

REIVINDICACIONES PRESENTADAS COMO MODIFICACIÓN
VOLUNTARIA

1. Un ARNi que comprende una primera cadena y una segunda cadena, en donde
- 5 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, en donde N=7 o N=8; y
- c) la segunda cadena comprende una región no guía de al menos 19 bases, en donde:
- 10 (i) 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 donde opcionalmente la protuberancia es la base 1 o la base N+2 opuesta a la región guía;
- (ii) 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 donde
- 15 (iii) 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 donde opcionalmente la protuberancia es la base 1 o la base N opuesta a la región guía.
- 20 2. El ARNi de la reivindicación 1, en donde:
- (a) la protuberancia es la base 1 opuesta de la región de guía;
- (b) la protuberancia está formada por una o más bases de la cadena no guía en el dúplex que carecen de una base complementaria en la región de guía, en donde la protuberancia está flanqueada por bases que hacen par de bases con la cadena de guía;
- 25 (c) la protuberancia comprende de 1 a 10 nucleótidos, en el que opcionalmente la protuberancia comprende 1 - 3 nucleótidos; y / o
- (d) ARNi comprende una segunda protuberancia, en donde la segunda protuberancia está situada en la primera cadena en la región de guía situada 3' con respecto a la región de semilla.
- 30 3. Un ARNi que comprende:
- (a) una primera cadena que comprende una región de guía que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene aproximadamente un 90% de identidad con la secuencia 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) y una segunda cadena que comprende una región no guía que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene
- 35 aproximadamente un 90% de identidad con 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 de no guía, y en donde opcionalmente:

(i) la región de guía comprende la secuencia 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO: 1);

5 (ii) la región no guía comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO: 2); y / o

(iii) los restos U en los restos 11 y 12 de la región de guía forman una protuberancia en la región de guía;

(b) una primera cadena que comprende una región de guía que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene aproximadamente 90% de identidad con la secuencia 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO: 15) y una segunda cadena que comprende una región no guía que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene aproximadamente 90% de identidad con la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO: 16), en donde la primera cadena y
10 segunda cadena forman un dúplex y en donde el resto A en el resto 18 o el resto 19 de la segunda forma una protuberancia en la región no guía, y en el que opcionalmente:

(i) la región de guía comprende la secuencia 5'-UCGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO: 15);

(ii) la región no guía comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO: 16); y / o
20

(iii) los restos U en los restos 11 y 12 de la región de guía forman un saliente en la región de guía; o

(c) una primera cadena que comprende una región de guía que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene aproximadamente un 90% de identidad con la secuencia 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO: 17) y una segunda cadena que comprende una región no guía que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene aproximadamente un 90% de identidad con 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 del
25 segunda cadena forma una protuberancia en la región de no guía, y donde opcionalmente:

(i) la región de guía comprende la secuencia 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO: 17);

(ii) la región no guía comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO: 18);

35 y/o (iii) los restos U en los restos 11 y 12 de la región de guía forman una protuberancia en la región de guía.

4. El ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que:
- (a) el dúplex tiene entre 19 y 25 o entre 19 y 23 pares de bases de longitud;
 - (b) la primera y/o segunda cadena comprende además una región saliente 3', una región saliente 5', o ambas regiones salientes 3' y 5'; y/o
 - (c) la primera cadena y la segunda cadena están unidas por medio de un enlazador de ARN capaz de formar una estructura de bucle, en la que opcionalmente:
 - (i) el enlazador de ARN comprende 4 a 50 nucleótidos, 4 a 20 nucleótidos o 13 nucleótidos;
 - (ii) la estructura de bucle comprende de 4 a 20 nucleótidos; Y / o
 - (iii) el ARNi comprende de 5'a 3' la segunda cadena, el enlazador de ARN y la primera cadena; o el ARNi comprende de 5 'a 3' la primera cadena, el enlazador de ARN y la segunda cadena.
5. El ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en el que:
- (a) la secuencia se mejora para reducir el silenciamiento de genes fuera de diana;
 - (b) la secuencia comprende uno o más motivos CpG; y/o
 - (c) la secuencia comprende uno o más motivos CpG en la región semilla.
6. El ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en el que el ARNi comprende la secuencia de nucleótidos aproximadamente 90% idéntica a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, donde opcionalmente el ARNi comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3.
7. El ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, el ARNi es un ARN inhibidor pequeño (siRNA), un microRNA (miARN) o un pequeño ARN en horquilla (shRNA).
8. El ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el ARNi se dirige al ARN que codifica un polipéptido asociado con un trastorno, en el que opcionalmente:
- (a) el trastorno es un trastorno del SNC;
 - (b) el trastorno es enfermedad de almacenamiento lisosomal (LSD), enfermedad de Huntington, epilepsia, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, degeneración corticobasal (CBD), degeneración ganglionar corticobasal (CBGD), demencia frontotemporal (FTD), atrofia de múltiples sistemas (MSA), parálisis supranuclear progresiva (PSP) o cáncer del cerebro; y/o
 - (c) el trastorno es la enfermedad de Huntington.
9. El ARNi de la reivindicación 8, en el que el polipéptido es la huntingtina, y en el que

opcionalmente:

- (a) la huntingtina comprende una mutación asociada con la enfermedad de Huntington; y/o
 - (b) la región de guía comprende la secuencia 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:1) y la región no guía comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCUAA-3' (SEQ ID NO:2); o
 - (c) la región de 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); o
 - (d) la región de guía comprende la secuencia 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO:17) y la región no guía comprende la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUCGUCUAA-3' (SEQ ID NO:18).
10. 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 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
13. El constructo de expresión de la reivindicación 11 ó 12, en el que el constructo de expresión comprende además una señal de poliadenilación, en el que opcionalmente la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina, una señal de poliadenilación de SV40 o una proteína HSK TK pA.
14. Un vector que comprende el constructo de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que opcionalmente:
- (a) el vector es un vector de virus adeno-asociado recombinante (rAAV);
 - (b) el vector es un vector adenoviral recombinante, en el que opcionalmente el vector adenoviral recombinante se deriva del adenovirus 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, AdHu3, 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;
 - (c) el vector es un vector lentiviral recombinante, en el que opcionalmente el vector lentiviral recombinante se deriva de un lentivirus pseudotipado con virus de estomatitis vesicular (VSV), virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus de río Ross (RRV), virus Ebola, virus Marburg, Virus Mokala, virus de la rabia, RD114 o sus variantes; o
 - (D) el vector es un vector rHSV, en el que opcionalmente el vector rHSV se deriva de rHSV-1 o rHSV-2.

15. El vector de la reivindicación 14, en el que el vector es un vector rAAV, y en el que el constructo de expresión está flanqueado por una o más secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV, en las que opcionalmente:

- 5 (a) el constructo de expresión está flanqueado por dos ITR de AAV; y/o
 (b) las ITR de AAV son ITR de serotipos AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV de cabra, AAV bovino, o AAV de ratón, en las que opcionalmente las ITR de AAV son ITR de AAV2.

10

16. El vector de la reivindicación 15, en el que el vector de rAAV comprende de 5' a 3', una ITR de AAV2, un promotor, ácido nucleico que codifica el ARNi, una señal de poliadenilación y una ITR de AAV2; y donde opcionalmente:

- (a) el promotor es un promotor CBA;
15 (b) la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina; y/o
 (c) el vector rAAV comprende de 5' a 3', una ITR de AAV2, el promotor CBA, el ácido nucleico que codifica el ARNi, una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina y una ITR de AAV2.

20

17. El vector de la reivindicación 15 ó 16, en el que el vector comprende además un ácido nucleico embutido, en el que opcionalmente:

- (a) el ácido nucleico embutido está situado entre el promotor y el ácido nucleico que codifica el ARNi; y/o
25 (b) el ácido nucleico de embutido comprende ácido nucleico que codifica una proteína fluorescente verde (GFP), una secuencia embutida de alfa-1-antitripsina humana (AAT) o una secuencia embutida de clon P1 de cromosoma 16 C16 P1 (C16 humano), en el que opcionalmente el ácido nucleico embutido comprende una secuencia de ácido nucleico desde aproximadamente el nucleótido 1692 hasta el nucleótido 2720 de SEQ
30 ID NO: 13.

18. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en el que el vector es un vector de rAAV auto-complementario, en el que opcionalmente el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el ARNi y una segunda secuencia de ácido
35 nucleico que codifica un complemento del ARNi, en donde la primera secuencia de ácido nucleico puede formar pares de bases intracatenarios con la segunda secuencia de ácido nucleico a lo largo de la mayoría o de la totalidad de su longitud; y en el que opcionalmente la

primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico están enlazadas por 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.

19. Una célula que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 14-18, en la que opcionalmente la célula es una célula del sistema nervioso central (CNS).

20. Una partícula vírica que comprende el vector de la reivindicación 14, en la que:

(a) la partícula viral es una partícula de AAV que encapsula el vector rAAV;

(b) la partícula viral es una partícula de adenovirus que encapsula el vector adenoviral recombinante, donde opcionalmente la partícula de adenovirus comprende una cápside de Adenovirus 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, AdHu3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu2, AdHu3, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, Ad bovino tipo 3, Ad canino tipo 2, Ad ovino, o Ad porcino tipo 3, o una variante de una cápside de serotipo 5 de adenovirus;

(c) la partícula viral es una partícula lentiviral que encapsula el vector lentiviral recombinante, en donde opcionalmente la partícula lentiviral comprende una cápside pseudotipada con virus de estomatitis vesicular (VSV), virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus de Ross River (RRV), virus Ebola, Virus Marburg, virus Mokala, virus de la rabia, RD114 o sus variantes; o

(d) la partícula viral es una partícula de HSV, en la que opcionalmente la partícula de HSV es una partícula de rHSV-1 o una partícula de rHSV-2.

21. Una partícula recombinante de AAV (rAAV) que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en la que opcionalmente la partícula viral de AAV comprende una cápside de 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, AAV de cabra, de AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino o AAV de ratón cápside de serotipo rAAV2/HBoV1.

22. La partícula de rAAV de la reivindicación 21, en la que:

(a) la ITR y la cápside de la partícula de rAAV se derivan del mismo serotipo de AAV;

o

(b) la ITR y la cápside de la partícula de rAAV se derivan de diferentes serotipos de AAV, en donde opcionalmente la ITR se deriva de AAV2 y la cápside de la partícula de rAAV se deriva de AAV1.

23. Una composición que comprende la partícula viral de la reivindicación 20 o la partícula de rAAV de la reivindicación 21 o 22, en la que opcionalmente la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5

24. Un método para inhibir o reducir la expresión de un polipéptido en un mamífero que tiene una enfermedad, o inhibir la acumulación de un polipéptido en una célula de un mamífero, que comprende administrar al mamífero el ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9; el constructo de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13; el vector de una
10 cualquiera de las reivindicaciones 14-18; la partícula viral de la reivindicación 20; la partícula rAAV de la reivindicación 21 ó 22; o la composición de la reivindicación 23, en la que el ARNi se dirige a un ARN que codifica el polipéptido, en el que opcionalmente el mamífero es un ser humano.

15 25. Un método para tratar la enfermedad de Huntington o inhibir la expresión de htt en un mamífero o inhibir la acumulación de htt en una célula de un mamífero que comprende administrar al mamífero el ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9; el constructo de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13; el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 14-18; la partícula viral de la reivindicación 20; la partícula rAAV de la
20 reivindicación 21 ó 22; o la composición de la reivindicación 23.

26. Un kit para inducir interferencia de ARN en un mamífero, inhibir o reducir la expresión de un polipéptido en un mamífero que tiene una enfermedad, inhibir la acumulación de un polipéptido en una célula de un mamífero, tratar la enfermedad de Huntington en un mamífero o
25 inhibir la expresión de htt en un mamífero, o inhibir la acumulación de htt en una célula de un mamífero, que comprende el ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9; el constructo de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13; el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 14-18; la partícula vírica de la reivindicación 20; la partícula rAAV de la reivindicación 21 ó 22; o la composición de la reivindicación 23, en la que opcionalmente:

- 30 (a) el mamífero es un ser humano; y/o
(b) el mamífero tiene la enfermedad de Huntington.