

REIVINDICACIONES

1. Un método para modificar un transgén, el método comprende:

(a) seleccionar un primer gen que codifica un primer producto en una célula;

5 (b) seleccionar un miARN, cuya expresión es regulada positivamente por el primer producto en la célula; y

(c) modificar un transgén que expresa un transcripto que tiene una región de codificación que codifica el primer producto y una región no codificada 3' que comprende uno o más sitios de unión para el miARN.

10

2. Un método para modificar un transgén, el método comprende:

(a) seleccionar un primer gen que codifica un primer producto en una célula;

(b) seleccionar un segundo gen que codifica un segundo producto en la célula;

15 (c) determinar que la expresión del segundo producto es regulada positivamente por el primer producto en la célula;

(d) seleccionar un miARN;

(e) determinar que la expresión del miARN es regulada positivamente por el segundo producto en la célula; y

20 (f) modificar un transgén para expresar en la célula un transcripto que tiene una región de codificación que codifica el primer producto y una región no codificada 3' que comprende uno o más sitios de unión para el miARN.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el primer producto es una
25 proteína.

4. El método de la reivindicación 3, en donde la proteína es MeCP2, opcionalmente isoforma e1 de MeCP2 o isoforma e2 de MeCP2.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el segundo producto es una proteína, o ácido nucleico, opcionalmente en donde el ácido nucleico es un miARN.

5

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el miARN es miR-132.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el método además comprende modificar la región no codificada 3' del transcripto para comprender uno o más sitios de unión para uno o más miARN de desorientación.

8. El método de la reivindicación 7, en donde el uno o más miARN de desorientación inhiben la expresión del transgén hígado, corazón, pulmón, músculo, páncreas, o células que presentan antígeno.

9. El método de la reivindicación 7 u 8, en donde el uno o más miARN de desorientación es miR-122, miR-1, o miR-122 y miR-1.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el paso de modificar el transgén comprende insertar el transgén en un vector.

11. El método de la reivindicación 10, en donde el vector es un vector de clonación, vector de expresión, plásmido, o vector viral.

25

12. Un método para modificar un transgén, el método comprende:
(a) seleccionar un primer gen que codifica un primer producto en una célula;

(b) seleccionar un miARN, cuya expresión es regulada positivamente por el primer producto en la célula; y

(c) modificar un transgén que expresa un transcripto que tiene una región de codificación que codifica el primer producto y que tiene uno o más sitios de unión para el miARN.

13. Un método para modificar un transgén, el método comprende:

(a) seleccionar un primer gen que codifica un primer producto en una célula;

(b) seleccionar un segundo gen que codifica un segundo producto en la célula;

(c) determinar que la expresión del segundo producto es regulada positivamente por el primer producto en la célula;

(d) seleccionar un miARN;

(e) determinar que la expresión del miARN es regulada positivamente por el segundo producto en la célula; y

(f) modificar un transgén para expresar en la célula un transcripto que tiene una región de codificación que codifica el primer producto y que tiene uno o más sitios de unión para el miARN.

14. Un vector AAV recombinante (rAAV) para expresión autorregulada de una proteína, el vector rAAV comprende un ácido nucleico modificado para expresar en una célula de un tejido objetivo un transcripto que codifica la proteína, en donde el transcripto comprende por lo menos un primer sitio de unión de miARN específico para un primer miARN, en donde la expresión del primer miARN es regulada positivamente por la expresión de la proteína en la célula.

15. Un AAV recombinante que comprende un cápside que alberga el vector rAAV de la reivindicación 14, en donde el cápside comprende una proteína de cápside que facilita la transducción selectiva de la célula del tejido objetivo.

5 16. Un ácido nucleico recombinante que codifica un transcripto que tiene i) una región de codificación que codifica una proteína y ii) dos o más sitios de unión a miARN, en donde los dos o más sitios de unión a miARN comprenden:

(a) por lo menos un primer sitio de unión a miARN específico para un primer miARN que es regulado positivamente por la expresión de la proteína en una célula
10 de un tejido objetivo; y

(b) por lo menos un segundo sitio de unión a miARN específico para un segundo miARN que es expresado, independiente de la expresión de la proteína, en células de un tejido no objetivo.

15 17. Un ácido nucleico recombinante que codifica un transcripto que tiene una región de codificación que codifica proteína MeCP2 humana o un fragmento funcional de la misma y una región no codificada 3' que comprende dos o más sitios de unión a miARN, en donde los dos o más sitios de unión a miARN comprenden:

(a) por lo menos un sitio de unión a miARN específico para un miARN que
20 regula negativamente la expresión del transcripto; y

(b) por lo menos un sitio de unión a miARN específico para un miARN que inhibe la expresión del transcripto en una célula de un tejido no objetivo.

18. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 17, en donde la región de
25 codificación codifica isoforma e1 de MeCP2.

19. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 17 o 18, en donde el MeCP2 humano comprende la secuencia definida en la SEQ ID NO: 1.

20. El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en donde el por lo menos un sitio de unión específico a miARN para un miARN que regula negativamente la expresión del transcripto comprende un sitio de unión a miR-132, opcionalmente en donde el por lo menos un sitio de unión a miARN es dos o tres sitios de unión a miR-132.

21. El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en donde el por lo menos un sitio de unión a miARN específico para un miARN inhibe la expresión del transcripto en un tejido no objetivo comprende un sitio de unión a miR-1, sitio de unión a miR-122, o sitio de unión a miR-1 y miR-122.

22. El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en donde cada uno del uno o más sitios de unión a miARN se ubica entre el último codón de la región de codificación y la cola poli A del transcripto.

23. El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, que además comprende un promotor, opcionalmente un promotor de MeCP2 de ratón.

24. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 23, en donde el promotor de MeCP2 de ratón comprende la secuencia definida en la SEQ ID NO: 3.

25. El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, en donde el ácido nucleico recombinante se ubica en un plásmido.

26. Un vector viral que comprende el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, opcionalmente en donde el vector viral es un vector

de virus adenoasociado (AAV), un vector de adenovirus, un vector lentiviral, un vector de herpesvirus, o un vector de baculovirus.

27. Un ácido nucleico recombinante que codifica un transcripto que tiene:

5 (a) una región de codificación que codifica MeCP2 humano o un fragmento funcional del mismo; y

(b) una región no codificada 3' que comprende uno o más sitios de unión a miARN, en donde el transcripto es flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) de virus adenoasociado (AAV).

10

28. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 27, en donde la región de codificación codifica isoforma e1 de MeCP2.

29. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 27 o 28, en donde el
15 MeCP2 comprende la secuencia definida en la SEQ ID NO: 1.

30. El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, en donde el uno o más sitios de unión a miARN son sitios de unión a miR-1, miR-122, o miR-132, o cualquier combinación de los mismos.

20

31. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 30, en donde el transcripto comprende un sitio de unión a miR-1, un sitio de unión a miR-122, y por lo menos un sitio de unión a miR-132.

25 32. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 31, en donde el por lo menos un sitio de unión a miR-132 es dos o tres sitios de unión a miR-132.

33. El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 32, en donde el uno o más sitios de unión a miARN se ubican entre el último codón de la región de codificación y la cola poli A del transcripto.
- 5 34. El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 33, que además comprende un promotor, opcionalmente un promotor de MeCP2 de ratón.
35. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 34, en donde el promotor
10 de MeCP2 de ratón comprende la secuencia definida en la SEQ ID NO: 3.
36. El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 35, en donde los ITR son ITR de AAV2.
- 15 37. Un virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende:
un cápside que alberga el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, o 27 a 36.
38. El rAAV de la reivindicación 37, en donde el ácido nucleico comprende por lo
20 menos un ITR seleccionado de un ITR de AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, o AAV6.
39. El rAAV de la reivindicación 37 o 38, en donde el cápside comprende una proteína de cápside que facilita el paso del rAAV a lo largo de la barrera hematoencefálica.
- 25 40. El rAAV de la reivindicación 39, en donde la proteína de cápside tiene un serotipo seleccionado del grupo que consiste de AAV-PHP.B, AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV2.5, AAV5, AAV6, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAVrh10, AAV-B1, AAV9.45A-

Cadena (por ejemplo, AAV9.45-AS), AAV9.45Angiopep, AAV9.47-Angiopep, AAV9.47-AS, AAV-CAM130, y AAV9HR.

41. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 37 a 40, en donde la proteína
5 de cápside comprende o consiste de una secuencia definida en la SEQ ID NO: 14
o 15 (AAV-PHP.B, AAV9).

42. Una composición que comprende el ácido nucleico recombinante de
cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, o 27 a 36, o el rAAV de cualquiera de las
10 reivindicaciones 37 a 41, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

43. La composición de la reivindicación 42, en donde la composición es
formulada por inyección, opcionalmente donde la inyección es inyección sistémica
(por ejemplo, inyección intravenosa) o inyección intratecal.

15

44. Un método para tratar síndrome de Rett en un sujeto, el método comprende,
administrar a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene síndrome de Rett una
cantidad efectiva de:

(a) el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 17 a
20 24, o 27 a 36;

(b) el rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 37 a 41; o

(c) la composición de la reivindicación 42 o 43.

45. El método de la reivindicación 44, en donde el sujeto es un sujeto humano,
25 opcionalmente donde el sujeto tiene menos de un año de edad.

46. El método de la reivindicación 44 o 45, en donde el sujeto se caracteriza por una mutación en por lo menos una copia del gen MeCP2, opcionalmente en donde la mutación es una pérdida de mutación de función.

5 47. El método de cualquiera de las reivindicaciones 44 a 46, en donde la administración es inyección, opcionalmente inyección sistémica (por ejemplo, inyección intravenosa) o inyección intratecal.

48. El método de cualquiera de las reivindicaciones 44 a 47, en donde la
10 administración resulta en la cantidad efectiva de (a), (b), o (c) que cruza la barrera hematoencefálica del sujeto.

49. El método de cualquiera de las reivindicaciones 44 a 48, en donde la
administración resulta en un nivel no tóxico de expresión de MeCP2 en el cerebro
15 del sujeto.