgtatgctgttagacaatgattcacaggtgttttgccactgactgacaccgtgtgtcattgtctaacagg
15 acacaaggcctgttactagcactcacatgaacaaatggc (SEQ ID NO:14)

Guía de 170XAL1 (antisentido)

UCGACAAUGAUUCACACGGU (SEQ ID NO:15)

No guía de 170XAL1

ACCGUGUGUCAUUGUCGAA (SEQ ID NO:16).

20 Guía de 170XAL2 (antisentido)

UAGACGAUGAUUCACACGGU (SEQ ID NO:17)

No guía de 170XAL1

ACCGUGUGUCAUCGUCUAA (SEQ ID NO:18)

170XA

25 TAGACAATGATTCACACGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCGTGTGTCATTGTC
TAA (SEQ ID NO:19)