

REIVINDICACIONES

1. Un ARNi que comprende una primera cadena y una segunda cadena, en el que
 - a) la primera cadena y la segunda cadena forman un dúplex;
 - 5 b) la primera cadena comprende una región guía que comprende 19 bases, en la que 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 que comprende 19 bases, en donde:
 - (i) la región no guía comprende una secuencia de protuberancia opuesta a una o más
 - 10 de las bases 1-(N+2) de la región guía en el dúplex;
 - (ii) la región no guía comprende una secuencia de protuberancia opuesta a una o más de las bases 1-(N+1) de la región guía en el dúplex;
 - (iii) la región no guía comprende una secuencia de protuberancia opuesta a una o más de las bases 1-N de la región guía en el dúplex.
- 15 2. El ARNi de la reivindicación 1, en el que:
 - (a) la protuberancia es la base 1, la base N, la base N+1, o la base N+2 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
 - 20 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;
 - (c) la protuberancia comprende de 1 a 10 nucleótidos, o 1-3 nucleótidos; o
 - (d) el 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.
- 25 3. Un ARNi que comprende:
 - (a) una primera cadena que comprende una región de guía que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% de identidad con la secuencia 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO: 1) y una segunda cadena que
 - 30 comprende una región no guía que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene 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,
 - (b) una primera cadena que comprende una región de guía que comprende una secuencia de
 - 35 ácido nucleico que tiene 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 90% de identidad con la secuencia 5'-ACCGUGUGUCAUUGUCGAA-3' (SEQ ID NO: 16), en donde la primera cadena y segunda cadena forman un dúplex y en donde el resto A en el resto
 - 40 18 o el resto 19 de la segunda cadena forman una protuberancia en la región no guía; o
 - (c) una primera cadena que comprende una región de guía que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene 90% de identidad con la secuencia 5'-UAGACGAUGAUUCACACGGU-3' (SEQ ID NO: 17) y una segunda cadena que
 - 45 comprende una región no guía que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene 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 segunda cadena forma una protuberancia en la región de no guía.

4. El ARNi de la reivindicación 3, en el que los restos U en los residuos 11 y 12 de la región
5 guía forman una protuberancia en la región guía.
5. El ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el dúplex tiene entre 19 y 25 o entre 19 y 23 pares de bases de longitud.
- 10 6. El ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que una o ambas de entre la primera cadena y la segunda cadena comprende además una región saliente 3', una región saliente 5', o ambas regiones salientes 3' y 5'.
7. El ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la primera cadena y la
15 segunda cadena están unidas por medio de un enlazador de ARN formando una estructura de bucle.
8. El ARNi de la reivindicación 7, en el que el enlazador de ARN comprende 4 a 50 nucleótidos, 4 a 20 nucleótidos o 13 nucleótidos.
- 20 9. El ARNi de una cualquiera de la reivindicación 7 o 8, en el que la estructura de bucle comprende 4 a 20 nucleótidos.
10. El ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde 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
25 primera cadena, el enlazador de ARN, y la segunda cadena.
11. El ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que
 - (a) la secuencia reduce el silenciamiento de genes fuera de diana;
 - (b) la secuencia comprende uno o más motivos CpG; o
 - 30 (c) la secuencia comprende uno o más motivos CpG en la región semilla.
12. El ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el ARNi comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3.
- 35 13. El ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el ARNi es un ARN inhibidor pequeño (siRNA), un microRNA (miARN) o un pequeño ARN en horquilla (shRNA).
14. El ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el ARNi se dirige al ARN que codifica un polipéptido asociado con un trastorno seleccionado de entre enfermedad de
40 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), y cáncer del cerebro.
- 45 15. El ARNi de la reivindicación 14, en el que el trastorno es la enfermedad de Huntington, y en

donde el polipéptido es la huntingtina.

16. Un método para reducir la toxicidad de un ARNi que comprende una primera cadena y una segunda cadena, en la que la primera cadena y la segunda cadena forman un dúplex; en donde la primera cadena comprende una región guía que comprende 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 la segunda cadena comprende una región no guía que comprende 19 bases, comprendiendo el método introducir una protuberancia en la región no guía del ARNi, en donde la protuberancia se introduce opuesta a una cualquiera o más de las bases 1-(N+2) de la región guía en el dúplex; la protuberancia se introduce opuesta a una cualquiera o más de las bases 1-(N+1) de la región guía en el dúplex; o la protuberancia se introduce opuesta a una cualquiera o más de las bases 1-N de la región guía en el dúplex.

17. El constructo de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica el ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

18. Un constructo de expresión de la reivindicación 17, en el que el ácido nucleico que codifica el ARNi comprende un andamio de miARN.

19. Un constructo de expresión de la reivindicación 17, en el que el ácido nucleico que codifica el ARNi comprende un andamio de miR-155.

20. El constructo de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que el ácido nucleico que codifica el ARNi está unido operativamente a un promotor.

21. El vector de expresión de la reivindicación 20, en el que el promotor se selecciona de 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 (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.

22. El constructo de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en el que el constructo de expresión comprende además una señal de poliadenilación.

23. El constructo de expresión de la reivindicación 22, en el que 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.

24. Un vector que comprende el constructo de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, en el que el vector es un vector de virus adeno-asociado recombinante (rAAV), un vector adenoviral recombinante, o un vector rHSV.
- 5 25. El vector de la reivindicación 24, en el que el vector es un vector rAAV.
26. El vector de la reivindicación 25, en el que el constructo de expresión está flanqueado por una o dos secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV.
- 10 27. El vector de la reivindicación 26, en el que 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.
- 15 28. El vector de la reivindicación 27, en el que las ITR de AAV son ITR de AAV2.
29. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en el que el vector de rAAV comprende de 5' a 3' una ITR de AAV2, un promotor, un ácido nucleico que codifica el ARNi, una señal de poliadenilación y una ITR de AAV2.
- 20 30. El vector de la reivindicación 29, en el que el promotor es un promotor CBA.
31. El vector de la reivindicación 29 o 30, en el que la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina.
- 25 32. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 31, en el que el vector comprende además un ácido nucleico embutido.
33. El vector de la reivindicación 32, en el que el ácido nucleico embutido está situado entre el
- 30 promotor y el ácido nucleico que codifica el ARNi.
34. El vector de la reivindicación 32 o 33, en el que 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
- 35 humano).
35. El vector de la reivindicación 34, en el que el ácido nucleico embutido comprende una secuencia de ácido nucleico desde aproximadamente el nucleótido 1692 hasta el nucleótido 2720 de
- SEQ ID NO: 13.
- 40 36. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 35, en el que el vector es un vector de rAAV auto-complementario.

37. El vector de la reivindicación 36, en el que 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 forma pares de bases intracatenarios con la segunda secuencia de ácido nucleico a lo largo de la mayoría o de la totalidad de su longitud.

38. El vector de la reivindicación 37, en el que 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.

39. Una partícula vírica que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 24-38, en la que la partícula viral es una partícula de AAV que encapsula el vector rAAV, una partícula de adenovirus que encapsula el vector adenoviral recombinante, una partícula lentiviral que encapsula el vector lentiviral recombinante, o una partícula de HSV.

40. Una partícula recombinante de AAV (rAAV) que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 38, en la que 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.

41. La partícula de rAAV de la reivindicación 40, 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.

42. La partícula de rAAV de la reivindicación 41, en la que la ITR se deriva de AAV2 y la cápside de la partícula de rAAV se deriva de AAV1.

43. Una composición que comprende la partícula viral de la reivindicación 39 o la partícula de rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 40 a 42, en la que la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.