

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA REDUCIR LA EMPALMOPATÍA Y PARA TRATAR TRASTORNOS DE DOMINANCIA DEL ARN

DERECHOS DE LICENCIA DEL GOBIERNO

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo la Subvención No. R03 AR056107, otorgada por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere al campo de biotecnología de ácido nucleico y proporciona composiciones y métodos para tratar trastornos genéticos asociados con empalmes incorrectos de ácido ribonucleico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La expresión y retención nuclear de transcritos de ácido ribonucleico endógeno (ARN) que contienen regiones repetidas anormalmente expandidas conduce al inicio de la dominancia del ARN, una patología que es fundamento a varios trastornos genéticos hereditarios, incluida la distrofia miotónica tipo 1, entre otros. La distrofia miotónica es la forma más común de distrofia muscular, y se presenta con una frecuencia estimada de aproximadamente 1 de cada 7,500 adultos humanos. La dominancia del ARN resulta de una mutación de ganancia de función en transcritos de ARN que imparte estas moléculas con actividad biológica no deseada. En la distrofia miotónica, la dominancia del ARN se efectúa por la presencia de repeticiones de trinucleótidos CUG expandidos en el transcrito de ARN que codifican para la proteína cinasa de distrofia miotónica (DMPK), que secuestran proteínas de ARN que controlan el empalme de ARN, tal como proteína tipo ceguera muscular, en virtud de la afección elevada de estas regiones de expansión para dichas proteínas del factor de empalme. Existe una escasez de estrategias disponibles para tratar y mejorar con éxito los síntomas de distrofia miotónica, entre otros trastornos asociados con la dominancia del ARN, y sigue existiendo la necesidad de productos terapéuticos eficaces para estas enfermedades.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

En la presente se describen composiciones y métodos útiles para reducir la aparición de empalmozia y para tratar trastornos asociados con la dominancia del ácido ribonucleico (ARN), una patología que se induce por la expresión y retención nuclear de transcritos de ARN mensajero (ARNm) que contienen regiones repetidas expandidas que se unen y secuestran proteínas del factor de empalme, interfiriendo así con el empalme adecuado de varios transcritos de ARNm. Las composiciones descritas en la presente que se pueden utilizar para tratar estos trastornos incluyen ácidos nucleicos que contienen construcciones de

ARN de interferencia que suprimen la expresión de transcritos de ARN que contienen regiones de repetición expandidas anormalmente, tal como construcciones de ARNip, miARN y ARNhc que recojan partes de transcritos de ARN expandidos repetidamente retenidos nuclearmente y promuevan la degradación de estos transcritos patológicos mediante varios procesos celulares. La presente descripción presenta adicionalmente vectores, tal como vectores virales, que codifican para estas construcciones de ARN de interferencia. Los vectores virales de ejemplo descritos en la presente que codifican para construcciones de ARN de interferencia (por ejemplo, ARNip, miARN o ARNhc) para suprimir la expresión de transcritos de ARN que contienen regiones de repetición anormalmente expandidas son vectores virales adenoasociados (AAV), tal como vectores AAV2/8 y AAV2/9 pseudotipados.

Al usar las composiciones y métodos descritos en la presente, a un paciente que experimenta una empalmopatía y/o tiene una enfermedad asociada con la dominancia del ARN, tal como distrofia miotónica, entre otros, se le puede administrar un ácido nucleico que contiene una construcción de ARN de interferencia, o un vector que lo codifica, para reducir la expresión de transcritos de ARN que contienen regiones de repetición expandidas y proteínas del factor de empalme de liberación que están secuestradas por el ARN expandido repetidamente. Por ejemplo, las composiciones y métodos descritos en la presente se pueden utilizar para tratar pacientes que tienen distrofia miotónica, ya que a esos pacientes se les puede administrar una construcción de ARN de interferencia o un vector viral, tal como un vector de AAV, que codifica para esa construcción, reduciendo así la expresión de los transcritos de ARN que codifican para la proteína cinasa de distrofia miotónica (DMPK). Las construcciones de ARN de DMPK de tipo silvestre habitualmente contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 37 repeticiones de trinucleótidos CUG en la región no traducida (UTR) 3' de esos transcritos. Sin embargo, los pacientes con distrofia miotónica expresan transcritos de ARN de DMPK que contienen 50 o más repeticiones de CUG. Las composiciones y métodos descritos en la presente se pueden utilizar para tratar pacientes que expresan este ARN de DMPK mutante, liberando así factores de empalme para orquestar el empalme adecuado de proteínas asociadas con la función muscular y tratando una causa subyacente de la distrofia miotónica. De manera similar, las composiciones y métodos descritos en la presente se pueden utilizar para reducir la empalmopatía en, y tratar una o más causas subyacentes de, varios otros trastornos asociados con la dominancia del ARN y la expresión de transcritos de ARN expandidos repetidamente.

La presente descripción se basa, en parte, en el descubrimiento sorprendente de que se pueden utilizar construcciones de ARN de interferencia que recojan dianas de ARN expandidas repetidamente en sitios distales de la región de repetición expandida para suprimir

la expresión de esos transcritos de ARN y liberar eficazmente proteínas del factor de empalme que de otro modo serían secuestradas por estas moléculas. Por lo tanto, las composiciones y métodos descritos en la presente pueden atenuar la expresión y retención nuclear de transcritos de ARN patológicos sin la necesidad de contener motivos de repetición de nucleótidos complementarios. Esta propiedad proporciona un beneficio clínico importante. Las repeticiones de nucleótidos son omnipresentes en genomas de mamíferos, tal como en los genomas de pacientes humanos. El uso de construcciones de ARN de interferencia que no tienen repeticiones de nucleótidos, sino más bien fijadas a otras regiones de un transcrito de ARN diana, permite la supresión selectiva de transcritos que dan lugar a trastornos de dominancia de ARN sin interrumpir la expresión de otros transcritos, tal como aquellos que codifican para otros genes que contienen regiones de repetición de nucleótidos pero que no secuestran aberrantemente o anormalmente proteínas del factor de empalme. Al usar las composiciones y métodos descritos en la presente, la expresión de transcritos de ARN que contienen expansiones de repetición de nucleótidos patológicos se puede disminuir, al tiempo que se preserva la expresión de transcritos de ARN saludables importantes (por ejemplo, un transcrito de ARN que codifica para un gen no diana que contiene una repetición de nucleótidos), así como sus productos de proteína de etapa posterior.

En un primer aspecto, la invención presenta un vector viral que contiene uno o más transgenes que codifican para un ARN de interferencia. Por ejemplo, el vector viral puede contener de uno a cinco de estos transgenes, de uno a 10 de estos transgenes, de uno a 15 de estos transgenes, de uno a 20 de dichos transgenes, de uno a 50 de estos transgenes, de uno a 100 de estos transgenes, de uno a 1,000 de estos transgenes o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 1,000 o más, de estos transgenes). El o los ARN de interferencia pueden tener al menos 5, al menos 10, al menos 17, al menos 19 o más nucleótidos de longitud (por ejemplo, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o más nucleótidos de longitud, tal como de 17 a 24, 18 a 23 o 19 a 22 nucleótidos de longitud).

El o los ARN de interferencia pueden, por ejemplo, cada uno ser, independientemente, de 10-35 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 10 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 11 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 12 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 13 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 14 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 15 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 16

nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 17 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 18 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 19 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 20 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 21 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 22 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 23 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 24 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 25 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 26 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 27 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 28 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 29 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 30 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 31 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 32 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 33 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 34 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia son 35 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, el o los ARN de interferencia contienen una porción que se fija a un transcripto de ARN endógeno que contiene una región de repetición expandida. La porción de cada uno o más ARN de interferencia se puede fijar a un segmento del transcripto de ARN endógeno que no se superpone con la región de repetición expandida.

En algunas modalidades, el transcripto de ARN endógeno codifica para DMPK humana y contiene una región de repetición expandida. La región de repetición expandida puede contener, por ejemplo, 50 o más repeticiones de trinucleótidos CUG, tal como de aproximadamente 50 a aproximadamente 4,000 repeticiones de trinucleótidos CUG (por ejemplo, aproximadamente 50 repeticiones de trinucleótidos CUG, aproximadamente 60 repeticiones de trinucleótidos CUG, aproximadamente 70 repeticiones de trinucleótidos, 80 repeticiones de trinucleótidos, 90 repeticiones de trinucleótidos, 100 repeticiones de trinucleótidos, 110 repeticiones de trinucleótidos, 120 repeticiones de trinucleótidos, 130 repeticiones de trinucleótidos, 140 repeticiones de trinucleótidos, 150 repeticiones de trinucleótidos, 160 repeticiones de trinucleótidos, 170 repeticiones de trinucleótidos, 180 repeticiones de trinucleótidos, 190 repeticiones de trinucleótidos, 200 repeticiones de

[illegible]

repeticiones de trinucleótidos, 1,900 repeticiones de trinucleótidos, 2,000 repeticiones de trinucleótidos, 2,100 repeticiones de trinucleótidos, 2,200 repeticiones de trinucleótidos, 2,300 repeticiones de trinucleótidos, 2,400 repeticiones de trinucleótidos, 2,500 repeticiones de trinucleótidos, 2,600 repeticiones de trinucleótidos, 2,700 repeticiones de trinucleótidos, 2,800 repeticiones de trinucleótidos, 2,900 repeticiones de trinucleótidos, 3,000 repeticiones de trinucleótidos, 3,100 repeticiones de trinucleótidos, 3,200 repeticiones de trinucleótidos, 3,300 repeticiones de trinucleótidos, 3,400 repeticiones de trinucleótidos, 3,500 repeticiones de trinucleótidos, 3,600 repeticiones de trinucleótidos, 3,700 repeticiones de trinucleótidos, 3,800 repeticiones de trinucleótidos, 3,900 repeticiones de trinucleótidos, o 4,000 repeticiones de trinucleótidos, entre otros). En algunas modalidades, el transcripto de ARN endógeno contiene una porción que tiene al menos 85% de identidad de secuencia (por ejemplo, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el transcripto de ARN endógeno contiene una porción que tiene al menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el transcripto de ARN endógeno contiene una porción que tiene al menos 95% de identidad de secuencia (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. El transcripto de ARN endógeno puede contener, por ejemplo, una porción que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

En algunas modalidades, el vector viral comprende además un transgén que codifica para DMPK humana, tal como una DMPK humana optimizada por codones que, tras la transcripción, no se hibrida al ARN de interferencia. Por ejemplo, el transcripto de DMPK expresado por el transgén que codifica para DMPK humana puede ser menos de 85% complementaria con el ARN de interferencia (por ejemplo, menos del 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1% complementaria, o menos). El transgén que codifica para DMPK humana puede estar unido operativamente al o los transgenes que codifican para el ARN de interferencia, por ejemplo, de modo que el o los ARN de interferencia y la DMPK se expresen a partir del mismo promotor. Esto se puede efectuar, por ejemplo, mediante la colocación de un sitio de entrada ribosómica interna (IRES) entre el o los transgenes que codifican para el o los ARN de interferencia y el transgén que codifica para la DMPK humana. En algunas modalidades, el o los transgenes

que codifican para el o los ARN de interferencia y el transgén que codifica para DMPK humana están cada uno unidos operativamente a promotores separados.

En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia se fija a un segmento del transcripto de ARN endógeno que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de cualquiera de SEQ ID NO: 3-39.

En algunas modalidades, la porción de cada anillo de ARN de interferencia a un segmento del transcripto de ARN endógeno dentro de cualquiera de los exones 1 -15 de ARN de DMPK humana (por ejemplo, a un segmento dentro del exón 1, exón 2, exón 3, exón 4, exón 5, exón 6, exón 7, exón 8, exón 9, exón 10, exón 11, exón 12, exón 13, exón 14, o exón 15 de ARN de DMPK humana). La porción de cada ARN de interferencia puede tener, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que es al menos 85% complementaria (por ejemplo, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de cualquiera de los exones 1 -15 de DMPK humana. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90% complementaria (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de cualquiera de los exones 1 -15 de DMPK humana. Por ejemplo, la porción de cada ARN de interferencia puede tener una secuencia de ácido nucleico que es al menos 95% complementaria (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de cualquiera de los exones 1 -15 de DMPK humana. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es completamente complementaria con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de cualquiera de los exones 1 -15 de DMPK humana.

En algunas modalidades, la porción de cada anillo de ARN de interferencia a un segmento del transcripto de ARN endógeno dentro de cualquiera de los intrones 1 -14 de ARN de DMPK humana (por ejemplo, a un segmento dentro del intrón 1, intrón 2, intrón 3, intrón 4, intrón 5, intrón 6, intrón 7, intrón 8, intrón 9, intrón 10, intrón 11, intrón 12, intrón 13, o intrón 14 de ARN de DMPK humana). La porción de cada ARN de interferencia puede tener, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que es al menos 85% complementaria (por ejemplo, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de cualquiera de los intrones 1 -14 de DMPK humana. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90% complementaria (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%,

99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de cualquiera de los intrones 1 -14 de DMPK humana. Por ejemplo, la porción de cada ARN de interferencia puede tener una secuencia de ácido nucleico que es al menos 95% complementaria (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de cualquiera de los intrones 1 -14 de DMPK humana. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es completamente complementaria con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de cualquiera de los intrones 1 -14 de DMPK humana.

En algunas modalidades, la porción de cada anillo de ARN de interferencia a un segmento del transcripto de ARN endógeno que contiene un límite de intrón de exón dentro de DMPK humana (por ejemplo, a un segmento que contiene el límite entre el exón 1 y el intrón 1, entre el intrón 1 y el exón 2, entre el exón 2 y el intrón 2, entre el intrón 2 y el exón 3, entre el exón 3 y el intrón 3, entre el intrón 3 y el exón 4, entre el exón 4 y el intrón 4, entre el intrón 4 y el exón 5, entre el exón 5 y el intrón 5, entre intrón 5 y exón 6, entre exón 6 e intrón 6, entre intrón 6 y exón 7, entre exón 7 e intrón 7, entre intrón 7 y exón 8, entre exón 8 e intrón 8, entre intrón 8 y exón 9, entre exón 9 e intrón 9, entre intrón 9 y exón 10, entre exón 10 e intrón 10, entre intrón 10 y exón 11, entre exón 11 e intrón 11, entre intrón 11 y exón 12, entre exón 12 e intrón 12, entre intrón 12 y exón 13, entre el exón 13 e intrón 13, entre el intrón 13 y el exón 14, entre el exón 14 y el intrón 14, o entre el intrón 14 y el exón 15). La porción de cada ARN de interferencia puede tener, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que es al menos 85% complementaria (por ejemplo, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento que contiene un límite de exón-intrón dentro de DMPK humana. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90% complementaria (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento que contiene un límite de exón-intrón dentro de DMPK humana. Por ejemplo, la porción de cada ARN de interferencia puede tener una secuencia de ácido nucleico que es al menos 95% complementaria (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento que contiene un límite de exón-intrón dentro de DMPK humana. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es completamente complementaria con la secuencia de ácido nucleico de un segmento que contiene un límite de intrón de exón dentro de DMPK humana.

En algunas modalidades, la porción de cada anillo de ARN de interferencia a un segmento del transcripto de ARN endógeno dentro de la UTR 5' o UTR 3' de DMPK humana. La porción de cada ARN de interferencia puede tener, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que es al menos 85% complementaria (por ejemplo, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de la 5' UTR o 3' UTR de DMPK humana. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90% complementaria (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de la UTR 5' o UTR 3' de DMPK humana. Por ejemplo, la porción de cada ARN de interferencia puede tener una secuencia de ácido nucleico que es al menos 95% complementaria (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de la 5' UTR o 3' UTR de DMPK humana. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es completamente complementaria con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de la 5' UTR o 3' UTR de DMPK humana.

En algunas modalidades, el segmento dentro de la DMPK humana es de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, el segmento puede ser 10 nucleótidos, 11 nucleótidos, 12 nucleótidos, 13 nucleótidos, 14 nucleótidos, 15 nucleótidos, 16 nucleótidos, 17 nucleótidos, 18 nucleótidos, 19 nucleótidos, 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos, 23 nucleótidos, 24 nucleótidos, 25 nucleótidos, 26 nucleótidos, 27 nucleótidos, 28 nucleótidos, 29 nucleótidos, 30 nucleótidos, 31 nucleótidos, 32 nucleótidos, 33 nucleótidos, 34 nucleótidos, 35 nucleótidos, 36 nucleótidos, 37 nucleótidos, 38 nucleótidos, 39 nucleótidos, 40 nucleótidos, 41 nucleótidos, 42 nucleótidos, 43 nucleótidos, 44 nucleótidos, 45 nucleótidos, 46 nucleótidos, 47 nucleótidos, 48 nucleótidos, 49 nucleótidos, 50 nucleótidos, 51 nucleótidos, 52 nucleótidos, 53 nucleótidos, 54 nucleótidos, 55 nucleótidos, 56 nucleótidos, 57 nucleótidos, 58 nucleótidos, 59 nucleótidos, 60 nucleótidos, 61 nucleótidos, 62 nucleótidos, 63 nucleótidos, 64 nucleótidos, 65 nucleótidos, 66 nucleótidos, 67 nucleótidos, 68 nucleótidos, 69 nucleótidos, 70 nucleótidos, 71 nucleótidos, 72 nucleótidos, 73 nucleótidos, 74 nucleótidos, 75 nucleótidos, 76 nucleótidos, 77 nucleótidos, 78 nucleótidos, 79 nucleótidos u 80 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento dentro de DMPK humana es de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, tal como un segmento de 15 nucleótidos, 16 nucleótidos, 17 nucleótidos, 18 nucleótidos, 19 nucleótidos, 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos, 23 nucleótidos, 24 nucleótidos, 25 nucleótidos,

26 nucleótidos, 27 nucleótidos, 28 nucleótidos, 29 nucleótidos, 30 nucleótidos, 31 nucleótidos, 32 nucleótidos, 33 nucleótidos, 34 nucleótidos, 35 nucleótidos, 36 nucleótidos, 37 nucleótidos, 38 nucleótidos, 39 nucleótidos, 40 nucleótidos, 41 nucleótidos, 42 nucleótidos, 43 nucleótidos, 44 nucleótidos, 45 nucleótidos, 46 nucleótidos, 47 nucleótidos, 48 nucleótidos, 49 nucleótidos o 50 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento dentro de la DMPK humana es de aproximadamente 17 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud, tal como 17 nucleótidos, 18 nucleótidos, 19 nucleótidos, 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos o 23 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento es 18 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento es 19 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento es 20 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento es 21 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, el ARN de interferencia se fija al transcripto de ARN endógeno que codifica para DMPK humana con de uno a ocho desajustes de nucleótidos (por ejemplo, con un desajuste de nucleótidos, dos desajustes de nucleótidos, tres desajustes de nucleótidos, cuatro desajustes de nucleótidos, cinco desajustes de nucleótidos, seis desajustes de nucleótidos, siete desajustes de nucleótidos u ocho desajustes de nucleótidos). En algunas modalidades, el ARN de interferencia se fija al transcripto de ARN endógeno que codifica para DMPK humana con de uno a cinco desajustes de nucleótidos, tal como con un desajuste de nucleótidos, dos desajustes de nucleótidos, tres desajustes de nucleótidos, cuatro desajustes de nucleótidos o cinco desajustes de nucleótidos. En algunas modalidades, el ARN de interferencia se fija al transcripto de ARN endógeno que codifica para DMPK humana con de uno a tres desajustes de nucleótidos, tal como con un desajuste de nucleótidos, dos desajustes de nucleótidos o tres desajustes de nucleótidos. En algunas modalidades, los anillos de ARN de interferencia con el transcripto de ARN endógeno que codifica para DMPK humana con no más de dos desajustes de nucleótidos. Por ejemplo, el ARN de interferencia se puede fijar al transcripto de ARN endógeno que codifica para DMKPK humana sin desajustes de nucleótidos, un desajuste de nucleótidos o dos desajustes de nucleótidos.

En algunas modalidades, el ARN de interferencia contiene una porción que tiene al menos 85% de identidad de secuencia (por ejemplo, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de SEQ ID NO: 3-161. El ARN de interferencia puede contener, por ejemplo, una porción que tiene al menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de la primera de las SEQ ID NO:

3-161. En algunas modalidades, el ARN de interferencia contiene una porción que tiene al menos 95% de identidad de secuencia (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de SEQ ID NO: 3-161. En algunas modalidades, el ARN de interferencia contiene una porción que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de cualquiera de SEQ ID NO: 3-161. En algunas modalidades, el ARN de interferencia es un miARN que tiene una combinación de hebras guía y pasajeras que se muestran en la Tabla 5, en la presente.

En algunas modalidades, el transcripto de ARN endógeno contiene el marco de lectura abierto 72 del cromosoma 9 humano (C90RF72) y una región de repetición expandida. La región de repetición expandida puede contener, por ejemplo, más de 25 repeticiones de hexanucleótidos de GGGGCC (SEQ ID NO: 162), tal como de aproximadamente 700 a aproximadamente 1,600 repeticiones de hexanucleótidos de GGGGCC (SEQ ID NO: 162). Por ejemplo, la región de repetición expandida puede contener 700 repeticiones de hexanucleótidos, 710 repeticiones de hexanucleótidos, 720 repeticiones de hexanucleótidos, 730 repeticiones de hexanucleótidos, 740 repeticiones de hexanucleótidos, 750 repeticiones de hexanucleótidos, 760 repeticiones de hexanucleótidos, 770 repeticiones de hexanucleótidos, 780 repeticiones de hexanucleótidos, 790 repeticiones de hexanucleótidos, 800 repeticiones de hexanucleótidos, 810 repeticiones de hexanucleótidos, 820 repeticiones de hexanucleótidos, 830 repeticiones de hexanucleótidos, 840 repeticiones de hexanucleótidos, 850 repeticiones de hexanucleótidos, 860 repeticiones de hexanucleótidos, 870 repeticiones de hexanucleótidos, 880 repeticiones de hexanucleótidos, 890 repeticiones de hexanucleótidos, 900 repeticiones de hexanucleótidos, 910 repeticiones de hexanucleótidos, 920 repeticiones de hexanucleótidos, 930 repeticiones de hexanucleótidos, 940 repeticiones de hexanucleótidos, 950 repeticiones de hexanucleótidos, 960 repeticiones de hexanucleótidos, 970 repeticiones de hexanucleótidos, 980 repeticiones de hexanucleótidos, 990 repeticiones de hexanucleótidos, o 1,000 repeticiones de hexanucleótidos, entre otros. La región de repetición expandida puede contener más de 30 repeticiones de hexanucleótidos, tal como 30 repeticiones de hexanucleótidos, 40 repeticiones de hexanucleótidos, 50 repeticiones de hexanucleótidos, 60 repeticiones de hexanucleótidos de CUG, 70 repeticiones de hexanucleótidos, 80 repeticiones de hexanucleótidos, 90 repeticiones de hexanucleótidos, 100 repeticiones de hexanucleótidos, 110 repeticiones de hexanucleótidos, 120 repeticiones de hexanucleótidos, 130 repeticiones de hexanucleótidos, 140 repeticiones de hexanucleótidos, 150 repeticiones de hexanucleótidos, 160 repeticiones de hexanucleótidos, 170 repeticiones de hexanucleótidos, 180 repeticiones de hexanucleótidos, 190 repeticiones de hexanucleótidos, 200 repeticiones de hexanucleótidos,

[illegible]

hexanucleótidos, 1,300 repeticiones de hexanucleótidos, 1,400 repeticiones de hexanucleótidos, 1,500 repeticiones de hexanucleótidos, 1,600 repeticiones de hexanucleótidos, o más.

En algunas modalidades, el transcripto de ARN endógeno contiene una porción que tiene al menos 85% de identidad de secuencia (por ejemplo, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 163. El transcripto de ARN endógeno puede contener, por ejemplo, una porción que tiene al menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 163. En algunas modalidades, el transcripto de ARN endógeno contiene una porción que tiene al menos 95% de identidad de secuencia (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 163. En algunas modalidades, el transcripto de ARN contiene una porción que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 163.

En algunas modalidades, el transcripto de ARN endógeno contiene una porción que tiene al menos 85% de identidad de secuencia (por ejemplo, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 165. El transcripto de ARN endógeno puede contener, por ejemplo, una porción que tiene al menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 165. En algunas modalidades, el transcripto de ARN endógeno contiene una porción que tiene al menos 95% de identidad de secuencia (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 165. En algunas modalidades, el transcripto de ARN contiene una porción que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 165.

En algunas modalidades, el transcripto de ARN endógeno contiene una porción que tiene al menos 85% de identidad de secuencia (por ejemplo, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 166. El transcripto de ARN endógeno puede contener, por ejemplo, una porción que tiene al menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 166. En algunas modalidades, el transcripto de ARN endógeno

contiene una porción que tiene al menos 95% de identidad de secuencia (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 166. En algunas modalidades, el transcripto de ARN contiene una porción que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 166.

En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 85% complementaria (por ejemplo, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de C90RF72 humana, tal como con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de SEQ ID NO: 163, 165, o 166. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90% complementaria (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de C90RF72 humana, tal como con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de SEQ ID NO: 163, 165, o 166. Por ejemplo, la porción de cada ARN de interferencia puede tener una secuencia de ácido nucleico que es al menos 95% complementaria (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de C90RF72 humana, tal como con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de SEQ ID NO: 163, 165, o 166. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es completamente complementaria con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de C90RF72 humana, tal como con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de SEQ ID NO: 163, 165, o 166.

En algunas modalidades, el segmento dentro de la C90RF72 humana es de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, el segmento puede ser 10 nucleótidos, 11 nucleótidos, 12 nucleótidos, 13 nucleótidos, 14 nucleótidos, 15 nucleótidos, 16 nucleótidos, 17 nucleótidos, 18 nucleótidos, 19 nucleótidos, 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos, 23 nucleótidos, 24 nucleótidos, 25 nucleótidos, 26 nucleótidos, 27 nucleótidos, 28 nucleótidos, 29 nucleótidos, 30 nucleótidos, 31 nucleótidos, 32 nucleótidos, 33 nucleótidos, 34 nucleótidos, 35 nucleótidos, 36 nucleótidos, 37 nucleótidos, 38 nucleótidos, 39 nucleótidos, 40 nucleótidos, 41 nucleótidos, 42 nucleótidos, 43 nucleótidos, 44 nucleótidos, 45 nucleótidos, 46 nucleótidos, 47 nucleótidos, 48 nucleótidos, 49 nucleótidos, 50 nucleótidos, 51 nucleótidos, 52 nucleótidos, 53 nucleótidos, 54 nucleótidos, 55 nucleótidos, 56 nucleótidos, 57 nucleótidos, 58 nucleótidos, 59 nucleótidos, 60 nucleótidos, 61 nucleótidos, 62 nucleótidos, 63 nucleótidos, 64 nucleótidos, 65 nucleótidos, 66 nucleótidos, 67 nucleótidos, 68 nucleótidos, 69 nucleótidos, 70 nucleótidos, 71 nucleótidos, 72 nucleótidos, 73 nucleótidos,

74 nucleótidos, 75 nucleótidos, 76 nucleótidos, 77 nucleótidos, 78 nucleótidos, 79 nucleótidos u 80 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento dentro de C90RF72 humana es de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, tal como un segmento de 15 nucleótidos, 16 nucleótidos, 17 nucleótidos, 18 nucleótidos, 19 nucleótidos, 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos, 23 nucleótidos, 24 nucleótidos, 25 nucleótidos, 26 nucleótidos, 27 nucleótidos, 28 nucleótidos, 29 nucleótidos, 30 nucleótidos, 31 nucleótidos, 32 nucleótidos, 33 nucleótidos, 34 nucleótidos, 35 nucleótidos, 36 nucleótidos, 37 nucleótidos, 38 nucleótidos, 39 nucleótidos, 40 nucleótidos, 41 nucleótidos, 42 nucleótidos, 43 nucleótidos, 44 nucleótidos, 45 nucleótidos, 46 nucleótidos, 47 nucleótidos, 48 nucleótidos, 49 nucleótidos o 50 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento dentro de la C90RF72 humana es de aproximadamente 17 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud, tal como 17 nucleótidos, 18 nucleótidos, 19 nucleótidos, 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos o 23 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento es 18 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento es 19 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento es 20 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento es 21 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, el ARN de interferencia se fija al transcripto de ARN endógeno que codifica para C90RF72 humana con de uno a ocho desajustes de nucleótidos (por ejemplo, con un desajuste de nucleótidos, dos desajustes de nucleótidos, tres desajustes de nucleótidos, cuatro desajustes de nucleótidos, cinco desajustes de nucleótidos, seis desajustes de nucleótidos, siete desajustes de nucleótidos u ocho desajustes de nucleótidos). En algunas modalidades, el ARN de interferencia se fija al transcripto de ARN endógeno que codifica para C90RF72 humana con de uno a cinco desajustes de nucleótidos, tal como con un desajuste de nucleótidos, dos desajustes de nucleótidos, tres desajustes de nucleótidos, cuatro desajustes de nucleótidos o cinco desajustes de nucleótidos. En algunas modalidades, el ARN de interferencia se fija al transcripto de ARN endógeno que codifica para C90RF72 humana con de uno a tres desajustes de nucleótidos, tal como con un desajuste de nucleótidos, dos desajustes de nucleótidos o tres desajustes de nucleótidos. En algunas modalidades, los anillos de ARN de interferencia con el transcripto de ARN endógeno que codifica para C90RF72 humana con no más de dos desajustes de nucleótidos. Por ejemplo, el ARN de interferencia se puede fijar al transcripto de ARN endógeno que codifica para C90RF72 humana sin desajustes de nucleótidos, un desajuste de nucleótidos o dos desajustes de nucleótidos.

En algunas modalidades, el ARN de interferencia es un ARN de interferencia corto (ARNip), un ARN de horquilla corta (ARNhc) o un micro ARN (miARN), tal como un miARN de

U6. El miARN se puede basar, por ejemplo, en la secuencia de ácido nucleico endógeno de miR30a humana, que tiene una o más sustituciones de ácido nucleico según sea necesario para complementariedad con un ARNm diana (por ejemplo, un ARNm diana descrito en la presente). En el caso de un miARN, el vector viral puede contener, por ejemplo, un transcripto de miARN primario (pri-miARN) que codifica para un miARN maduro. En algunas modalidades, el vector viral contiene un transcripto de pre-miARN que codifica para un miARN maduro.

En algunas modalidades, el ARN de interferencia está unido operativamente a un promotor que induce la expresión del ARN de interferencia en una célula muscular o neurona. El promotor puede ser, por ejemplo, un promotor de desmina, un promotor de fosfoglicerato cinasa (PGK), un promotor de creatina cinasa muscular, un promotor de cadena ligera de miosina, un promotor de cadena pesada de miosina, un promotor de troponina C cardíaca, un promotor de troponina I, un promotor de la familia de genes mioD, un promotor de actina alfa, un promotor de actina beta, un promotor de actina gamma o un promotor dentro del intrón 1 de homeodominio 3 emparejado ocular (PITX3).

En algunas modalidades, el vector viral es un AAV, adenovirus, lentivirus, retrovirus, poxvirus, baculovirus, virus de herpes simple, virus de vaccinia o un virus sintético. El vector viral puede ser, por ejemplo, un serotipo de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10 o AAVrh74. En algunas modalidades, el vector viral es un AAV pseudotipado, tal como un vector de AAV2/8 o AAV/29. El vector viral puede contener una proteína de cápside recombinante. En algunas modalidades, el vector viral es un virus sintético, tal como un virus quimérico, virus de mosaico o virus pseudotipado, y/o un virus sintético que contiene una proteína extraña, polímero sintético, nanopartícula o molécula pequeña.

En otro aspecto, la invención presenta un ácido nucleico que codifica para o contiene un ARN de interferencia que contiene una porción que tiene al menos 85% de identidad de secuencia (por ejemplo, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de SEQ ID NO: 3-161. En algunas modalidades, el ARN de interferencia contiene una porción que tiene al menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de SEQ ID NO: 3-161. El ARN de interferencia puede contener, por ejemplo, una porción que tiene al menos 95% de identidad de secuencia (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEQ ID NO: 3-161. En

algunas modalidades, el ARN de interferencia contiene una porción que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de cualquiera de SEQ ID NO: 3-161. En algunas modalidades, el ARN de interferencia es un miARN que tiene una combinación de hebras guía y pasajeras que se muestran en la Tabla 5, en la presente.

En algunas modalidades, la porción de cada anillo de ARN de interferencia a un segmento de un transcripto de ARN endógeno que codifica para DMPK humana dentro de cualquiera de los exones 1 -15 de ARN de DMPK humana (por ejemplo, a un segmento dentro del exón 1, exón 2, exón 3, exón 4, exón 5, exón 6, exón 7, exón 8, exón 9, exón 10, exón 11, exón 12, exón 13, exón 14, o exón 15 de ARN de DMPK humana). La porción de cada ARN de interferencia puede tener, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que es al menos 85% complementaria (por ejemplo, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de cualquiera de los exones 1 -15 de DMPK humana. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90% complementaria (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de cualquiera de los exones 1 -15 de DMPK humana. Por ejemplo, la porción de cada ARN de interferencia puede tener una secuencia de ácido nucleico que es al menos 95% complementaria (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de cualquiera de los exones 1 -15 de DMPK humana. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es completamente complementaria con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de cualquiera de los exones 1 -15 de DMPK humana.

En algunas modalidades, la porción de cada anillo de ARN de interferencia a un segmento de un transcripto de ARN endógeno que codifica para DMPK humana dentro de cualquiera de los intrones 1 -14 de ARN de DMPK humana (por ejemplo, a un segmento dentro del intrón 1, intrón 2, intrón 3, intrón 4, intrón 5, intrón 6, intrón 7, intrón 8, intrón 9, intrón 10, intrón 11, intrón 12, intrón 13, o intrón 14 de ARN de DMPK humana). La porción de cada ARN de interferencia puede tener, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que es al menos 85% complementaria (por ejemplo, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de cualquiera de los intrones 1 -14 de DMPK humana. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90% complementaria (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de cualquiera de los intrones 1 -14 de DMPK humana. Por ejemplo, la porción de cada ARN de interferencia puede tener una secuencia de ácido nucleico que es al menos 95% complementaria (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de cualquiera de los intrones 1 -14 de DMPK humana. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es completamente complementaria con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de cualquiera de los intrones 1 -14 de DMPK humana.

En algunas modalidades, la porción de cada anillo de ARN de interferencia a un segmento de un transcripto de ARN endógeno que codifica para DMPK humana que contiene un límite de intrón de exón dentro de DMPK humana (por ejemplo, a un segmento que contiene el límite entre el exón 1 y el intrón 1, entre el intrón 1 y el exón 2, entre el exón 2 y el intrón 2, entre el intrón 2 y el exón 3, entre el exón 3 y el intrón 3, entre el intrón 3 y el exón 4, entre el exón 4 y el intrón 4, entre el intrón 4 y el exón 5, entre el exón 5 y el intrón 5, entre intrón 5 y exón 6, entre exón 6 e intrón 6, entre intrón 6 y exón 7, entre exón 7 e intrón 7, entre intrón 7 y exón 8, entre exón 8 e intrón 8, entre intrón 8 y exón 9, entre exón 9 e intrón 9, entre intrón 9 y exón 10, entre exón 10 e intrón 10, entre intrón 10 y exón 11, entre exón 11 e intrón 11, entre intrón 11 y exón 12, entre exón 12 e intrón 12, entre intrón 12 y exón 13, entre el exón 13 e intrón 13, entre el intrón 13 y el exón 14, entre el exón 14 y el intrón 14, o entre el intrón 14 y el exón 15). La porción de cada ARN de interferencia puede tener, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que es al menos 85% complementaria (por ejemplo, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento que contiene un límite de exón-intrón dentro de DMPK humana. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90% complementaria (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento que contiene un límite de exón-intrón dentro de DMPK humana. Por ejemplo, la porción de cada ARN de interferencia puede tener una secuencia de ácido nucleico que es al menos 95% complementaria (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento que contiene un límite de exón-intrón dentro de DMPK humana. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es completamente complementaria con la

secuencia de ácido nucleico de un segmento que contiene un límite de intrón de exón dentro de DMPK humana.

En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia se fija a un segmento de un transcripto de ARN endógeno que codifica para DMPK humana dentro de la UTR 5' o UTR 3' de DMPK humana. La porción de cada ARN de interferencia puede tener, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que es al menos 85% complementaria (por ejemplo, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de la 5' UTR o 3' UTR de DMPK humana. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90% complementaria (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de la UTR 5' o UTR 3' de DMPK humana. Por ejemplo, la porción de cada ARN de interferencia puede tener una secuencia de ácido nucleico que es al menos 95% complementaria (por ejemplo, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de la 5' UTR o 3' UTR de DMPK humana. En algunas modalidades, la porción de cada ARN de interferencia tiene una secuencia de ácido nucleico que es completamente complementaria con la secuencia de ácido nucleico de un segmento dentro de la 5' UTR o 3' UTR de DMPK humana.

En algunas modalidades, el segmento dentro de la DMPK humana es de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, el segmento puede ser 10 nucleótidos, 11 nucleótidos, 12 nucleótidos, 13 nucleótidos, 14 nucleótidos, 15 nucleótidos, 16 nucleótidos, 17 nucleótidos, 18 nucleótidos, 19 nucleótidos, 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos, 23 nucleótidos, 24 nucleótidos, 25 nucleótidos, 26 nucleótidos, 27 nucleótidos, 28 nucleótidos, 29 nucleótidos, 30 nucleótidos, 31 nucleótidos, 32 nucleótidos, 33 nucleótidos, 34 nucleótidos, 35 nucleótidos, 36 nucleótidos, 37 nucleótidos, 38 nucleótidos, 39 nucleótidos, 40 nucleótidos, 41 nucleótidos, 42 nucleótidos, 43 nucleótidos, 44 nucleótidos, 45 nucleótidos, 46 nucleótidos, 47 nucleótidos, 48 nucleótidos, 49 nucleótidos, 50 nucleótidos, 51 nucleótidos, 52 nucleótidos, 53 nucleótidos, 54 nucleótidos, 55 nucleótidos, 56 nucleótidos, 57 nucleótidos, 58 nucleótidos, 59 nucleótidos, 60 nucleótidos, 61 nucleótidos, 62 nucleótidos, 63 nucleótidos, 64 nucleótidos, 65 nucleótidos, 66 nucleótidos, 67 nucleótidos, 68 nucleótidos, 69 nucleótidos, 70 nucleótidos, 71 nucleótidos, 72 nucleótidos, 73 nucleótidos, 74 nucleótidos, 75 nucleótidos, 76 nucleótidos, 77 nucleótidos, 78 nucleótidos, 79 nucleótidos u 80 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento dentro de DMPK humana es de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, tal como un

segmento de 15 nucleótidos, 16 nucleótidos, 17 nucleótidos, 18 nucleótidos, 19 nucleótidos, 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos, 23 nucleótidos, 24 nucleótidos, 25 nucleótidos, 26 nucleótidos, 27 nucleótidos, 28 nucleótidos, 29 nucleótidos, 30 nucleótidos, 31 nucleótidos, 32 nucleótidos, 33 nucleótidos, 34 nucleótidos, 35 nucleótidos, 36 nucleótidos, 37 nucleótidos, 38 nucleótidos, 39 nucleótidos, 40 nucleótidos, 41 nucleótidos, 42 nucleótidos, 43 nucleótidos, 44 nucleótidos, 45 nucleótidos, 46 nucleótidos, 47 nucleótidos, 48 nucleótidos, 49 nucleótidos o 50 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento dentro de la DMPK humana es de aproximadamente 17 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud, tal como 17 nucleótidos, 18 nucleótidos, 19 nucleótidos, 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos o 23 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento es 18 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento es 19 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento es 20 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el segmento es 21 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, el ARN de interferencia se fija a un transcripto de ARN endógeno que codifica para DMPK humana con de uno a ocho desajustes de nucleótidos (por ejemplo, con un desajuste de nucleótidos, dos desajustes de nucleótidos, tres desajustes de nucleótidos, cuatro desajustes de nucleótidos, cinco desajustes de nucleótidos, seis desajustes de nucleótidos, siete desajustes de nucleótidos u ocho desajustes de nucleótidos). En algunas modalidades, el ARN de interferencia se fija a un transcripto de ARN endógeno que codifica para DMPK humana con de uno a cinco desajustes de nucleótidos, tal como con un desajuste de nucleótidos, dos desajustes de nucleótidos, tres desajustes de nucleótidos, cuatro desajustes de nucleótidos o cinco desajustes de nucleótidos. En algunas modalidades, el ARN de interferencia se fija a un transcripto de ARN endógeno que codifica para DMPK humana con de uno a tres desajustes de nucleótidos, tal como con un desajuste de nucleótidos, dos desajustes de nucleótidos o tres desajustes de nucleótidos. En algunas modalidades, el ARN de interferencia se fija a un transcripto de ARN endógeno que codifica para DMPK humana con no más de dos desajustes de nucleótidos. Por ejemplo, el ARN de interferencia se puede fijar al transcripto de ARN endógeno que codifica para DMKPK humana sin desajustes de nucleótidos, un desajuste de nucleótidos o dos desajustes de nucleótidos.

En algunas modalidades, el ARN de interferencia es un ARNip, un ARNhc o un miARN, tal como un miARN de U6. El miARN se puede basar, por ejemplo, en la secuencia de ácido nucleico endógeno de miR30a humana, que tiene una o más sustituciones de ácido nucleico según sea necesario para complementariedad con un ARNm diana (por ejemplo, un ARNm diana descrito en la presente). En el caso de un miARN, el ácido nucleico puede contener, por ejemplo, un transcripto de pri-miARN que codifica para un miARN maduro. En algunas

modalidades, el vector viral contiene un transcripto de pre-miARN que codifica para un miARN maduro.

En algunas modalidades, el ARN de interferencia está unido operativamente a un promotor que induce la expresión del ARN de interferencia en una célula muscular o neurona. El promotor puede ser, por ejemplo, un promotor de desmina, un promotor de PGK, un promotor de creatina cinasa muscular, un promotor de cadena ligera de miosina, un promotor de cadena pesada de miosina, un promotor de troponina C cardíaca, un promotor de troponina I, un promotor de la familia de genes mioD, un promotor de actina alfa, un promotor de actina beta, un promotor de actina gamma o un promotor dentro del intrón 1 de PITX3 ocular.

En un aspecto adicional, la invención presenta un vector que contiene el ácido nucleico de cualquiera de los aspectos o modalidades anteriores. El vector puede ser, por ejemplo, un serotipo de AAV (p. ej., un serotipo de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10 o AAVrh74, o un AAV pseudotipado, tal como un vector de AAV2/8 o AAV/29), adenovirus, lentivirus, retrovirus, poxvirus, baculovirus, virus de herpes simple, virus de vaccinia o un virus sintético (p. ej., un virus quimérico, virus de mosaico o virus pseudotipado, y/o un virus sintético que contiene una proteína extraña, polímero sintético, nanopartícula o molécula pequeña), y puede contener una o más proteínas de cápside recombinante.

En un otro aspecto, la invención presenta una composición que contiene el ácido nucleico de cualquiera de los aspectos o modalidades anteriores. La composición puede ser, por ejemplo, un liposoma, vesícula, vesícula sintética, exosoma, exosoma sintético, dendrímero o nanopartícula.

En otro aspecto, la invención presenta una composición farmacéutica que contiene el ácido nucleico de cualquiera de los aspectos o modalidades anteriores. La composición farmacéutica puede contener además un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la invención presenta un método para reducir la aparición de empalmopatía (por ejemplo, de un transcripto de ARNm para la cual el empalme está regulado, en parte, por la actividad de proteína similar a ciego muscular) en un paciente, tal como un paciente humano, en necesidad de lo mismo. El método puede incluir administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del vector o composición de cualquiera de los aspectos o modalidades anteriores. En algunas modalidades, el paciente tiene distrofia miotónica. Tras la administración del vector o composición al paciente, el paciente puede exhibir un aumento en el empalme correctivo de uno o más sustratos de transcripto de ARN de proteína tipo ceguera muscular.

En otro aspecto, la invención presenta un método para tratar un trastorno caracterizado por retención nuclear de ARN que contiene una región de repetición expandida en un paciente, tal como un paciente humano, en necesidad de lo mismo mediante la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva del vector o composición de cualquiera de los aspectos o modalidades anteriores. El trastorno puede ser, por ejemplo, distrofia miotónica y el ARN retenido nuclearmente puede ser ARN de DMPK. En algunas modalidades, el trastorno es esclerosis lateral amiotrófica y el ARN reformado nuclearmente es ARN de C90RF72.

Tras la administración del vector o composición al paciente, el paciente puede exhibir un aumento en el empalme correctivo de uno o más sustratos de transcritos de ARN de proteína tipo ceguera muscular. Por ejemplo, después de la administración del vector o composición al paciente, el paciente puede exhibir un aumento en la expresión de ARNm de ATPasa 1 de calcio de retículo sarcoplásmico/endoplásmico (SERCA1) que contiene el exón 22, tal como un aumento de aproximadamente 1.1 veces a aproximadamente 10 veces, o más (por ejemplo, un aumento en la expresión de ARNm de SERCA1 que contiene el exón 22 en aproximadamente 1.1 veces, 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 1.6 veces, 1.7 veces, 1.8 veces, 1.9 veces, 2 veces, 2.1 veces, 2.2 veces, 2.3 veces, 2.4 veces, 2.5 veces, 2.6 veces, 2.7 veces, 2.8 veces, 2.9 veces, 3 veces, 3.1 veces, 3.2 veces, 3.3 veces, 3.4 veces, 3.5 veces, 3.6 veces, 3.7 veces, 3.8 veces, 3.9 veces, 4 veces, 4.1 veces, 4.2 veces, 4.3 veces, 4.4 veces, 4.5 veces, 4.6 veces, 4.7 veces, 4.8 veces, 4.9 veces, 5 veces, 5.1 veces, 5.2 veces, 5.3 veces, 5.4 veces, 5.5 veces, 5.6 veces, 5.7 veces, 5.8 veces, 5.9 veces, 6 veces, 6.1 veces, 6.2 veces, 6.3 veces, 6.4 veces, 6.5 veces, 6.6 veces, 6.7 veces, 6.8 veces, 6.9 veces, 7 veces, 7.1 veces, 7.2 veces, 7.3 veces, 7.4 veces, 7.5 veces, 7.6 veces, 7.7 veces, 7.8 veces, 7.9 veces, 8 veces, 8.1 veces, 8.2 veces, 8.3 veces, 8.4 veces, 8.5 veces, 8.6 veces, 8.7 veces, 8.8 veces, 8.9 veces, 9 veces, 9.1 veces, 9.2 veces, 9.3 veces, 9.4 veces, 9.5 veces, 9.6 veces, 9.7 veces, 9.8 veces, 9.9 veces, 10 veces, o más), tal como se evaluó, por ejemplo, utilizando un ensayo de detección de ARN o proteínas descrito en la presente.

En algunas modalidades, luego de la administración del vector o composición al paciente, el paciente puede exhibir una disminución en la expresión de ARNm de canal 1 activado por voltaje de cloruro (CLCN1) que contiene exón 7a, tal como una disminución de aproximadamente 1% a aproximadamente 100% (por ejemplo, una disminución en la expresión de ARNm de CLCN1 que contiene exón 7a por aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%,

38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%), como se evaluó, por ejemplo, usando un ensayo de detección de ARN o proteína, descrito en la presente.

Por ejemplo, luego de la administración del vector o composición al paciente, el paciente puede exhibir una disminución en la expresión de proteína de mota asociada con ZO-2 (ZASP) que contiene el exón 11, tal como una disminución de aproximadamente 1% a aproximadamente 100% (por ejemplo, una disminución en la expresión de ARNm de ZASP que contiene el exón 11 por aproximadamente 1 %, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11 %, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%), tal como se evaluó, por ejemplo, usando un ensayo de detección de ARN o proteína descrito en la presente.

En algunas modalidades, luego de la administración del vector o composición al paciente, el paciente exhibe un aumento en el empalme correctivo de transcritos de ARN que codifican para el receptor de insulina, receptor de rianodina 1 (RYR1), troponina de músculo cardíaco y/o troponina de músculo esquelético, tal como un aumento de aproximadamente 1.1 veces a aproximadamente 10 veces, o más (por ejemplo, un aumento en la expresión de transcritos de ARN empalmados correctamente que codifican para el receptor de insulina, RYR1, troponina de músculo cardíaco y/o troponina de músculo esquelético en aproximadamente 1.1 veces, 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 1.6 veces, 1.7 veces, 1.8 veces, 1.9 veces, 2 veces, 2.1 veces, 2.2 veces, 2.3 veces, 2.4 veces, 2.5 veces, 2.6 veces, 2.7 veces, 2.8 veces, 2.9 veces, 3 veces, 3.1 veces, 3.2 veces, 3.3 veces, 3.4 veces, 3.5 veces, 3.6 veces, 3.7 veces, 3.8 veces, 3.9 veces, 4 veces, 4.1 veces, 4.2 veces, 4.3 veces, 4.4 veces, 4.5 veces, 4.6 veces, 4.7 veces, 4.8 veces, 4.9 veces, 5 veces, 5.1 veces, 5.2 veces, 5.3 veces, 5.4 veces, 5.5 veces, 5.6 veces, 5.7 veces, 5.8 veces, 5.9 veces, 6 veces, 6.1 veces, 6.2 veces,, 6.3 veces, 6.4 veces, 6.5 veces, 6.6 veces, 6.7 veces, 6.8 veces, 6.9 veces, 7 veces, 7.1 veces, 7.2 veces, 7.3 veces, 7.4 veces, 7.5 veces, 7.6 veces, 7.7 veces, 7.8 veces, 7.9 veces, 8 veces, 8.1 veces, 8.2 veces, 8.3 veces, 8.4 veces, 8.5 veces, 8.6 veces, 8.7 veces, 8.8 veces, 8.9 veces, 9 veces, 9.1 veces, 9.2 veces,

9.3 veces, 9.4 veces, 9.5 veces, 9.6 veces, 9.7 veces, 9.8 veces, 9.9 veces, 10 veces o más), como se evaluó, por ejemplo, utilizando un ensayo de detección de ARN o proteínas descrito en la presente.

En algunas modalidades de cualquiera de los dos aspectos anteriores, el vector o composición se administra al paciente por vía intravenosa, intratecal, intracerebroventricular, intraparenquimatosa, intracisternal, intradérmica, transdérmica, parenteral, intramuscular, intranasal, subcutánea, percutánea, intratraqueal, intraperitoneal, intraarterial, intravascular, inhalación, perfusión, lavado o administración oral.

En otro aspecto, la invención presenta un kit que contiene el vector o composición de cualquiera de los aspectos o modalidades anteriores. El kit puede contener además un prospecto que indica a un usuario del kit que administre el vector o composición al paciente para reducir la aparición de una empalmopatía en el paciente, tal como empalmopatía de un transcrito de ARNm para la cual el empalme está regulado, en parte, por la actividad de proteína tipo ceguera muscular.

En un aspecto adicional, la invención presenta un kit que contiene el vector o composición de cualquiera de los aspectos o modalidades anteriores y un prospecto que instruye a un usuario del kit para administrar el vector o composición al paciente para reducir la aparición de una empalmopatía en el paciente para tratar un trastorno caracterizado por retención nuclear de ARN que contiene una región de repetición expandida. El trastorno puede ser, por ejemplo, distrofia miotónica y el ARN retenido nuclearmente puede ser ARN de DMPK. En algunas modalidades, el trastorno es esclerosis lateral amiotrófica y el ARN reformado nuclearmente es ARN de C90RF72.

Definiciones

Como se usa en la presente, el término "aproximadamente" se refiere a un valor que está dentro de 10% por arriba o por abajo del valor que se describe. Por ejemplo, la frase "aproximadamente 100 residuos de ácido nucleico" se refiere a un valor de 90 a 110 residuos de ácido nucleico.

Como se usa en la presente, el término "fijar" se refiere a la formación de un dúplex estable de ácidos nucleicos mediante hibridación mediada por unión de hidrógeno entre hebras, por ejemplo, de acuerdo con el apareamiento de bases Watson-Crick. Los ácidos nucleicos del dúplex pueden ser, por ejemplo, al menos 50% complementarios entre sí (por ejemplo, aproximadamente 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementarios entre sí. El "dúplex estable" formado tras

la fijación de un ácido nucleico a otro es una estructura dúplex que no se desnaturaliza mediante un lavado riguroso. Los ejemplos de condiciones de lavado rigurosas se conocen en la técnica e incluyen temperaturas de aproximadamente 5°C menos que la temperatura de fusión de una hebra individual del dúplex y concentraciones bajas de sales monovalentes, tal como concentraciones de sal monovalente (por ejemplo, concentraciones de NaCl) de menos de 0.2 M (por ejemplo, 0.2 M, 0.19 M, 0.18 M, 0.17 M, 0.16 M, 0.15 M, 0.14 M, 0.13 M, 0.12 M, 0.11 M, 0.1 M, 0.09 M, 0.08 M, 0.07 M, 0.06 M, 0.05 M, 0.04 M, 0.03 M, 0.02 M, 0.01 M o menos).

Como se usa en la presente, los términos “mutación conservadora”, “sustitución conservadora” o “sustitución conservadora de aminoácidos” se refieren a una sustitución de uno o más aminoácidos por uno o más aminoácidos diferentes que exhiben propiedades fisicoquímicas similares, tal como polaridad, carga electrostática y volumen estérico. Estas propiedades se resumen para cada uno de los veinte aminoácidos de origen natural en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas representativas de aminoácidos de origen natural

Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra	Lateral-cadena Polaridad	Carácter electrostático a pH fisiológico (7.4)	Estérico Volumen*
Alanina	Ala	A	no polar	neutro	pequeño
Arginina	Arg	R	polar	catiónico	grande
Asparagina	Asn	N	polar	neutro	intermedio
Ácido aspártico	Asp	D	polar	aniónico	intermedio
Cisteína	Cys	C	no polar	neutro	intermedio
Ácido glutámico	Glu	E	polar	aniónico	intermedio
Glutamina	Gln	Q	polar	neutro	intermedio
Glicina	Gly	G	no polar	neutro	pequeño
Histidina	His	H	polar	Formas tanto neutras como catiónicas en equilibrio a pH 7.4	grande
Isoleucina	Ile	I	no polar	neutro	grande
Leucina	Leu	L	no polar	neutro	grande
Lisina	Lys	K	polar	catiónico	grande

Metionina	Met	M	no polar	neutro	grande
Fenilalanina	Phe	F	no polar	neutro	grande
Prolina	Pro	P	no polar	neutro	intermedio
Serina	Ser	S	polar	neutro	pequeño
Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra	Lateral-cadena Polaridad	Carácter electrostático a pH fisiológico (7.4)	Estérico Volumen*
Treonina	Thr	T	polar	neutro	intermedio
Triptófano	Trp	W	no polar	neutro	voluminoso
Tirosina	Tyr	Y	polar	neutro	grande
Valine	Val	V	no polar	neutro	intermedio

150-200 es grande, y >200 es voluminoso

A partir de esta tabla, se aprecia que las familias de aminoácidos conservadores incluyen, por ejemplo, (i) G, A, V, L, I, P, y M; (ii) D y E; (iii) C, S y T; (iv) H, K y R; (v) N y Q; y (vi) F, Y and W. Por lo tanto, una mutación o sustitución conservadora es una que sustituye un aminoácido por un miembro de la misma familia de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución de Ser por Thr o Lys por Arg).

Como se usa en la presente, los términos “proteína cinasa de distrofia miotónica” y su abreviatura, “DMPK”, se refieren a la proteína serina/treonina cinasa involucrada en la regulación de la estructura y función del músculo esquelético, por ejemplo, en sujetos humanos. Los términos “proteína cinasa de distrofia miotónica” y “DMPK” se usan de manera indistinta en la presente y se refieren no solo a formas de tipo silvestre del gen DMPK, sino también a variantes de proteínas de DMPK de tipo silvestre y ácidos nucleicos que codifican para los mismos. Las secuencias de ácidos nucleicos de dos isoformas de ARNm de DMPK humana se proporcionan en la presente como SEQ ID NO: 1 y 2, que corresponden a los números de acceso de GenBank BC026328.1 y BC062553.1, respectivamente (UTR 3' no incluidas). Estas secuencias de ácido nucleico se proporcionan en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2. Secuencias de ácido nucleico de isoformas de DMPK humana de ejemplo

SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
1	GGCUGGACCAAGGGGUGGGGAGAAGGGGAGGAGGCCUCGGCCGGC CGCAGAGAGAAGUGGCCAGAGAGGCCAGGGGACAGCCAGGGACA GGCAGACAUGCAGCCAGGGCUCCAGGGCCUGGACAGGGGCUGCCA GGCCUGUGACAGGAGGACCCCGAGCCCCGGCCCGGGGAGGGGC CAUGGUGCUGCCUGUCCAACAUGUCAGCCGAGGUGCGGCUGAGGC GGCUCCAGCAGCUGGUGUUGGACCCGGGCUUCCUGGGGCUGGAGC

	CCCUGCUCGACCUUCUCCUGGGCGUCCACCAGGAGCUGGGCGCCU CCGAACUGGCCCAGGACAAGUAC
SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
	GUGGCCGACUUCUUGCAGUGGGCCCCAAAUCCAGGGUUUUCCAAAG UGUGGUUCAAGAACCACCUGCAUCUGAAUCUAGAGCGGAGCCCAUC GUGGUGAGGCUUAAGGAGGUCCGACUGCAGAGGGACGACUUCGAG AUUCUGAAGGUGAUCGGACGCGGGGCGUUCAGCGAGGUAGCGGUA GUGAAGAUGAAGCAGACGGGCCAGGUGUAUGCCAUGAAGAUAUGA ACAAGUGGGACAUGCUGAAGAGGGGGCGAGGUGUCGUGCUUCCGUG AGGAGAGGGACGUGUUGGUGAAUUGGGACCAGCGGUGGAUCACGC AGCUGCACUUCGCCUUCAGGAUGAGAACUACCUGUACCUGGUCAU GGAGUAUUACGUGGGCGGGGACCUGCUGACACUGCUGAGCAAGUU UGGGGAGCGGAUUCGCGCCGAGAUGGCGCGCUUCUACCUGGCGGA GAUUGUCAUGGCCAUAGACUCGGUGCACCGGCUUGGCUACGUGCA CAGGGACAUCAAACCCGACAACAUCUGCUGGACCGCUGUGGCCAC AUCCGCCUGGCCGACUUCGGCUCUUGCCUCAAGCUGCGGGCAGAU GGAACGGUGCGGUCGUGGUGGUGGUGGGCACCCAGACUACCUG UCCCCGAGAUCUGCAGGCUGUGGGCGGUGGGCCUGGGACAGGC AGCUACGGGCCCCGAGUGUGACUGGUGGGCGCUGGGUGUAUUCGCC UAUGAAUUGUUCUAUGGGCAGACGCCCCUUCUACGCGGAUUCACGG CGGAGACCUAUGGCAAGAUCGUCCACUACAAGGAGCACCUCUCUCU GCCGCUGGUGGACGAAGGGGUCCUGAGGAGGCUCGAGACUUCAU UCAGCGGUUGCUGUGUCCCCCGGAGACACGGCUGGGCCGGGGUGG AGCAGGCGACUUCGGACACAUCCCUUCUUCUUGGCCUCGACUGG GAUGGUCUCCGGGACAGCGUGCCCCCUUUAACCCGGAUUUCGAA GGUGCCACCGACACAUGCAACUUCGACUUGGUGGAGGACGGGCUC ACUGCCAUGGUGAGCGGGGGCGGGGAGACACUGUCGGACAUCGCG GAAGGUGCGCCGCUAGGGGUCCACCUGCCUUUUGUGGGCUACUCC UACUCCUGCAUGGCCUCAGGGACAGUGAGGUCCAGGCCCCACAC CCAUGGAACUGGAGGCCGAGCAGCUGCUUGAGCCACACGUGCAAGC GCCAGCCUGGAGCCUCGGUGUCCCCACAGGAUGAAACAGCUGAA GUGGCAGUUCAGCGGCUGUCCUGCGGCAGAGGCUGAGGCCGAG GUGACGCUGCGGGAGCUCCAGGAAGCCCUGGAGGAGGAGGUGCUC ACCCGGCAGAGCCUGAGCCGGGAGAUGGAGGCCAUCCGCACGGAC AACCAGAACUUCGCCAGUCAACUACGCGAGGCAGAGGCUCGGAACC GGGACCUAGAGGCACACGUCCGGCAGUUGCAGGAGCGGAUGGAGU UGCUGCAGGCAGAGGGAGCCACAGCUGUCACGGGGGUCCCCAGUC CCCGGGCCAC
SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
	GGAUCCACCUUCCCAUCUAGAUGGCCCCACGGCCGUGGCUGUGGG CCAGUGCCCGCUGGUGGGGCCAGGCCCAUGCACCGCCGCCACCU GCUGCUCCUGCCAGGGUCCCUAGGCCUGGCCUAUCGGAGGCGCU UUCCUGCUCCUGUUCGCCGUUGUUCUGUCUCGUGCCGCCGCCCU GGGCUGCAUUGGGUUGGUGGCCACGCCGGCCAACUACCCGAGU CUGGCGCCGCCAGGAGCCGCCCGCGCUCCCUGAACCCUAGAACU GUCUUCGACUCAGGGGCCCCGUUGGAAGACUGAGUGCCCGGGGCA CGGCACAGAAGCCGCGCCACCGCCUGCCAGUUCACAACCGCUCCG AGCGUGGGUCUCCGCCAGCACCAGUCCUGUGAUCCGGGCCCGCC CCCUAGCGGCCGGGGAGGGAGGGGCCGGGUCCGCGGCCGGCGAA

	CGGGGCU CGAAGGGUCCUUGUAGCCGGGAAUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGG UGGGGGGAUCACAGACCAUUUCUUUCUUCGGCCAGGCUGAGGCC CUGACGUGGAUGGGCAAACUGCAGGCCUGGGAAGGCAGCAAGCCG GGCCGUCCGUGUCCAUCCUCCACGCACCCCCACCUAUCGUUGGUU CGCAAAGUGCAAAGCUUUCUUGUGCAUGACGCCUGCUCUGGGGA GCGUCUGGCGCGAUCUCUGCCUGCUUACCCGGGAAAUUUGCUUUU GCCAAACCCGCUUUUUCGGGGAUCCCGCGCCCCCUCCUCACUUGC GCUGCUCUCGGAGCCCCAGCCGGCUCCGCCCGCUUCGGCGGUUUG GAUUAUUUAUUGACCUCGUCCUCCGACUCGCUGACAGGCUACAGGAC CCCCAACACCCCAAUCCACGUUUUGGAUGCACUGAGACCCCGACA UCCUCGGUAUUUAUUGUCUGUCCCCACCUAGGACCCCAACCCCG ACCCUCGCGAAUAAAAGGCCCUCCAUCUGCCCCAAAAAAAAAAAAAA A
2	GGGACAGCCAGGGACAGGCAGACAUGCAGCCAGGGCUCCAGGGCC UGGACAGGGGCUGCCAGGCCCUUGUGACAGGAGACCCCGAGCCCC CGGCCCGGGGAGGGGCCAUUGGUGCUGCCUGUCCAACAUGUCAGCC GAGGUGCGGCUGAGGCGGCUCCAGCAGCUGGUGUUGGACCCGGGC UCCUGGGGCUGGAGCCCCUGCUCGACCUUCUCCUGGGCGUCCAC CAGGAGCUGGGCGCCUCCGAACUGGCCCAGGACAAGUACGUGGCC GACUUCUUGCAGUGGGCGGAGCCCAUCGUGGUGAGGCUUAAGGAG GUCCGACUGCAGAGGGACGACUUCGAGAUUCUGAAGGUGAUCGGA CGCGGGGCGUUCAGCGAGGUAGCGGUAGUGAAGAUGAAGCAGACG GGCCAGGUGUAUGCCAUGAAGAUCAUGAACAAGUGGGACAUGCUGA AGAGGGGCGAGGUGUCGUGCUUCCGUGAGGAGAGGGACGUGUUGG UGAAUGGGGACCGGCGGUGGAUCACGCAGCUGC
SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
	ACUUCGCCUUC CAGGAUGAGAACUACCUGUACCUGGUCAUGGAGUA UUACGUGGGCGGGGACCUGCUGACACUGCUGAGCAAGUUUGGGGA GCGGAUUCCGGCCGAGAUUGGCGCGCUUCUACCUGGCGGAGAUUGU CAUGGCCAUAGACUCGGUGCACCGGCUUGGCUACGUGCACAGGGA CAUCAAACCCGACAACAUCCUGCUGGACCGCUGUGGCCACAUCGCG CUGGCCGACUUCGGCUCUUGCCUCAAGCUGCGGGCAGAUGGAACG GUGCGGUCGUCUGGUGGCUGUGGGCACCCAGACUACCUGUCCCCC GAGAUCCUGCAGGCUGUGGGCGGUGGGCCUGGGACAGGCAGCUAC GGGCCCGAGUGUGACUGGUGGGCGCUGGGUGUAUUCGCCUAUGAA AUGUUCUAUGGGCAGACGCCCUUCUACGCGGAUUCACGGCGGAG ACCUAUGGCAAGAUUCGUCCACUACAAGGAGCACCUCUCUCUGCCGC UGGUGGACGAAGGGGUCCCUGAGGAGGCUCGAGACUUCAUUCAGC GGUUGCUGUGUCCCCCGGAGACACGGCUUGGGCCGGGGUGGAGCAG GCGACUUCGGACACAUCCCUUCUUCUUGGCCUCGACUGGGAUG GUCUCCGGGACAGCGUGCCCCCUUACACCGGAUUUCGAAGGUG CCACCGACACAUGCAACUUCGACUUGGUGGAGGACGGGCUCACUGC CAUGGUGAGCGGGGGCGGGGAGACACUGUCGGACAUUCGGGAAGG UGC GCCGUAGGGGUCCACCUGCCUUUUGUGGGCUACUCCUACUC CUGCAUGGCCCU CAGGGACAGUGAGGUCCAGGCCCAACCCCAUG GAACUGGAGGCCGAGCAGCUGCUUGAGCCACACGUGCAAGCGCCCA GCCUGGAGCCCU CGGUGUCCCCACAGGAUGAAACAGCUGAAGUGG CAGUUC CAGCGGCUGUCCCU GCGGCAGAGGCUGAGGCCGAGGUGA CGCUGCGGGAGCUCCAGGAAGCCUGGAGGAGGAGGUGCUCACCC GGCAGAGCCUGAGCCGGGAGAUGGAGGCCAUCCGCACGGACAACC

	AGAACUUCGCCAGUCAACUACGCGAGGCAGAGGCUCGGAACCGGGA CCUAGAGGCACACGUCCGGCAGUUGCAGGAGCGGAUGGAGUUGCU GCAGGCAGAGGGAGCCACAGCUGUCACGGGGGUCCCCAGUCCCCG GGCCACGGAUCCACCUUCCCAUCUAGAUGGCCCCCGGCCGUGGC UGUGGGCCAGUGCCCGCUGGUGGGGCCAGGCCCAUGCACCGCCG CCACCUGCUGCUCCUGCCAGGGUCCCUAGGCCUGGCCUAUCGGA GGCGCUUUCUCCUGCUCCUGUUCGCCGUUGUUCUGUCUGGCCGC CGCCUGGGCUGCAUUGGUUGGUGGGCCACGCCGGCCAAUCAC CGCAGUCUGGCGCCGCCAGGAGCCGCCCGCGCUCUCCUGAACCCU AGAACUGUCUUCGACUCCGGGGCCCCGUUGGAAGACUGAGUGCCC GGGGCACGGCACA
SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico
	GAAGCCGCGCCACCGCCUGCCAGUUCACAACCGCUCCGAGCGUG GGUCUCCGCCCAGCUCCAGUCCUGUGAUCCGGGGCCCGCCCCUAG CGGCCGGGGAGGGAGGGGCCGGGUCCGCGGCCGGCGAACGGGGC UCGAAGGGUCCUUGUAGCCGGGAUUGCUGCUGCUGCUGCGGGG GAUCACAGACCAUUCUUCUUCUUCGGCCAGGCUGAGGCCUGACGU GGAUGGGCAAACUGCAGGCCUGGGAAGGCAGCAAGCCGGGCGCUC CGUGUCCAUCUCCACGCACCCCCACCUAUCGUUGGUUCGAAAG UGCAAAGCUUUCUUGUGCAUGACGCCUGCUCUGGGGAGCGUCUG GCGCGAUCUCUGCCUGCUUACUCGGGAAAUUUGCUUUUGCCAAACC CGCUUUUUCGGGGAUCCCGCGCCCCCUCCUCACUUGCGCUGCUC UCGGAGCCCCAGCCGGCUCCGCCCCGCUUCGGCGGUUUGGAUUAUU AUUGACCUCGUCCUCCGACUCGCUGACAGGCUACAGGACCCCCAAC AACCCCAAUCCACGUUUUGGAUGCACUGAGACCCCGACAUUCCUCG GUAUUUAUUGUCUGUCCCCACCUAGGACCCCGACCCCGACCCUCG CGAAUAAAAGGCCCUCCAUCUGCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAA

Los términos “proteína cinasa de distrofia miotónica” y “DMPK”, tal como se usan en la presente, incluyen, por ejemplo, formas del gen de DMPK humana que tienen una secuencia de ácido nucleico que es al menos 85% idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2) y/o formas del gen de DMPK humana que codifican para una proteína DMPK que tiene una o más (por ejemplo, hasta 25) sustituciones conservadoras de aminoácidos con respecto a una proteína de DMPK tipo silvestre. Los términos “proteína cinasa de distrofia miotónica” y “DMPK”, tal como se usan en la presente, incluyen además transcritos de ARN de DMPK que contienen regiones de repetición de trinucleótidos de CUG expandidos con respecto a la longitud de la región de repetición de trinucleótidos de CUG de un transcrito de ARNm de DMPK tipo silvestre. La región de repetición expandida puede contener, por ejemplo, 50 o más repeticiones de trinucleótidos CUG, tal como de aproximadamente 50 a aproximadamente 4,000 repeticiones de

[illegible]

repeticiones de trinucleótidos, 910 repeticiones de trinucleótidos, 920 repeticiones de trinucleótidos, 930 repeticiones de trinucleótidos, 940 repeticiones de trinucleótidos, 950 repeticiones de trinucleótidos, 960 repeticiones de trinucleótidos, 970 repeticiones de trinucleótidos, 980 repeticiones de trinucleótidos, 990 repeticiones de trinucleótidos, 1,000 repeticiones de trinucleótidos, 1,100 repeticiones de trinucleótidos, 1,200 repeticiones de trinucleótidos, 1,300 repeticiones de trinucleótidos, 1,400 repeticiones de trinucleótidos, 1,500 repeticiones de trinucleótidos, 1,600 repeticiones de trinucleótidos, 1,700 repeticiones de trinucleótidos, 1,800 repeticiones de trinucleótidos, 1,900 repeticiones de trinucleótidos, 2,000 repeticiones de trinucleótidos, 2,100 repeticiones de trinucleótidos, 2,200 repeticiones de trinucleótidos, 2,300 repeticiones de trinucleótidos, 2,400 repeticiones de trinucleótidos, 2,500 repeticiones de trinucleótidos, 2,600 repeticiones de trinucleótidos, 2,700 repeticiones de trinucleótidos, 2,800 repeticiones de trinucleótidos, 2,900 repeticiones de trinucleótidos, 3,000 repeticiones de trinucleótidos, 3,100 repeticiones de trinucleótidos, 3,200 repeticiones de trinucleótidos, 3,300 repeticiones de trinucleótidos, 3,400 repeticiones de trinucleótidos, 3,500 repeticiones de trinucleótidos, 3,600 repeticiones de trinucleótidos, 3,700 repeticiones de trinucleótidos, 3,800 repeticiones de trinucleótidos, 3,900 repeticiones de trinucleótidos, o 4,000 repeticiones de trinucleótidos, entre otros).

Como se usa en la presente, el término "ARN de interferencia" se refiere a un ARN, tal como un ARN de interferencia corto (ARNip), microARN (miARN) o ARN de horquilla corta (ARNhc) que suprime la expresión de un transcripto de ARN diana mediante (i) fijación al transcripto de ARN diana, mediante lo cual se forma un dúplex de ácido nucleico; y (ii) promover la degradación mediada por nucleasa del transcripto de ARN y/o (iii) ralentizar, inhibir o prevenir la traducción del transcripto de ARN, tal como al excluir estéricamente la formación de un complejo de transcripto de ARN-ribosoma funcional o atenuar de otro modo la formación de un producto de proteína funcional a partir del transcripto de ARN diana. Los ARN de interferencia tal como se describen en la presente se pueden proporcionar a un paciente, tal como un paciente humano que tiene distrofia miotónica, en forma de, por ejemplo, un oligonucleótido de cadena simple o doble, o en forma de un vector (por ejemplo, un vector viral, tal como un vector viral adenoasociado descrito en la presente) que contiene un transgén que codifica para el ARN de interferencia.

Se describen ejemplos de plataformas de ARN de interferencia, por ejemplo, en Lam et al., *Molecular Therapy- Nucleic Acids* 4:e252 (2015); Rao et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 61:746-769 (2009); y Borel et al., *Molecular Therapy* 22:692-701 (2014), cuyas descripciones se incorporan a la presente por referencia en su totalidad.

Como se usa en la presente, la “longitud” de un ácido nucleico se refiere al tamaño lineal del ácido nucleico tal como se evalúa mediante la medición de la cantidad de nucleótidos del extremo 5’ al extremo 3’ del ácido nucleico.

Las técnicas de biología molecular de ejemplo que se pueden usar para determinar la longitud de un ácido nucleico de interés se conocen en la técnica.

Como se usa en la presente, el término “distrofia miotónica” se refiere a un trastorno de emaciación muscular heredado caracterizado por la retención nuclear de transcritos de ARN que codifican para DMPK y que contienen una región de repetición de trinucleótidos CUG expandida en la región no traducida (UTR) 3’, tal como una región de repetición de trinucleótidos CUG expandida que tiene de 50 a 4,000 repeticiones CUG. Los transcritos de ARN de RMPK de tipo silvestre, en comparación, normalmente contienen de 5 a 37 repeticiones CUG en la UTR 3’. En pacientes con distrofia miotónica, la región de repetición CUG expandida interactúa con factores de empalme de unión a ARN, tal como proteína tipo ceguera muscular. Esta interacción hace que el transcrito mutante se retenga en focos nucleares y conduce al secuestro de proteínas de unión a ARN lejos de otros sustratos pre-ARNm, lo que, a su vez, promueve la empalmopatía de proteínas involucradas en la modulación de la estructura y función muscular. En la distrofia miotónica tipo I (DM1), el músculo esquelético es a menudo el tejido más gravemente afectado, pero la enfermedad también imparte efectos tóxicos sobre el músculo cardíaco y liso, el cristalino ocular y el cerebro. Los músculos craneal, distal y diafragma se ven afectados preferentemente. La destreza manual se ve comprometida temprano, lo que provoca varias décadas de discapacidad grave. La mediana de edad a la muerte de los pacientes con distrofia miotónica es de 55 años, que generalmente es provocada por insuficiencia respiratoria (de Die-Smulders C E, et al., Brain 121:1557-1563 (1998)).

Como se usa en la presente, el término “unida operativamente” se refiere a una primera molécula (por ejemplo, un primer ácido nucleico) unida a una segunda molécula (por ejemplo, un segundo ácido nucleico), en donde las moléculas están dispuestas de manera que la primera molécula afecta la función de la segunda molécula. Las dos moléculas pueden o no ser parte de una sola molécula contigua y pueden o no estar adyacentes entre sí. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una molécula de polinucleótido transcribible si el promotor modula la transcripción de la molécula de polinucleótido transcribible de interés en una célula. De manera adicional, dos porciones de un elemento regulador de transcripción están unidas operativamente entre sí si se unen de modo que la funcionalidad de activación de transcripción de una parte no se vea afectada negativamente por la presencia de la otra parte. Dos elementos reguladores de transcripción pueden estar unidos operativamente entre

sí mediante un ácido nucleico enlazador o ligador (por ejemplo, un ácido nucleico no codificante intermedio) o pueden estar unidos operativamente entre sí sin nucleótidos intermedios presentes.

Como se usa en la presente, se considera que un segmento de una molécula de ácido nucleico “se superpone con” otro segmento de la misma molécula de ácido nucleico si los dos segmentos comparten uno o más nucleótidos constituyentes. Por ejemplo, se considera que dos segmentos de la misma molécula de ácido nucleico “se superponen” entre sí si los dos segmentos comparten 1,2,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10,15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100 o más nucleótidos constituyentes. Los dos segmentos no se consideran “superpuestos” entre sí si los dos segmentos tienen cero nucleótidos constituyentes en común. “Porcentaje (%) de complementariedad de secuencia” con respecto a una secuencia de polinucleótidos de referencia se define como el porcentaje de ácidos nucleicos en una secuencia candidata que son complementarios con los ácidos nucleicos en la secuencia de polinucleótidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir separaciones, si es necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de complementariedad de secuencia. Un nucleótido dado se considera “complementario” a un nucleótido de referencia como se describe en la presente si los dos nucleótidos forman pares de bases canónicas Watson-Crick. Para evitar dudas, los pares de bases de Watson-Crick en el contexto de la presente descripción incluyen pares de bases de adenina-timina, adenina-uracilo y citosina-guanina. Un par de bases Watson-Crick adecuado se denomina en este contexto “coincidencia”, mientras que cada nucleótido no emparejado y cada nucleótido emparejado incorrectamente se denomina “desajuste”. La alineación con fines de determinar el porcentaje de complementariedad de secuencia de ácido nucleico se puede lograr de varias maneras que están dentro de las capacidades de un experto en la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, o Megalign. Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la complementariedad máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. A modo de ilustración, el porcentaje de complementariedad de secuencia de una secuencia de ácido nucleico dada, A, con una secuencia de ácido nucleico dada, B, (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de ácido nucleico dada, A que tiene un cierto porcentaje de complementariedad con una secuencia de ácido nucleico dada, B) se calcula de la siguiente manera: 100 multiplicado por (la fracción X/Y) donde X es la cantidad de pares de bases complementarias en una alineación (por ejemplo, tal como se ejecuta mediante software informático, tal como BLAST) en la alineación de A y B de ese programa, y donde Y es la cantidad total de ácidos nucleicos en B. Se apreciará que cuando la longitud

de la secuencia de ácido nucleico A no es igual a la longitud de la secuencia de ácido nucleico B, el porcentaje de complementariedad de secuencia de A a B no será igual al porcentaje de complementariedad de secuencia de B a A. Como se usa en la presente, una secuencia de ácido nucleico de consulta se considera “completamente complementaria” a una secuencia de ácido nucleico de referencia si la secuencia de ácido nucleico de consulta tiene 100% de complementariedad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de referencia.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia” con respecto a un polinucleótido o secuencia de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de ácidos nucleicos o aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los ácidos nucleicos o aminoácidos en la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir separaciones, si es necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia. La alineación con fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico o aminoácidos se puede lograr de varias maneras que están dentro de las capacidades de un experto en la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, o Megalign. Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Por ejemplo, se pueden generar valores de identidad de secuencia porcentuales usando el programa informático de comparación de secuencias BLAST. A modo de ilustración, el porcentaje de identidad de secuencia de una secuencia de ácido nucleico o aminoácido dada, A, con, con, o contra una secuencia de ácido nucleico o aminoácido dada, B, (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de ácido nucleico o aminoácido dada, A que tiene un cierto porcentaje de identidad de secuencia con, con, o contra una secuencia de ácido nucleico o aminoácido dada, B) se calcula de la siguiente manera:

100 multiplicado por (la fracción X/Y) donde X es la cantidad de nucleótidos o aminoácidos marcados como coincidencias idénticas por un programa de alineación de secuencia (por ejemplo, BLAST) en la alineación de A y B de ese programa, y donde Y es el número total de ácidos nucleicos en B. Se apreciará que cuando la longitud de ácido nucleico o secuencia de aminoácido A no es igual a la longitud de ácido nucleico o secuencia de aminoácido B, el porcentaje de identidad de secuencia de A a B no será igual al porcentaje de identidad de secuencia de B a A.

Como se usa en la presente, el término “composición farmacéutica” se refiere a una mezcla que contiene un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico o vector descrito en la presente, opcionalmente en combinación con uno o más excipientes, diluyentes y/o

portadores farmacéuticamente aceptables, que se administrarán a un sujeto, tal como un mamífero, por ejemplo, un humano, con el fin de prevenir, tratar o controlar una enfermedad o condición particular que afecte o pueda afectar al sujeto.

Como se usa en la presente, el término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación, que son adecuados para el contacto con los tejidos de un sujeto, tal como un mamífero (por ejemplo, un humano) sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica y otras complicaciones problemáticas proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable.

Como se usa en la presente, el término “región de repetición” se refiere a segmentos dentro de un gen de interés o un transcrito de ARN de este que contiene repeticiones de ácido nucleico, tal como la secuencia de poli CTG en la 3' UTR del gen DMPK humano (o la secuencia de poli CUG en la 3' UTR del transcrito de ARN del mismo). Una región de repetición se considera una “región de repetición expandida”, una “expansión de repetición” o similar, si la cantidad de repeticiones de nucleótidos en la región de repetición excede la cantidad de repeticiones que se encuentran normalmente en la región de repetición de una forma salvaje del gen o transcrito de ARN del mismo. Por ejemplo, las UTR 3' de genes DMPK humanos de tipo silvestre normalmente contienen de 5 a 37 repeticiones CTG o CUG. Por lo tanto, “regiones de repetición expandidas” y “expansiones de repetición” en el contexto del gen DMPK o un transcrito de ARN de este se refieren a regiones de repetición que contienen más de 37 repeticiones CTG o CUG, tal como de aproximadamente 50 a aproximadamente 4,000 repeticiones de trinucleótidos CUG (por ejemplo, aproximadamente 50 repeticiones de trinucleótidos CUG, aproximadamente 60 repeticiones de trinucleótidos CUG, aproximadamente 70 repeticiones de trinucleótidos, 80 repeticiones de trinucleótidos, 90 repeticiones de trinucleótidos, 100 repeticiones de trinucleótidos, 110 repeticiones de trinucleótidos, 120 repeticiones de trinucleótidos, 130 repeticiones de trinucleótidos, 140 repeticiones de trinucleótidos, 150 repeticiones de trinucleótidos, 160 repeticiones de trinucleótidos, 170 repeticiones de trinucleótidos, 180 repeticiones de trinucleótidos, 190 repeticiones de trinucleótidos, 200 repeticiones de trinucleótidos, 210 repeticiones de trinucleótidos, 220 repeticiones de trinucleótidos, 230 repeticiones de trinucleótidos, 240 repeticiones de trinucleótidos, 250 repeticiones de trinucleótidos, 260 repeticiones de trinucleótidos, 270 repeticiones de trinucleótidos, 280 repeticiones de trinucleótidos, 290 repeticiones de trinucleótidos, 300 repeticiones de trinucleótidos, 310 repeticiones de trinucleótidos, 320 repeticiones de trinucleótidos, 330 repeticiones de trinucleótidos, 340 repeticiones de trinucleótidos, 350 repeticiones de trinucleótidos, 360 repeticiones de trinucleótidos, 370 repeticiones de trinucleótidos, 380 repeticiones de trinucleótidos, 390

[illegible]

trinucleótidos, 3,700 repeticiones de trinucleótidos, 3,800 repeticiones de trinucleótidos 3,900 repeticiones de trinucleótidos, or 4,000 repeticiones de trinucleótidos, u otros).

Como se usa en la presente, el término “dominio de ARN” se refiere a una patología que se induce por la expresión y retención nuclear de transcritos de ARN que contienen regiones de repetición expandidas con respecto a la cantidad de regiones de repetición, si las hay, contenidas por una forma salvaje del transcrito de ARN de interés. Los efectos tóxicos de la dominancia del ARN son una manifestación, por ejemplo, de la interacción de unión entre las regiones repetidas expandidas de los transcritos de ARN mutantes patológicos con proteínas del factor de empalme, que promueve el secuestro de factores de empalme lejos de los transcritos de pre-ARNm, generando así empalmopatía entre dichos sustratos. Los trastornos de ejemplo asociados con la dominancia del ARN son distrofia miotónica y esclerosis lateral amiotrófica, como se describe en la presente, entre otros.

Como se usa en la presente, el término “muestra” se refiere a una muestra (por ejemplo, sangre, componente sanguíneo (por ejemplo, suero o plasma), orina, saliva, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, tejido (por ejemplo, placentario o dérmico), líquido pancreático, muestra de vellosidad coriónica o células) aislada de un sujeto. El sujeto puede ser, por ejemplo, un paciente que padece una enfermedad descrita en la presente, tal como un trastorno de emaciación muscular hereditario (por ejemplo, distrofia muscular, tal como distrofia miotónica (por ejemplo, distrofia miotónica tipo I).

Como se usa en la presente, las frases “se une específicamente” y “se une” se refieren a una reacción de unión que es determinante de la presencia de una molécula particular, tal como un transcrito de ARN, en una población heterogénea de iones, sales, moléculas pequeñas y/o proteínas que se reconoce, por ejemplo, por un ligando o receptor, tal como una proteína del factor de empalme de unión a ARN, con particularidad. Un ligando (por ejemplo, una proteína de unión a ARN descrita en la presente) que se une específicamente a una especie (por ejemplo, un transcrito de ARN) se puede unir a la especie, por ejemplo, con una Kd de menos de 1 mM. Por ejemplo, un ligando que se une específicamente a una especie se puede unir a la especie con una Kd de hasta 100 μ M (por ejemplo, entre 1 pM y 100 μ M). Un ligando que no exhibe unión específica a otra molécula puede exhibir una Kd mayor que 1 mM (por ejemplo, 1 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM o mayor) para esa molécula o ión particular. Una variedad de formatos de ensayo se puede usar para determinar la afinidad de un ligando para una proteína específica. Por ejemplo, los ensayos ELISA de fase sólida se utilizan de forma rutinaria para identificar ligandos que se unen específicamente a una proteína diana. Ver, por ejemplo, Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Nueva York (1988) y Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring

Harbor Press, Nueva York (1999), para una descripción de los formatos y condiciones de ensayo que se pueden utilizar para determinar la unión específica a proteínas.

Como se usa en la presente, el término “empalmopatía” se refiere a un cambio en el patrón de empalme de un transcripto de ARNm que conduce a la expresión de uno o más productos de empalme alternativos con respecto a una forma tipo silvestre del transcripto de ARNm de interés. La empalmopatía puede conducir a una pérdida tóxica de la función si, por ejemplo, el transcripto de ARNm se empalma de tal manera que uno o más exones necesarios para la actividad de la proteína codificada ya no están presentes en el transcripto de ARNm tras la traducción. De manera adicional o alternativa, se puede producir una pérdida tóxica de la función debido a la inclusión anormal de uno o más intrones, por ejemplo, de una manera que excluye el plegado adecuado de la proteína codificada.

Como se utiliza en la presente, los términos “sujeto” y “paciente” se refieren a un organismo que recibe tratamiento para una enfermedad o condición particular como se describe en la presente (tal como un trastorno de atrofia muscular hereditaria, por ejemplo, distrofia miotónica). Los ejemplos de sujetos y pacientes incluyen mamíferos, tal como seres humanos, que reciben tratamiento para una enfermedad o condición descrita en la presente.

Como se utiliza en la presente, el término “elemento regulador de transcripción” se refiere a un ácido nucleico que controla, al menos en parte, la transcripción de un gen de interés. Los elementos reguladores de transcripción pueden incluir promotores, potenciadores, y otros ácidos nucleicos (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan o ayudan a controlar la transcripción génica. Los ejemplos de elementos reguladores de transcripción se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990).

Como se utiliza en la presente, los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren al tratamiento terapéutico, en el que el objeto es impedir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como la progresión de un trastorno de atrofia muscular hereditaria, por ejemplo, distrofia miotónica, y en particular, distrofia miotónica tipo I. En el contexto del tratamiento de distrofia miotónica, los resultados clínicos beneficiosos o deseados que son indicativos de tratamiento exitoso incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, disminución de extensión de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retardo o ralentización de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. El tratamiento de un paciente que tiene distrofia miotónica (por ejemplo, distrofia miotónica tipo I se puede manifestar en uno o más cambios detectables, tal como una disminución en la expresión de transcripciones de ARN de DMPK que contienen

regiones de repetición de trinucleótidos CUG expandida (por ejemplo, una disminución en la expresión de transcripciones de DMPK de ARN que contienen regiones de repetición de trinucleótidos CUG expandida de 1% o más, tal como una disminución de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%, con relación a la expresión de transcripciones de ARN de DMPK que contienen regiones de repetición de trinucleótidos CUG expandida por el paciente antes de la administración de un agente terapéutico, tal como un vector o ácido nucleico descrito en la presente. Los métodos que se pueden utilizar para evaluar los niveles de expresión de ARN se conocen en la técnica e incluyen ensayos de RNA-seq y técnicas de reacción en cadena de polimerasa descritas en la presente. Las indicaciones clínicas adicionales de tratamiento exitoso de un paciente con CPVT incluyen el alivio de la empalmopatía, por ejemplo, de un transcripto de ARN que se empalma de una manera que depende de proteína similar a ciego muscular. Por ejemplo, las observaciones que indican un tratamiento exitoso de un paciente que tiene distrofia miotónica incluyen un hallazgo de que el paciente exhibe un incremento en el empalme correctivo de uno o más sustratos de transcripto de ARN de proteína tipo ciego muscular después de la administración de un agente terapéutico, tal como un agente terapéutico descrito en la presente. Por ejemplo, los indicadores de que el tratamiento exitoso de distrofia miotónica incluyen una determinación de que el paciente exhibe un incremento en la expresión de ARNm de ATPasa 1 de calcio de retículo sarcoplásmico/endoplásmico (SERCA1) que contiene el exón 22, tal como un aumento de aproximadamente 1.1 veces a aproximadamente 10 veces, o más (por ejemplo, un aumento en la expresión de ARNm de SERCA1 que contiene el exón 22 en aproximadamente 1.1 veces, 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 1.6 veces, 1.7 veces, 1.8 veces, 1.9 veces, 2 veces, 2.1 veces, 2.2 veces, 2.3 veces, 2.4 veces, 2.5 veces, 2.6 veces, 2.7 veces, 2.8 veces, 2.9 veces, 3 veces, 3.1 veces, 3.2 veces, 3.3 veces, 3.4 veces, 3.5 veces, 3.6 veces, 3.7 veces, 3.8 veces, 3.9 veces, 4 veces, 4.1 veces, 4.2 veces, 4.3 veces, 4.4 veces, 4.5 veces, 4.6 veces, 4.7 veces, 4.8 veces, 4.9 veces, 5 veces, 5.1 veces, 5.2 veces, 5.3 veces, 5.4 veces, 5.5 veces, 5.6 veces, 5.7 veces, 5.8 veces, 5.9 veces, 6 veces, 6.1 veces, 6.2 veces, 6.3 veces, 6.4 veces, 6.5 veces, 6.6 veces, 6.7 veces, 6.8 veces, 6.9 veces, 7 veces, 7.1 veces, 7.2 veces, 7.3 veces, 7.4 veces, 7.5 veces, 7.6 veces, 7.7 veces, 7.8 veces, 7.9 veces, 8 veces, 8.1 veces, 8.2 veces, 8.3 veces, 8.4 veces, 8.5 veces, 8.6 veces, 8.7 veces, 8.8 veces, 8.9 veces, 9 veces, 9.1 veces, 9.2 veces, 9.3 veces, 9.4 veces, 9.5 veces, 9.6 veces, 9.7 veces, 9.8 veces, 9.9 veces, 10 veces, o más), tal como se evaluó, por ejemplo, utilizando un ensayo de detección de ARN o proteínas descrito en la presente. El tratamiento de distrofia miotónica también puede manifestarse como una

disminución en la expresión de ARNm de canal 1 activado por voltaje de cloruro (CLCN1) que contiene exón 7a, tal como una disminución de aproximadamente 1% a aproximadamente 100% (por ejemplo, una disminución en la expresión de ARNm de CLCN1 que contiene exón 7a por aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%), como se evaluó, por ejemplo, usando un ensayo de detección de ARN o proteína, descrito en la presente. Adicionalmente, el tratamiento exitoso se puede indicar por una determinación de que el paciente exhibe una disminución en la expresión de proteína de mota asociada con ZO-2 (ZASP) que contiene el exón 11, tal como una disminución de aproximadamente 1% a aproximadamente 100% (por ejemplo, una disminución en la expresión de ARNm de ZASP que contiene el exón 11 por aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%), tal como se evaluó, por ejemplo, usando un ensayo de detección de ARN o proteína descrito en la presente. El tratamiento exitoso de la distrofia miotónica también se puede señalar por un hallazgo de que, después de la terapia, el paciente exhibe un aumento en el empalme correctivo de transcritos de ARN que codifican para el receptor de insulina, receptor de rianodina 1 (RYR1), troponina de músculo cardíaco y/o troponina de músculo esquelético, tal como un aumento de aproximadamente 1.1 veces a aproximadamente 10 veces, o más (por ejemplo, un aumento en la expresión de transcritos de ARN empalmados correctamente que codifican para el receptor de insulina, RYR1, troponina de músculo cardíaco y/o troponina de músculo esquelético en aproximadamente 1.1 veces, 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 1.6 veces, 1.7 veces, 1.8 veces, 1.9 veces, 2 veces, 2.1 veces, 2.2 veces, 2.3 veces, 2.4 veces, 2.5 veces, 2.6 veces, 2.7 veces, 2.8 veces, 2.9 veces, 3 veces, 3.1 veces, 3.2 veces, 3.3 veces, 3.4 veces, 3.5 veces, 3.6 veces, 3.7 veces, 3.8 veces, 3.9 veces, 4 veces, 4.1 veces, 4.2 veces, 4.3 veces, 4.4 veces, 4.5 veces, 4.6 veces, 4.7 veces, 4.8 veces, 4.9 veces, 5 veces, 5.1 veces, 5.2 veces, 5.3 veces, 5.4 veces, 5.5 veces,

5.6 veces, 5.7 veces, 5.8 veces, 5.9 veces, 6 veces, 6.1 veces, 6.2 veces,, 6.3 veces, 6.4 veces, 6.5 veces, 6.6 veces, 6.7 veces, 6.8 veces, 6.9 veces, 7 veces, 7.1 veces, 7.2 veces, 7.3 veces, 7.4 veces, 7.5 veces, 7.6 veces, 7.7 veces, 7.8 veces, 7.9 veces, 8 veces, 8.1 veces, 8.2 veces, 8.3 veces, 8.4 veces, 8.5 veces, 8.6 veces, 8.7 veces, 8.8 veces, 8.9 veces, 9 veces, 9.1 veces, 9.2 veces, 9.3 veces, 9.4 veces, 9.5 veces, 9.6 veces, 9.7 veces, 9.8 veces, 9.9 veces, 10 veces o más), como se evaluó, por ejemplo, utilizando un ensayo de detección de ARN o proteínas descrito en la presente. Las indicaciones clínicas adicionales de tratamiento exitoso de distrofia miotónica incluyen mejoras en la función muscular, tal como en los músculos craneal, de extremidad distal, y diafragma.

Como se utiliza en la presente, el término "vector" se refiere a un ácido nucleico, por ejemplo, ADN o ARN, que puede funcionar como un vehículo para la administración de un gen de interés en una célula (por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula humana), tejido, órgano, u organismo, tal como un paciente que se somete a tratamiento para una enfermedad o condición descrita en la presente, con propósitos de expresar un transgén codificado. Los vectores de ejemplo útiles en conjunto con las composiciones y métodos descritos en la presente son plásmidos, vectores de ADN, vectores de ARN, viriones, u otro replicón adecuado (por ejemplo, vector viral). Se ha desarrollado una variedad de vectores para la administración de polinucleótidos que codifican para proteínas exógenas en una célula procariota o eucariota. Los ejemplos de estos vectores de expresión se describen en, por ejemplo, WO 1994/11026, la descripción de la cual se incorpora en la presente como referencia. Los vectores de expresión descritos en la presente contienen una secuencia de polinucleótidos así como, por ejemplo, elementos de secuencia adicionales utilizados para la expresión de proteínas y/o la integración de estas secuencias de polinucleótidos en el genoma de una célula de mamífero. Ciertos vectores que se pueden utilizar para la expresión de transgenes descritos en la presente incluyen plásmidos que contienen secuencias reguladoras, tal como regiones de promotor y potenciador, que dirigen la transcripción génica. Otros vectores útiles para la expresión de transgenes contienen secuencias de polinucleótidos que potencian la tasa de traducción de estos genes o mejoran la estabilidad o exportación nuclear del ARNm que resulta de la transcripción génica. Estos elementos de secuencia incluyen, por ejemplo, regiones no traducidas de 5' y 3', un sitio interno de entrada a ribosoma (IRES) y un sitio de señal de poliadenilación a fin de dirigir la transcripción eficiente del gen portado en el vector de expresión. Los vectores de expresión descritos en la presente también pueden contener un polinucleótido que codifica para un marcador para la selección de células que contienen este vector. Los ejemplos de un marcador adecuado incluyen genes que

codifican para la resistencia a antibióticos, tal como ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, o nourseotricina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 es un diagrama que muestra la estructura del ARN de proteína cinasa de distrofia miotónica humana (DMPK), que incluye la configuración de exones (representados por cajas rectangulares sombreadas) y el sitio de la región de repetición de trinucleótidos CUG. Los valores numéricos de 600 a 12,600 a lo largo de la parte inferior de la figura indican la posición de nucleótidos a lo largo de la longitud del transcripto de ARN de DMPK. El diagrama muestra las regiones dentro del transcripto de ARN de DMPK a las que varias construcciones de ARN de interferencia de ejemplo descritas en la presente se fijan por medio de complementariedad de secuencia.

Las figuras 2A - 2C son diagramas que muestran los esquemas de tres generaciones de vectores de rAAV que codifican para moléculas de ARN de interferencia (vectores de rAAV-ARNi) que se dirigen a varios genes de interés, tal como aquellos asociados con la dominancia de ARN. El plásmido de rAAV pARAP4 incluye el gen indicador de fosfatasa alcalina humana (Hu Aik Phos), expresado a partir del promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV), y la secuencia de poliadenilación de SV40, pA. Las repeticiones terminales invertidas (ITR) se originan de rAAV2, y los genomas se empaquetan en cápsides de rAAV6. La modificación más nueva de vector remueve la secuencia de promotor de RSV para impedir la expresión de Hu Aik Phos que limitó la eficacia de rAAV-ARNi a dosis más altas debido a la toxicidad de células musculares.

La figura 3A es un diagrama que muestra rutas de administración de ejemplo de vectores de rAAV-ARNi en modelos murinos de trastornos de dominancia de ARN, tal como distrofia miotónica.

Las figuras 3B y 3C son diagramas que comparan diversas características de distrofia miotónica tipo I (DM1) y el modelo de HSA^{LR} murino de esta enfermedad. Los ratones de HSA^{LR} muestran características de distrofia miotónica que se parecen a DM en seres humanos. El transgén de HSA^{LR} se deriva de la inserción de una repetición de (CTG)₂₅₀ en la UTR 3' del gen de actina esquelética humana (HSA). Cuando el transgén se expresa en el músculo esquelético de ratón, las descargas miotónicas son evidentes, se presentan alteraciones de empalme en una variedad de ARNm, y focos nucleares que contienen el ARNm transgénico expandido y los factores de empalme están presentes.

La figura 4 es un diagrama que muestra las características de ratones de HSA^{LR} transducidos con DM10 de miR de HSA de rAAV6, como se describe en el ejemplo 1, más

adelante. La tinción con fosfatasa alcalina placentaria humana (AP) indica la presencia del genoma viral con expresión génica indicadora activa. Tinción de hematoxilina–eosina de criosecciones de ratones tratados. Punto de tiempo, 8 semanas después de la inyección, ratones de HSA^{LR} de 4 semanas de edad.

Las figuras 5A y 5B son gráficas que cuantifican el ARNm de HSA y la expresión del miRDMI 0 de HSA en siete ratones de HSA^{LR} individuales transducidos como se describe en el ejemplo 1, más adelante. La expresión de ARNm mostrada se evaluó por qPCR a las 8 semanas después de la inyección de rAAV.

Las figuras 6A - 6E son diagramas que demuestran que la inyección sistémica de DM10 de miR de HSA de rAAV6 mejora el empalme de Atp2a (SERCA1) y CLCN1 en el músculo tibialis anterior (TA), como se describe en el ejemplo 1, más adelante. En contraste, una horquilla de ARNi diferente, miR DM4, no es tan efectiva para revertir estos defectos de empalme.

Las figuras 7A - 7C son diagramas que muestran la estructura y la actividad de rAAV-miR DM10 y -miR DM4 re-modificados evaluados in vivo. Inyección intramuscular de vectores sin el promotor de RSV para impedir la expresión de Hu Aik Phos para evaluar la eficacia del silenciamiento génico en comparación a los vectores que expresan Aik Phos probados anteriormente. La figura 7A muestra un diagrama esquemático del genoma de rAAV que carece de la secuencia de promotor de RSV como el 'nuevo DM10' y 'nuevo DM4' etiquetados en los geles en la figura 7B. La figura 7B muestra el análisis de patrones de empalme para Atp2a1/Serca1 después de la inyección IM de 'nuevo DM10' y 'nuevo DM4' en el músculo TA en comparación a Aik Phos que expresa 'antiguo DM10.' L= dosis baja de 5×10^9 genomas de vector; H= dosis alta de 5×10^{10} genomas de vector. Ningún promotor de RSV; +, RSV presente en el genoma de vector. La dosis alta se eligió debido a que provocó cierta regeneración muscular como se marca por la presencia de núcleos centrales (CN) con inyección IM de vectores que expresan Hu Aik Phos. Sin embargo, no se observó ninguna evidencia de recambio muscular a esta dosis alta de rAAV DM10 que carece de RSV, nuevo DM10 y nuevo DM4.

La figura 8A es un diagrama que muestra cómo se transfectaron plásmidos purificados que expresan los miARN que se dirigen a DMPK en células HEK293 y se aisló ARN y se sometió a RT-qPCR para evaluar el acoplamiento de transcritos de DMPK por el complejo RISC y la escisión de Dicer.

La figura 8B es una gráfica que muestra la evaluación de la actividad de silenciamiento génico de miARN de U6 DMPK. Los casetes de expresión de miARN terapéutico candidatos a y b mostraron una reducción del ARNm de DMPK endógeno 48 horas después de la

transfección de células HEK293 con 1.5 µg de ADN de plásmido en comparación a un plásmido sin casete de expresión de miARN. Se evaluaron ocho réplicas biológicas por plásmido y control. A lo largo del eje x, “a” representa un miARN que contiene una hebra pasajera que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 42 y una hebra guía que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 79; “b” representa un miARN que contiene una hebra pasajera que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 44 y una hebra guía que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 81; “c” representa un miARN que contiene una hebra pasajera que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 46 y una hebra guía que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 83; “d” representa un miARN que contiene una hebra pasajera que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 47 y una hebra guía que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 84; y “ninguno” representa células no tratadas con un miARN anti-DMPK.

La figura 9 es una gráfica que muestra la capacidad de varias moléculas de siARN descritas en la presente para reducir la expresión de DMPK en células HEK293, como se describe en el ejemplo 4, más adelante. Los valores a lo largo del eje y representan la expresión de DMPK normalizada, y el eje x muestra las moléculas de ARNip anti-DMPK probadas. La primera entrada en el eje x corresponde al tratamiento de células HEK293 con vehículo de transfección solamente, y la segunda entrada en el eje x representa el tratamiento con un ARNip que tiene una secuencia de ácido nucleico desordenada como un control negativo. Las moléculas de ARNip que tienen un número de identificador de secuencia específica se describen en la presente, por ejemplo, en la tabla 4, a continuación. Las moléculas de ARNip etiquetadas “Anti-DMPK” seguidas por un identificador alfanumérico están disponibles comercialmente de Thermo Fisher Scientific.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las composiciones y métodos descritos en la presente son útiles para reducir la presentación de empalmopatía y para tratar trastornos asociados con la dominancia de ácido ribonucleico (ARN), tal como distrofia miotónica y esclerosis lateral amiotrófica, entre otros. Las composiciones descritas en la presente incluyen ácidos nucleicos que contienen construcciones de ARN de interferencia que suprimen la expresión de transcritos de ARN que contienen regiones de repetición aberrantemente expandidas. Esta actividad proporciona un beneficio fisiológico importante, puesto que varios transcritos de ARN que albergan estas expansiones repetidas exhiben una avidéz elevada para los factores de empalme de ARN. Esta avidéz se manifiesta en el secuestro de factores de empalme de ARN lejos de otros sustratos pre-ARNm, interrumpiendo de esta manera el empalme apropiado de estos

transcriptos. Sin limitarse por el mecanismo, las composiciones descritas en la presente pueden mejorar esta patología al disminuir la expresión de transcriptos de ARN que albergan repeticiones de nucleótidos expandidos, liberando de esta manera factores de empalme secuestrados tal que puedan regular apropiadamente el empalme de varios otros transcriptos de pre-ARNm. Por ejemplo, las composiciones y métodos descritos en la presente se pueden utilizar para tratar trastornos, tal como distrofia miotónica, asociados con la expresión de transcriptos de ARN de proteína cinasa de distrofia miotónica (DMPK) que contienen una región de repetición de trinucleótido CUG expandida. De manera similar, las composiciones y métodos descritos en la presente se pueden utilizar para tratar la esclerosis lateral amiotrófica, caracterizada por la expresión elevada de transcriptos de ARN de C90RF72 que contienen repeticiones de hexanucleótidos de GGGGCC (SEQ ID NO: 162).

Las construcciones de ARN de interferencia descritas en la presente pueden estar en cualquiera de una variedad de formas, tal como ARN de interferencia corto (ARNip), ARN de horquilla corta (ARNhc), o micro ARN (miARN). Los ARN de interferencia descritos en la presente se pueden codificar adicionalmente por un vector, tal como un vector viral. Por ejemplo, en la presente se describen vectores virales adenoasociados (AAV), tal como vectores de AAV pseudotipados (por ejemplo, vectores de AAV2/8 y AAV2/9) que contienen transgenes que codifican para construcciones de ARN de interferencia que atenúan la expresión de transcriptos de ARN que albergan repeticiones de nucleótidos expandidas.

Las composiciones y métodos descritos en la presente proporcionan, entre otros beneficios, la característica ventajosa de ser capaz de suprimir selectivamente la expresión de transcriptos de ARN patológicos entre otros ARN que contienen regiones de repetición de nucleótidos expandidos. Esta propiedad es en particular beneficiosa en vista de la prevalencia de repeticiones de nucleótidos en genomas de mamíferos, tal como en los genomas de pacientes humanos. Al utilizar las composiciones y métodos descritos en la presente, la expresión de transcriptos de ARN que contienen expansiones de repetición de nucleótidos patológicos se puede disminuir, en tanto que se conserva la expresión de transcriptos de ARN saludables importantes y sus productos de proteína codificados.

Esta característica ventajosa es con base, en parte, en el descubrimiento sorprendente de que se pueden utilizar construcciones de ARN de interferencia que recogen dianas de ARN expandidas repetidamente en sitios remotos de la región de repetición expandida para suprimir la expresión de estos transcriptos de ARN y liberar proteínas de factor de empalme que de otra manera se secuestrarían por estas moléculas. Por lo tanto, las composiciones y métodos descritos en la presente pueden atenuar la expresión y retención nuclear de

transcriptos de ARN patológicos sin la necesidad de contener motivos de repetición de nucleótidos complementarios.

Las secciones que siguen proporcionan una descripción de construcciones de ARN de interferencia de ejemplo que se pueden utilizar en conjunto con las composiciones y métodos descritos en la presente, así como una descripción de vectores que codifican para estas construcciones y procedimientos que se pueden utilizar para tratar trastornos asociados con empalmopatía, tal como distrofia miotónica y esclerosis lateral amiotrófica.

Métodos para tratar la dominancia de ARN y corregir la empalmeopatía

Utilizando las composiciones y métodos descritos en la presente, a un paciente que experimenta una empalmopatía y/o tiene una enfermedad asociada con la dominancia de ARN, tal como distrofia miotónica, entre otros, se le puede administrar un ácido nucleico que contiene una construcción de ARN de interferencia, o un vector que codifica para la misma, a fin de reducir la expresión de transcriptos de ARN que contienen regiones de repetición expandidas. Sin limitarse por el mecanismo, esta actividad proporciona el efecto beneficioso de liberar proteínas de unión a ARN que se unen con alta avidéz a las regiones de expansión de repetición de transcriptos de ARN patológicos. La liberación de estas proteínas de unión a ARN es importante, puesto que las proteínas secuestradas por la unión a transcriptos de ARN expandidos repetidamente incluyen factores de empalme que normalmente estarían disponibles para modular el empalme adecuado de varios transcriptos de pre-ARNm. En pacientes que tienen trastornos de dominancia de ARN, tal como distrofia miotónica, factores de empalme tal como proteína tipo ciego muscular, que regula el empalme de varios transcriptos que codifican para proteínas que tienen funciones importantes en la regulación de la función muscular, se secuestran de sustratos de pre-ARNm importantes. Las composiciones y métodos descritos en la presente pueden tratar trastornos de dominancia de ARN al promover la degradación de transcriptos de ARN que contienen regiones de repetición de nucleótidos expandidos, efectuando de esta manera la liberación de proteínas de unión a ARN significativas de estos transcriptos.

Distrofia Miotónica Tipo I

La distrofia miotónica tipo I es la forma más común de distrofia muscular en adultos, y se presenta con una frecuencia estimada de 1 de cada 7,500 (Harper P S., Myotonic Dystrophy. London: W.B. Saunders Company; 2001). Esta enfermedad es un trastorno dominante autosómico provocado por la expansión de una repetición de CTG no codificante en el gen DMPK1 humano. DMPK1 es un gen que codifica para una serina citosólica/treonina cinasa (Brook et al., Cell. 68:799-808 (1992)). La repetición de CTG expandida se ubica en la región no traducida (UTR) de 3' de DMPK1. Esta mutación conduce a la dominancia de ARN,

un proceso en el que la expresión de ARN que contiene una repetición de CUG expandida (CUGexp) induce disfunción celular (Osborne R J y Thornton C A., Human Molecular Genetics. 15:R162-R169 (2006)).

La forma mutante del ARNm de DMPK, que alberga grandes repeticiones de CUG, se transcribe y poliadenila completamente, pero permanece atrapada en el núcleo (Davis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 94:7388- 7393 (1997)). Estos ARNm mutantes retenidos nuclearmente son una de las características patológicas más importantes de la distrofia miotónica tipo I. El gen DMPK normalmente tiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 37 repeticiones de CTG en la UTR 3'. En la distrofia miotónica tipo I, este número se expande significativamente, y puede estar en el intervalo, por ejemplo, de 50 a más de 4,000 repeticiones. El tracto de CUGexp en el transcripto de ARN resultante interactúa con proteínas de factor de empalme de unión a ARN, incluyendo proteína tipo ciego muscular. La avidéz potenciada engendrada por la región de repetición de CUG expandida provoca que el transcripto mutante retenga estas proteínas de factor de empalme en focos nucleares. La toxicidad de este ARN mutante se deriva del secuestro de proteínas de factor de empalme de unión a ARN lejos de otros sustratos pre-ARNm, incluyendo aquellos que codifican para proteínas que tienen funciones importantes en la regulación de la función muscular.

En la distrofia miotónica tipo I, el músculo esquelético es el tejido más gravemente afectado, pero la enfermedad también tiene efectos importantes en el músculo cardíaco y liso, el lente ocular, y el cerebro. Entre el tejido muscular, los músculos craneal, de extremidad distal, y diafragma a menudo se ven afectados preferentemente. La destreza manual se ve comprometida temprano, lo que provoca varias décadas de discapacidad grave. La edad mediana a la muerte es de 55 años, que usualmente es de insuficiencia respiratoria (de Die-Smulders C E, et al., Brain 121 (Pt 8):1557-1563 (1998)). Los síntomas de distrofia miotónica incluyen, sin limitación, miotonía, rigidez muscular, debilidad distal incapacitante, debilidad en los músculos de la cara y mandíbula, dificultad para tragar, caída de los párpados (ptosis), debilidad de los músculos del cuello, debilidad en los músculos del brazo y la pierna, dolor muscular persistente, hipersomnia, distrofia muscular, disfagia, insuficiencia respiratoria, latidos irregulares, daño muscular cardíaco, apatía, resistencia a la insulina, y cataratas. En los niños, los síntomas también pueden incluir retardos en el desarrollo, problemas de aprendizaje, dificultades de lenguaje y habla, y desafíos de desarrollo de personalidad.

Transcriptos patógenos de DMPK

Los pacientes con distrofia miotónica que se pueden tratar utilizando las composiciones y métodos descritos en la presente incluyen pacientes, tal como pacientes humanos, que tienen distrofia miotónica tipo I, y que expresan un transcripto de ARN de DMPK

que alberga una expansión de repetición de CUG. Los ejemplos de transcritos de ARN de DMPK que se pueden expresar por un paciente que se somete a tratamiento con las composiciones y métodos descritos en la presente se exponen en los números de acceso de GenBank NM_001081560.1, NT_011109.15 (de nucleótidos 18540696 a 18555106), NT_039413.7 (de nucleótidos 16666001 a 16681000), NM_032418.1, AI007148.1, AI304033.1, BC024150.1, BC056615.1, BC075715.1, BU519245.1, CB247909.1, CX208906.1, CX732022.1, 560315.1, 560316.1, NM_001081562.1, y NM_001100.3.

Supresión de la expresión de ARN de DMPK patológica

Al utilizar las composiciones y métodos descritos en la presente, a un paciente, tal como un paciente que padece de distrofia miotónica (por ejemplo, distrofia miotónica tipo I) se le puede administrar un vector que codifica para, o una composición que contiene, un ARN de interferencia que se fija a y suprime la expresión de transcritos de ARNm de DMPK patológica. Las composiciones y métodos descritos en la presente pueden atenuar selectivamente la expresión de transcritos de ARNm de DMPK que contienen repeticiones de CUG expandidos, tal como transcritos de ARNm de DMPK que contienen de aproximadamente 50 a aproximadamente 4,000, o más, repeticiones de CUG. Por ejemplo, las moléculas de ARN de interferencia descritas en la presente pueden activar ribonucleasas, tal como ribonucleasas nucleares, que digieren en específico transcritos de DMPK retenidos nuclearmente que albergan expansiones de repetición de CUG. La disminución en la expresión de ARNm de DMPK mutante puede ser una disminución de, por ejemplo, aproximadamente 1% o más, tal como una disminución de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%, con relación a la expresión de transcritos de ARNm de DMPK que contienen regiones de repetición de trinucleótidos CUG expandida por el paciente antes de la administración de un agente terapéutico descrito en la presente, tal como un vector o ácido nucleico descrito en la presente. Los métodos que se pueden utilizar para evaluar los niveles de expresión de ARN se conocen en la técnica e incluyen ensayos de RNA-seq y técnicas de reacción en cadena de polimerasa descritas en la presente.

Corrección de Empalmeopatía

En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente se pueden utilizar para corregir una o más empalmopatías en un paciente, tal como un paciente que padece de distrofia miotónica (por ejemplo, distrofia miotónica tipo I). Sin limitarse por el mecanismo, la capacidad de las moléculas de ARN de interferencia descritas en la presente para fijarse a, y suprimir la expresión de, transcritos de DMPK patológica (por ejemplo, transcritos de DMPK que contienen regiones de repetición de CUG expandida) puede liberar

factores de empalme, tal como proteína tipo ciego muscular, que de otra manera se secuestrarían por medio de la unión a las repeticiones de CUG.

Esta liberación de factores de empalme puede, a su vez, efectuar el empalme correctivo de uno o más sustratos de transcritos de ARN de estos factores de empalme. Por ejemplo, tras la administración del vector o composición a un paciente que padece de distrofia miotónica, el paciente puede exhibir un aumento en la expresión de ARNm de ATPasa 1 de calcio de retículo sarcoplásmico/endoplásmico (SERCA1) que contiene el exón 22, por ejemplo, en los músculos tibialis anterior, gastrocnemio, y/o cuádriceps. El aumento en la expresión de transcritos de ARNm de SERCA1 que contienen el exón 22 puede ser un aumento de, por ejemplo, aproximadamente 1.1 veces a aproximadamente 10 veces, o más (por ejemplo, un aumento en la expresión de ARNm de SERCA1 que contiene el exón 22 en aproximadamente 1.1 veces, 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 1.6 veces, 1.7 veces, 1.8 veces, 1.9 veces, 2 veces, 2.1 veces, 2.2 veces, 2.3 veces, 2.4 veces, 2.5 veces, 2.6 veces, 2.7 veces, 2.8 veces, 2.9 veces, 3 veces, 3.1 veces, 3.2 veces, 3.3 veces, 3.4 veces, 3.5 veces, 3.6 veces, 3.7 veces, 3.8 veces, 3.9 veces, 4 veces, 4.1 veces, 4.2 veces, 4.3 veces, 4.4 veces, 4.5 veces, 4.6 veces, 4.7 veces, 4.8 veces, 4.9 veces, 5 veces, 5.1 veces, 5.2 veces, 5.3 veces, 5.4 veces, 5.5 veces, 5.6 veces, 5.7 veces, 5.8 veces, 5.9 veces, 6 veces, 6.1 veces, 6.2 veces, 6.3 veces, 6.4 veces, 6.5 veces, 6.6 veces, 6.7 veces, 6.8 veces, 6.9 veces, 7 veces, 7.1 veces, 7.2 veces, 7.3 veces, 7.4 veces, 7.5 veces, 7.6 veces, 7.7 veces, 7.8 veces, 7.9 veces, 8 veces, 8.1 veces, 8.2 veces, 8.3 veces, 8.4 veces, 8.5 veces, 8.6 veces, 8.7 veces, 8.8 veces, 8.9 veces, 9 veces, 9.1 veces, 9.2 veces, 9.3 veces, 9.4 veces, 9.5 veces, 9.6 veces, 9.7 veces, 9.8 veces, 9.9 veces, 10 veces o más), como se evaluó, por ejemplo, utilizando un ensayo de detección de ARN o proteína, descrito en la presente.

En algunas modalidades, tras la administración de un vector o composición descrita en la presente a un paciente que padece de distrofia miotónica, el paciente puede exhibir una disminución en la expresión de ARNm de canal 1 activado por voltaje de cloruro (CLCN1) que contiene exón 7a, por ejemplo, en los músculos tibial anterior, gastrocnemio, y/o cuádriceps. La disminución en la expresión de ARNm de CLCN1 que contiene exón 7a puede ser una disminución de, por ejemplo, aproximadamente 1% a aproximadamente 100% (por ejemplo, una disminución en la expresión de ARNm de CLCN1 que contiene exón 7a por aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%,

64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%), como se evaluó, por ejemplo, usando un ensayo de detección de ARN o proteína, descrito en la presente.

De manera adicional o alternativamente, tras la administración de un vector o composición descrito en la presente a un paciente que padece de distrofia miotónica, el paciente puede exhibir una disminución en la expresión de proteína de mota asociada con ZO-2 (ZASP) que contiene el exón 11, por ejemplo, en los músculos tibial anterior, gastrocnemio, y/o cuádriceps. La disminución en la expresión de transcritos de ARNm de ZASP que contiene exón 11 puede ser una disminución de, por ejemplo, aproximadamente 1% a aproximadamente 100% (por ejemplo, una disminución en la expresión de ARNm de ZASP que contiene exón 11 por aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%), como se evaluó, por ejemplo, usando un ensayo de detección de ARN o proteína, descrito en la presente.

Adicionalmente o de manera alternativa, tras la administración de un vector o composición descrita en la presente a un paciente que padece de distrofia miotónica, el paciente puede exhibir un aumento en el empalme correctivo de transcritos de ARN que codifican para el receptor de insulina, receptor de rianodina 1 (RYR1), troponina de músculo cardíaco y/o troponina de músculo esquelético, tal como un aumento de aproximadamente 1.1 veces a aproximadamente 10 veces, o más (por ejemplo, un aumento en la expresión de transcritos de ARN empalmados correctamente que codifican para el receptor de insulina, RYR1, troponina de músculo cardíaco y/o troponina de músculo esquelético en aproximadamente 1.1 veces, 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 1.6 veces, 1.7 veces, 1.8 veces, 1.9 veces, 2 veces, 2.1 veces, 2.2 veces, 2.3 veces, 2.4 veces, 2.5 veces, 2.6 veces, 2.7 veces, 2.8 veces, 2.9 veces, 3 veces, 3.1 veces, 3.2 veces, 3.3 veces, 3.4 veces, 3.5 veces, 3.6 veces, 3.7 veces, 3.8 veces, 3.9 veces, 4 veces, 4.1 veces, 4.2 veces, 4.3 veces, 4.4 veces, 4.5 veces, 4.6 veces, 4.7 veces, 4.8 veces, 4.9 veces, 5 veces, 5.1 veces, 5.2 veces, 5.3 veces, 5.4 veces, 5.5 veces, 5.6 veces, 5.7 veces, 5.8 veces, 5.9 veces, 6 veces, 6.1 veces, 6.2 veces, 6.3 veces, 6.4 veces, 6.5 veces, 6.6 veces, 6.7 veces, 6.8 veces, 6.9 veces, 7 veces, 7.1 veces, 7.2 veces, 7.3 veces, 7.4 veces, 7.5 veces, 7.6 veces, 7.7

veces, 7.8 veces, 7.9 veces, 8 veces, 8.1 veces, 8.2 veces, 8.3 veces, 8.4 veces, 8.5 veces, 8.6 veces, 8.7 veces, 8.8 veces, 8.9 veces, 9 veces, 9.1 veces, 9.2 veces, 9.3 veces, 9.4 veces, 9.5 veces, 9.6 veces, 9.7 veces, 9.8 veces, 9.9 veces, 10 veces o más), como se evaluó, por ejemplo, utilizando un ensayo de detección de ARN o proteínas descrito en la presente.

Mejora en la función muscular

Los efectos de tratamiento beneficiosos de las composiciones y métodos descritos en la presente, tal como la capacidad de las moléculas de ARN de interferencia descritas en la presente, y los vectores que codifican para las mismas, para (i) suprimir la expresión de ARN de DMPK patológica y/o (ii) restaurar el empalme correcto de proteínas implicadas en la regulación de la función muscular se pueden manifestar clínicamente de una variedad de maneras. Por ejemplo, los pacientes que tienen distrofia miotónica, tal como distrofia miotónica tipo I, pueden exhibir una mejora en la función de músculo craneal, de extremidad distal, y/o diafragmático. La mejora en la función muscular se puede observar, por ejemplo, como un aumento en la masa muscular, frecuencia de contracciones musculares, y/o magnitud de contracciones musculares. Por ejemplo, el uso de las composiciones y métodos descritos en la presente, un paciente que padece de distrofia miotónica (por ejemplo, distrofia miotónica tipo I) puede exhibir un aumento en la masa muscular craneal, de extremidad distal, y/o diafragmática, frecuencia de contracciones musculares y/o magnitud de contracciones musculares. El aumento en la masa muscular, frecuencia de contracciones musculares, y/o magnitud de contracciones musculares puede ser, por ejemplo, un aumento de 1% o más, tal como un aumento de 1% a 25%, de 1% a 50%, de 1% a 75%, de 1% a 100%, de 1% a 500%, de 1% a 1,000%, o más, tal como un aumento en la masa muscular, frecuencia de contracciones musculares, y/o magnitud de contracciones musculares de aproximadamente 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1,000%, o más.

En particular, en pacientes que tienen distrofia miotónica (por ejemplo, distrofia miotónica tipo I), los efectos terapéuticos beneficiosos de las moléculas de ARN de interferencia descritas en la presente, y de los vectores que codifican para las mismas, se pueden manifestar como una reducción en miotonía. Por consiguiente, utilizando las composiciones y métodos descritos en la presente, a un paciente que tiene distrofia miotónica (por ejemplo, distrofia miotónica tipo I) se le puede administrar una molécula de ARN de interferencia o vector que codifica para el mismo a fin de facilitar y/o acelerar la relajación muscular. Por ejemplo, las composiciones y métodos descritos en la presente se pueden utilizar para acelerar la relajación muscular por la supresión del inicio de potenciales de acción

espontánea provocados por fluctuaciones en la concentración de iones de cloruro. Sin limitarse por el mecanismo, esta actividad beneficiosa se puede provocar por la restauración del empalme correcto del ARNm de CLCN1, por ejemplo, tal que se reduzca la expresión de ARNm de CLCN1 que contiene el exón 7a en el paciente. Como la proteína de canal de CLCN1 regula la concentración de iones de cloruro, corregir el patrón de empalme de los transcritos de ARNm de CLCN1 puede engendrar una reducción en el inicio de potenciales de acción espontánea y una mejora en la velocidad de relajación muscular, mejorando de esta manera la miotonía.

La supresión de miotonía se puede evaluar utilizando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, por medio de electromiografía. En particular, se puede realizar electromiografía en el cuádriceps izquierdo y derecho, músculos gastrocnemios izquierdo y derecho, músculos tibial anterior izquierdo y derecho, y/o músculos paraespinales lumbares para evaluar los efectos de las composiciones y métodos descritos en la presente en miotonía en un paciente, tal como un paciente humano tiene distrofia miotónica. Se han descrito protocolos de electromiografía, por ejemplo, en Kanadia et al., Science 302:1978-1980 (2003). Por ejemplo, la electromiografía se puede realizar utilizando electrodos de aguja concéntrica de calibre 30 y un mínimo de 10 inserciones de aguja para cada músculo. De esta manera, se puede determinar un grado de miotonía promedio para un sujeto, tal como un paciente humano o un organismo modelo (por ejemplo, un modelo murino de distrofia muscular descrito en la presente). Este grado entonces se puede comparar al grado de miotonía promedio del paciente u organismo modelo determinado antes de la administración de un agente terapéutico descrito en la presente (por ejemplo, una molécula de ARN de interferencia o un vector que codifica para el mismo). Un hallazgo de que el grado de miotonía promedio ha disminuido después de la administración del agente terapéutico puede servir como una indicación de tratamiento exitoso de distrofia miotónica y como un indicador de mejora exitosa del síntoma de miotonía.

Mejora de los síntomas adicionales de distrofia miotónica

Al usar las composiciones y métodos descritos en la presente, a un paciente que tiene distrofia miotónica, tal como distrofia miotónica tipo 1, se le puede administrar una molécula de ARN de interferencia o vector que codifica para el mismo para atenuar o eliminar conjuntamente uno o más síntomas de distrofia miotónica. Además de la miotonía descrita anteriormente, los síntomas de distrofia miotónica incluyen, sin limitación, rigidez muscular, debilidad distal incapacitante, debilidad en los músculos de la cara y mandíbula, dificultad para tragar, ptosis, debilidad de los músculos del cuello, debilidad en los músculos del brazo y la pierna, dolor muscular persistente, hipersomnia, distrofia muscular, disfagia, insuficiencia

respiratoria, latidos irregulares, daño muscular cardíaco, apatía, resistencia a la insulina, y cataratas. En los niños, los síntomas también pueden incluir retardos en el desarrollo, problemas de aprendizaje, dificultades de lenguaje y habla, y desafíos de desarrollo de personalidad. Las composiciones y métodos descritos en la presente se pueden utilizar para aliviar uno o más de, o todos, los síntomas anteriores.

Duración de efectos terapéuticos

Las composiciones y métodos descritos en la presente proporcionan efectos clínicos beneficiosos que pueden durar períodos extendidos de tiempo. Por ejemplo, al utilizar una o más de las moléculas de ARN de interferencia descritas en la presente, y/o vectores que codifican para las mismas, un paciente que tiene distrofia miotónica (por ejemplo, distrofia miotónica tipo I) puede exhibir (i) una reducción en la expresión de ARN de DMPK patológica (por ejemplo, una reducción en la expresión de ARN de DMPK que alberga de aproximadamente 50 a aproximadamente 4,000 repeticiones de CUG, o más), (ii) una mejora en la función muscular (tal como una mejora en la masa muscular y/o actividad muscular, por ejemplo, en el músculo craneal, de extremidad distal, y de diafragma) y/o (iii) alivio de uno o más síntomas de distrofia miotónica, durante un período de uno o más días, semanas, meses, o años. Por ejemplo, al utilizar las composiciones y métodos descritos en la presente, los efectos terapéuticos beneficiosos descritos en la presente se pueden lograr durante un período de al menos 30 días, al menos 35 días, al menos 40 días, al menos 45 días, al menos 50 días, al menos 55 días, al menos 60 días, al menos 65 días, al menos 70 días, al menos 75 días, al menos 76 días, al menos 77 días, al menos 78 días, al menos 79 días, al menos 80 días, al menos 85 días, al menos 90 días, al menos 95 días, al menos 100 días, al menos 105 días, al menos 110 días, al menos 115 días, al menos 120 días, o al menos 1 año.

Modelos murinos de distrofia miotónica

Para examinar los efectos terapéuticos de una molécula de ARN de interferencia descrita en la presente, o aquellos de un vector que codifica para el mismo, se puede utilizar un modelo de ratón apropiado. Por ejemplo, el modelo de ratón de HSA (actina esquelética humana)^{LR} (repetición larga) es un modelo establecido para la distrofia miotónica tipo 1 (ver, por ejemplo, Mankodi et al., Science 289:1769 (2000), la descripción de la cual se incorpora en la presente como referencia en lo que se refiere al ratón de HSA^{LR}. Estos ratones portan un transgén de actina esquelética humana (hACTAI) que contiene una región de CTG expandida. En particular, el transgén de hACTAI en ratones de HSA^{LR} contiene 220 repeticiones de CTG insertadas en la UTR 3' del gen. Tras la transcripción, el transcripto de ARN hACTAI -CUGexp se acumula en focos nucleares en los músculos esqueléticos y da por resultado miotonía similar a esa observada en la distrofia miotónica humana tipo 1, por

ejemplo, debido a la unión de expansiones de repetición de CUG a factores de empalme y el secuestro de estos factores de empalme de transcriptos de pre-ARNm que codifican para genes que desempeñan una función importante en la regulación de la función muscular (ver, por ejemplo, Mankodi et al., *Mol. Cell* 10:35 (2002), y Lin et al. *Hum. Mol. Genet.* 15:2087 (2006), las descripciones de cada una de las cuales se incorporan en la presente como referencia en lo que se refiere al ratón de HSA^{LR}). Por consiguiente, la mejora de los síntomas de distrofia miotónica tipo I en el ratón de HSA^{LR} por la supresión de la expresión de transcriptos de ARN de hACTAI que albergan regiones de repetición expandidas de CUG puede ser un predictor de mejora de síntomas similares en pacientes humanos por la supresión de la expresión de transcriptos de ARN de DMPK patológica. Los ratones de distrofia miotónica tipo I de HSA^{LR} se pueden generar utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por la inserción en el genoma de ratones FVB/N de un transgén de hACTAI con 250 repeticiones de CUG en la UTR 3' de actina esquelética humana. El transgén se expresa posteriormente en los ratones como una expansión de repetición de CUG en ARN de hACTAI. Este ARN expandido repetidamente se retiene en el núcleo, que forma inclusiones nucleares similares a aquellas observadas en muestras de tejido humano de pacientes con distrofia miotónica.

Tal como se describe anteriormente, en el modelo de ratón de HSA^{LR}, la acumulación de ARN de CUG expandido en el núcleo conduce al secuestro de proteínas de factor de empalme de unión a poli(CUG), tal como proteína tipo ciego muscular (Miller et al., *EMBO J.* 19:4439 (2000)). Este factor de empalme, que controla el empalme alternativo del gen de SERCA1, por consiguiente, se secuestra en focos de CUG expandidos en ratones de HSA^{LR}. Este secuestro activa la eliminación de la expresión del empalme alternativo del gen de SERCA1. Para evaluar el efecto terapéutico de las moléculas de ARN de interferencia descritas en la presente, y/o de vectores que codifican para las mismas, estas composiciones se pueden diseñar a fin de fijarse a una región del transcripto de ARN de hACTAI, por ejemplo, en un sitio distal de la expansión de repetición de CUG. Esto se puede lograr, por ejemplo, al diseñar una molécula de ARN de interferencia que es al menos 85% complementaria (por ejemplo, al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, o 100% complementaria) a un segmento de ARN de hACTAI que no se traslapa con la región de expansión de repetición de CUG. La supresión de ARN de hACTAI expandido repetidamente y el aumento concomitante en ARNm de SERCA1 empalmado correctamente (y, por consiguiente, proteína de SERCA1 funcional), entonces se pueden evaluar utilizando métodos de detección de ARN y proteínas conocidos en la técnica y descritos en la presente. Por ejemplo, para monitorear un aumento en la expresión de transcriptos de ARNm de SERCA1 empalmados

correctamente (por ejemplo, transcritos de ARNm de SERCA1 que contienen el exón 22, después de la administración de una molécula de ARN de interferencia diseñada para fijarse a, y suprimir la expresión de, ARN de hACTA1 patológico, se puede purificar ARN total del ratón de HSA^{LR} en uno o más, o todos, del músculo tibial anterior, gastrocnemio, y cuádriceps utilizando el Mini Kit de tejido de lípido RNeasy (Qiagen^{MR}), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. RT-PCR se puede realizar, por ejemplo, con el sistema de un paso de RT-PCR SuperScript III y polimerasa de Taq de platino (Invitrogen^{MR}), utilizando cebadores específicos para genes para la síntesis de ADNc y amplificación de PCR. Los cebadores directos e inversos para SERCA1 se han descrito, por ejemplo, en Bennett y Swayze, *Annu Rev. Pharmacol.* 50:259-293 (2010)). Los productos de PCR se pueden separar en geles de agarosa, teñir con tinción de gel de ácido nucleico SybrGreen I (Invitrogen^{MR}) y formar en imagen utilizando una caja oscura inteligente LAS-3000 de Fujifilm. La restauración del empalme correcto del gen de SERCA1 por una molécula de ARN de interferencia, o vector que codifica para el mismo, por ejemplo, en los músculos tibial anterior, gastrocnemio, y/o cuádriceps del ratón de HSA^{LR}, puede ser un predictor de la eficacia terapéutica de una molécula de ARN de interferencia, o vector que codifica para el mismo, que se hibrida a un sitio similar en ARN de DMPK humano.

Los modelos murinos adicionales de distrofia miotónica incluyen ratones LC15, Línea A, que son ratones transgénicos que contienen toda la 3'UTR de DMPK humana (desarrollada por Wheeler et al., University of Rochester). Estos ratones son la segunda generación de ratones retrocruzados a un fondo de FVB. El transgén de DMPK se expresa en estos ratones como una repetición de CUG en el transcripto de ARN de DMPK, que se retiene en el núcleo, formando de esta manera inclusiones nucleares similares a aquellas observadas en muestras de tejido humano de pacientes con distrofia miotónica. Los ratones LC15 pueden expresar transcritos de ARN de DMPK que contienen de aproximadamente 350 a aproximadamente 400 repeticiones de CUG. Estos ratones muestran signos tempranos de distrofia miotónica tipo I y no muestran ninguna miotonía en sus tejidos musculares.

Aun otro modelo murino de distrofia miotónica que se puede utilizar para evaluar la eficacia terapéutica de una molécula de ARN de interferencia descrita en la presente o un vector que codifica para la misma es el modelo DMSXL. Los ratones DMSXL se generan por medio de la reproducción sucesiva de ratones que tienen un alto nivel de inestabilidad de repetición de CTG y, como resultado, los ratones DMSXL expresan transcritos de ARN de DMPK que contienen >1,000 repeticiones de trinucleótidos de CUG en la UTR 3'. Los ratones DMSXL y métodos para producir los mismos se describen en detalle, por ejemplo, en Gomes-Pereira et al., *PLoS Genet.* 3:e52 (2007), y Huguet et al. A, *PLoS Genet.* 8:e1003043 (2012),

las descripciones de cada una de las cuales se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

Trastornos adicionales caracterizados por retención nuclear de ARN expandido repetidamente

Además de la distrofia miotónica tipo I, los trastornos caracterizados por la expresión y retención nuclear de transcritos de ARN que albergan regiones de repetición expandidas y que se pueden tratar utilizando las composiciones y métodos descritos en la presente incluyen distrofia miotónica tipo II y esclerosis lateral amiotrófica, entre otros. En el caso de distrofia miotónica tipo II, los pacientes pueden expresar una versión mutante del gen de proteína de unión a ácido nucleico celular (CNBP) (también conocido como el gen de proteína con dedo de zinc 9 (ZNF9)) que alberga una expansión de repetición de CCUG (SEQ ID NO: 164). En casos de pacientes que tienen esclerosis lateral amiotrófica, los pacientes pueden expresar versiones mutantes de C90RF72 que albergan repeticiones de GGGGCC expandidas (SEQ ID NO: 162). La secuencia de ácidos nucleicos de varias isoformas de ARNm de C90RF72 se muestran en la tabla 3, a continuación. En todos los casos, los pacientes que tienen estos trastornos se pueden tratar por la administración de moléculas de ARN de interferencia (o vectores que codifican para los mismos) que se fijan a, y suprimen la expresión del transcrito de ARN mutante, liberando de esta manera proteínas de unión a ARN que normalmente se unirían a otros sustratos pero en su lugar se secuestran en virtud de la unión de alta avidéz a las regiones de expansión de repetición en los transcritos mutantes expresados por estos pacientes. Métodos para monitorear la reducción en la expresión de transcripciones de ARN retenidas nucleares, tal como transcritos patológicos de CNBP y C90RF72 que albergan repeticiones de CCUG (SEQ ID NO: 164) y GGGGCC (SEQ ID NO: 162), respectivamente, incluyen diversas técnicas de biología molecular conocidas en la técnica y descritas en la presente.

Tabla 3. Secuencias de ácido nucleico de isoformas de ARNm de C9QRF72 de ejemplo

SEQ ID NO.	Secuencia de referencia NCBI No.	Secuencia de Ácido Nucleico
163	NM_001256054.2	ACGUAACCUACGGUGUCCCGCUAGGAAAGAGAGGGUG CGUCAACAGCGACAAGUCCGCCACGUAAAAGAUG ACGCUUGGUGUGUCAGCCGUCCUGCUGCCCGGUU GCUUCUCUUUUGGGGGCGGGGUCUAGCAAGAGCAG GUGUGGGUUUAGGAGAUUUCUCCGGAGCAUUUGGAU AAUGUGACAGUUGGAAUGCAGUGAUGUCGACUCUUU GCCACCGCCAUCUCCAGCUGUUGCCAAGACAGAGA UUGCUUUAAUGGGCAAUACCUUUUAGCAGCUAC UUUUGCUUACUGGGACAAUUAUUCUUGGUCCUAGAGU AAGGCACAUUUGGGCUCCAAAGACAGAACAGGUACUU CUCAGUGAUGGAGAAAUAACUUUUCUUGCCAACCACA

		CUCUAAAUGGAGAAAUCCUUCGAAAUGCAGAGAGUG GUGCUAUAGAUGUAAAAGUUUUUUGUCUUGUCUGAAA AGGGAGUGAUUAUUGUUUCAUUAUUCUUUG
SEQ ID NO.	Secuencia de referencia NCBI No.	Secuencia de Ácido Nucleico
		AUGGAAACUGGAAUGGGGAUCGCAGCACAU AUGGAC UAUCAAUUAUACUCCACAGACAGAACUAGUUUCUA CCUCCCACUUCAUAGAGUGUGUGUAGAUAGAUAAAC ACAUAAUAAUCCGGAAGGAAGAAUAUGGAUGCAUAAG GAAAGACAAGAAAAUGUCCAGAAGAUUAUCUUAGAAG GCACAGAGAGAAUGGAAGAU CAGGGUCAGAGUAUUA UCCAAUGCUUACUGGAGAAGUGAUUCCUGUAAUGG AACUGCUUUCAUCUAUGAAAUCACACAGUGUCCUGA AGAAAUAGAUUAAGCUGAUACAGUACUCAUGAUGAU GAUAUUGGUGACAGCUGUCAUGAAGGCUUUCUUCUC AAUGCCAUCAGCUCACACUUGCAAACCUGUGGCUGU UCCGUUGUAGUAGGUAGCAGUGCAGAGAAAGUAAAU AAGAUAGUCAGAACAUUAUGCCUUUUUCUGACUCCAG CAGAGAGAAAAUGCUCCAGGUUAUGUGAAGCAGAAUC AUCAUUUAAAUAUGAGUCAGGGCUCUUUGUACAAGG CCUGCUAAAGGAUUCAACUGGAAGCUUUGUGCUGCC UUUCCGGCAAGUCAUGUAUGCUCCAUAUCCCAACCACA CACAUAGAUUGGAUGUCAAUACUGUGAAGCAGAU CCACCCUGUCAUGAACAUUUUAUAUACAGCGUAGAU ACAUGAGAUCCGAGCUGACAGCCUUCUGGAGAGCCA CUUCAGAAGAAGACAUGGCUCAGGAUACGAUCAUCUA CACUGACGAAAGCUUUACUCCUGAUUUUGAAUUAUUUU CAAGAUGUCUUAACACAGAGACACUCUAGUGAAAGCCU UCCUGGAUCAGGUCUUUCAGCUGAAACCUGGCUUAU CUCUCAGAAGUACUUUCCUUGCACAGUUUCUACUUG UCCUUCACAGAAAAGCCUUGACACUAAUAAAAUAUAU AGAAGACGAUACGCAGAAAGGGAAAAAAGCCCUUAAA UCUCUUCGGAACCUGAAGAUAGACCUUGAUUUAAACAG CAGAGGGCGAUUCUUAACAUAAUAUAGGCUCUGGCUG AGAAAAUUAAACCAGGCCUACACUCUUUUUAUCUUUGG AAGACCUUUCUACACUAGUGUGCAAGAACGAGAUGUU CUAAUGACUUUUUAAAUGUGUAACUUAUAUAGCCUAU UCCAUCACAAUCAUGAUCGCUGGUAAGUAGCUCAGU GGUGUGGGGAAACGUUCCCCUGGAUCAUACUCCAGA AUU
SEQ ID NO.	Secuencia de referencia NCBI No.	Secuencia de Ácido Nucleico
		CUGCUCUCAGCAAUUGCAGUUAAGUAAGUUACACUAC AGUUCUCACAAGAGCCUGUGAGGGGAUGUCAGGUGC AUCAUUACAUUGGGUGUCUUUUCCUAGAUUUUAUG CUUUUGGGAUACAGACCUAUGUUUACAAUAUAAUAAA UAUUUAUUGCUAUCUUUUAAAGAUAAUAUAUAGGAUG UAAACUUGACCACAACUACUGUUUUUUUGAAAUACAU GAUUCAUGGUUUACAUGUGUCAAGGUGAAAUUCUGAG

		UUGGCUUUUACAGAUAGUUGACUUUCUAUCUUUUGG CAUUCUUUGGUGUGUAGAAUACUGUAAUACUUCUG CAAUCAACUGAAAACUAGAGCCUUUAAAUGAUUCAA UCCACAGAAAGAAAGUGAGCUUGAACAUAGGAUGAG CUUUAGAAAGAAAAUUGAUCAAGCAGAUUUUAAUUG GAAUUGAUUAAUAGAUCUACUUUGUGGAUUUAGUC CCUGGGAUUCAGUCUGUAGAAAUGUCUAAUAGUUCU CUAUAGUCCUUGUUCUGGUGAACCACAGUUAGGGU GUUUUGUUUAAUUUAAUUGUUCUUGCUAUUGUUGAUA UUCUAUGUAGUUGAGCUCUGUAAAAGGAAAUUGUAU UUUAUGUUUUAGUAAUUGUUGCCAACUUUUUAAAUA AUUUUCAUUAUUUUUGAGCCAAAUUGAAUUGGCACC UCCUGUGCCUUUUUUCUCCUUAGAAAUCUAAUUAU UGGAACAAGUUCAGAUUUCACUGGUCAGUCAUUUUC AUCUUGUUUUUCUUCUUGCUAAGUCUUACCAUGUACC UGCUUUGGCAAUCAUUGCAACUCUGAGAUUAUAAAAU GCCUUAGAGAAUUAACUAAUAAUAGAUUUUUUU CAGAAACAGAAAAUAGUCCUUGAGUACUCCUUCU GCAUUUCUGCCUAUGUUUUUGAAGUUGUUGCUGUUU GCCUGCAAUAGGCUAUAAGGAUAGCAGGAGAAUUU UACUGAAGUGCUGUUUCCUAGGUGCUACUUUGGCA GAGCUAAGUUAUCUUUUGUUUUCUAAUUGCGUUUGG ACCAUUUUGCUGGCUAUAUUUAACUGAUUAAUUA UUCUAAACACAAUGUUGACAUUGUAGUUAACACAAAC AAUAAAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU AAAGGGAAAAUUAUUUUAUAAAGAAAGGGAUAAAGGUA AUAGAGCCCUUCUGCCCCCACCACCAAAUUUACA
SEQ ID NO.	Secuencia de referencia NCBI No.	Secuencia de Ácido Nucleico
		CAACAAAUGACAUGUUCGAAUGUGAAAGGUCAUAAU AGCUUUCUCAUGAAUCAGAAAGAUGUGGACAGCU UGAUGUUUUAGACAACCACUGAACUAGAUGACUGUU GUACUGUAGCUCAGUCAUUUAAAAAUUAUAAAUAC UACCUUGUAGUGUCCCAUACUGUGUUUUUACAUGG UAGAUCUUAUUUAAGUGCUAACUGGUUAUUUUCU UGGCUGGUUUAAUUGUACUGUUUAACAGAAUGUAAGU UGUACAGUGAAAUAAAGUUAUUAAGCAUGUGUAAACA UUGUUUAUAUUCUUUUCUCCUAAUUGGAGAAUUUUGA AUAAAAUUAUUUGAAAUUUUAAAAAAAAAAAAAAAAA A
165	NM_018325.4	GGGCGGGGCGUGCGGUUGCGGUGCCUGCGCCCGCGG CGGCGGAGGCGCAGGCGGUGGCGAGUGGAUAUCUC CGGAGCAUUUGGAUAAUGUGACAGUUGGAUUGCAGU GAUGUCGACUCUUUGCCCACCGCCAUCUCCAGCUGU UGCCAAGACAGAGAUUGCUUUAAGUGGCAAUACCCU UUUUUAGCAGCUACUUUUGCUUACUGGGACAAUUAU CUUGGUCCUAGAGUAAGGCACAUUUGGGCUCCAAAG ACAGAACAGGUACUUCUCAGUGAUGGAGAAUAACUU UUCUUGCCAACCACACUCUAAAUGGAGAAUCCUUCG AAUUGCAGAGAGUGGUGCUAUAAGAUGUAAAGUUUUU

		UGUCUUGUCUGAAAAGGGAGUGAUUAUUGUUUCAUU AAUCUUUGAUGGAAACUGGAAUGGGGAUCGCAGCAC AUAUGGACUAUCAAUUAUACUCCACAGACAGAACUU AGUUUCUACCUCACUUCUAGAGUGUGUGUUGAU AGAUUAAACACAUAAUCCGAAAGGAAGAAUAUGGA UGCAUAAGGAAAGACAAGAAAAUGUCCAGAAGAUUAU CUUAGAAGGCACAGAGAGAAUGGAAGAUACAGGGUCA GAGUAUUAUUCCAAUGCUUACUGGAGAAGUGAUUCC UGUAAUGGAACUGCUUUAUCUAUGAAAUCACACAGU GUUCCUGAAGAAUAGAUUAAGCUGAUACAGUACUCA AUGAUGAUGAUUAUUGGUGACAGCUGUCAUGAAGGCU UUCUUCUCAUUGCCAUCAGCUCACACUUGCAAACCUG UGGCUGUUCGUGUAGUAGGUAGCAGUGCAGAGAA AGUAAAUAAGAUUA
SEQ ID NO.	Secuencia de referencia NCBI No.	Secuencia de Ácido Nucleico
		GUCAGAACAUUAUGCCUUUUUCUGACUCCAGCAGAG AGAAAAUGCUCCAGGUUAUGUGAAGCAGAAUCAUCAU UUAUAUUGAGUCAGGGCUCUUUGUACAAGGCCUGC UAAAGGAUUAACUGGAAGCUUUGUGCUGCCUUUCC GGCAAGUCAUGUAUGCUCCAUAUCCCACCACACACAU AGAUGUGGAUGUCAAUACUGUGAAGCAGAUGCCACC CUGUCAUGAACAUUAUUUAUAUCAGCGUAGAUACAUG AGAUCCGAGCUGACAGCCUUCUGGAGAGCCACUUCA GAAGAAGACAUGGCUCAGGAUACGAUCAUCUACACUG ACGAAAGCUUUACUCCUGAUUUGAAUAUUUUUCAAGA UGUCUUACACAGAGACACUCUAGUGAAAGCCUUCCU GGAUCAGGUCUUUCAGCUGAAACCUGGCUUAUCUCU CAGAAGUACUUUCCUUGCACAGUUUCUACUUGUCCU UCACAGAAAAGCCUUGACACUAAUAAAUAUAUAGAA GACGAUACGCAGAAGGGAAAAAAGCCCUUUAAAUCUC UUCGGAACCUGAAGAUAGACCUUGAUUUAAACAGCAGA GGGCGAUCUUAACAUAAUAUAGGCUCUGGCUGAGAA AAUUAACAGGCCUACACUCUUUUUAUCUUUGGAAGA CCUUUCUACACUAGUGUGCAAGAACGAGAUGUUCUAA UGACUUUUUAAAUGUGUAACUUAUAAGCCUUAUCCA UCACAAUCAUGAUCGCUGGUAAAGUAGCUCAGUGGU GUGGGGAAACGUUCCCCUGGAUCAUACUCCAGAAUU CUGCUCUCAGCAAUUGCAGUUAAGUAAGUUACACUAC AGUUCUCACAAGAGCCUGUGAGGGGAUGUCAGGUGC AUCAUUACAUUGGGUGUCUCUUUUCCUAGAUUUUAUG CUUUUGGGAUACAGACCUAUGUUUACAAUAUAUAAA UAUAUAUUGCUAUCUUUUAAAGAUUAUAUAUAGGAUG UAAACUUGACCACAACUACUGUUUUUUUGAAAUACAU GAUUCAUGGUUUACAUGUGUCAAGGUGAAAUCUGAG UUGGCUUUUACAGAUAGUUGACUUUCUACUUUUUGG CAUUCUUUGGUGUGUAGAAUACUGUAAUACUUCUG CAAUCAACUGAAAACUAGAGCCUUUAAAUGAUUUCAA UUCCACAGAAAGAAAGUGAGCUUGAACAUAGGAUGAG CUUUAGAAAGAAAAUUGAUCAAGCAGAUGUUUAAU

SEQ NO.	ID	Secuencia de referencia NCBI No.	Secuencia de Ácido Nucleico
			UGGAAUUGAUUUAUUGAUCCUACUUUGUGGAUUUAG UCCCUGGGAUUCAGUCUGUAGAAAUGUCUAAUAGUU CUCUAUAGUCCUUGUCCUGGUGAACCACAGUUAGG GUGUUUUGUUUAUUUUAUUGUUCUUGCUAUUGUUGA UAUUCUAUGUAGUUGAGCUCUGUAAAAGGAAAUUGUA UUUUAUGUUUUAGUAAUUGUUGCCAACUUUUUAAAUU AAUUUUCAUUAUUUUUGAGCCAAAUUGAAAUGUGCAC CUCCUGUGCCUUUUUUCUCCUUAGAAAUCUAAUUAC UUGGAACAAGUUCAGAUUUCACUGGUCAGUCAUUUU CAUCUUGUUUUUCUUCUUGCUAAGUCUUACCAUGUAC CUGCUUUGGCAAUCAUUGCAACUCUGAGAUUAUAAAA UGCCUUAGAGAAUAUACUAACUAUAAGAUCUUUUUU UCAGAAACAGAAAAUAGUCCUUGAGUACUCCUUCU UGCAUUUCUGCCUAUGUUUUUGAAGUUGUUGCUGUU UGCCUGCAAUAGGCUAUAAGGAAUAGCAGGAGAAAU UUACUGAAGUGCUGUUUUCCUAGGUGCUACUUUGGC AGAGCUAAGUUAUCUUUUUGUUUUUCUUAUUGCGUUUG GACCAUUUUGCUGGCUAUAUUUAACUGAUUAUAUA AUUCUAACACAAUGUUGACAUUGUAGUUACACAAACA CAAAUAAAUAUUUUUAUUUAAAAUUCUGGAAGUAAU AAAAGGGAAAAUAUAUUUAUAAGAAAGGGAUAAAGGU AAUAGAGCCCUUCUGCCCCCCCACCCACCAAUUUACA CAACAAAAUGACAUGUUCGAAUGUGAAAGGUCUAUAA AGCUUUCCCAUCAUGAAUCAGAAAGAUGUGGACAGCU UGAUGUUUUAGACAACCACUGAACUAGAUGACUGUU GUACUGUAGCUCAGUCAUUUAAAAAAUAUAUAAAUAC UACCUUGUAGUGUCCCAUACUGUGUUUUUUACAUGG UAGAUAUCUUAUUUAAGUGCUAACUGGUUAUUUUCU UGGCUGGUUUUAUUGUACUGUUUAUACAGAAUGUAAGU UGUACAGUGAAAUAAAGUUAUUAAGCAUGUGUAAACA UUGUUAUAUAUCUUUUUCUCCUAAAUGGAGAAUUUUGA AUAAAAUAUAUUUGAAAUUUUAAAAAAAAAAAAAAAAA A
166		NM_145005.6	ACGUAACCUACGGUGUCCCGCUAGGAAAGAGAGGGUG CGUCAAAACAGCGACAAGUUCGCCCCACGUAAAAGAUG ACGCUUGAUUAUCUCCGGAGCAUUUGGAUAAUGUGAC AGUUGGAAUGCAGUGAUGUCGACUCUUUGCCCACCG CCAUCUCCAGCUGUUGCCAAGACAGAGAUUGCUUUA AGUGGCAAUACACCUUUUAUAGCAGCUACUUUUGCU UACUGGGACAAUAUUCUUGGUCCUAGAGUAAGGCAC AUUUGGGCUCCAAAGACAGAACAGGUACUUCUCAGU GAUGGAGAAUAACUUUUUCUUGCCAACCACACUCUAA AUGGAGAAAUCCUUCGAAAUGCAGAGAGUGGUGCUA UAGAUGUAAAGUUUUUUGUCUUGUCUGAAAAGGGAG UGAUUUAUUGUUUCAUUAUCUUUGAUGGAAACUGGAA UGGGGAUCGCAGCACAUUGGACUAUCAAUUAUACU

		UCCACAGACAGAACUUAGUUUCUACCUCCACUUCU AGAGUGUGUGUUGAUAGAUUAACACAUUAAUCCGGA AAGGAAGAAUAUGGAUGCAUAAGGAAAGACAAGAAAA UGUCCAGAAGAUUAUCUUAGAAGGCACAGAGAGAAUG GAAGAUCAGGGUCAGAGUAUUAUUCCAAUGCUUACU GGAGAAGUGAUUCCUGUAAUGGAACUGCUUUCUUCU AUGAAUUCACACAGUGUCCUGAAGAAAUAGAUUAG CUGAUACAGUACUCAUGAUGAUGAUUUGGUGACA GCUGUCAUGAAGGCUUUCUUCUCAAGUAAGAAUUUU UCUUUUCAUAAAAGCUGGAUGAAGCAGAUACCAUCUU AUGCUCACCUAUGACAAGAUUUGGAAGAAAGAAAAUA ACAGACUGUCUACUUAGAUUGUUCUAGGGACAUUAC GUUUUUGAACUGUUGCUUAAAUUUGUGUUUUUUUC ACUCAUUAUUAUUUCUUAUUAUUAUUUGGUGUUUCCA UUUGCUAUUUAAAGAAACCGAGUUUCCAUCUCCAGACA AGAAUUAUGGCCCCUUGCUUGAUUUCUGGUUUUCUUG UUUUACUUCUCAUUAAGCUAACAGAAUCCUUUCAUA UUAAGUUGUACUGUAGAUGAACUUAAGUUUUUAGG CGUAGAACAAAAUUAUUCAUUUUAUACUGAUCUUUU UCCAUCAGCAGUGGAGUUUAGUACUUAAGAGUUUG UGCCCUUAAACCAGACUCCUGGAUUAAUGCUGUGU ACCCGU
SEQID NO.	Secuencia de referencia NCBI No.	Secuencia de Ácido Nucleico
		GGGCAAGGUGCCUGAAUUCUCUUAUACACCUAUUUCC UCAUCUGUAAAAUGGCAUUAUAGUAAUAGUACCUAA UGUGUAGGGUUGUUUAAGCAUUGAGUAAGAUAAA AAUUAUAAAGCACUUAGAACAGUGCCUGGAACAUAAA ACACUUAUAAUAGCUCUAGCUAACAUUUCUUAUU ACAUUUCUUCUAGAAUAGCCAGUAAUUGUUGAGUG CCUACAUGUUAGUUCUUUACUAGUUGCUUUACAUG UAUUUUCUUAUUAUUCUGUUUUAAAGUUUCUUCACAGU UACAGAUUUUCAUGAAUUAUUAUUUAAUAAAAGAG AAGUAAAAGUAUAAAGUAUUCACUUUUAUGUUCACAG UCUUUUCCUUUAGGCUCAUGAUGGAGUAUCAGAGGC AUGAGUGUGUUUAACCUAAGAGCCUUAUUGGCUUGA AUCAGAAGCACUUUAGUCCUGUAUCUGUUCAGUGUC AGCCUUUCAUACAUCUUAUUUAAAUCCCAUUUGACUUU AAGUAAGUCACUUAUUCUCUCUACAUGUCAUUUCUU CAGCUAUAUUUAUGAUGGUUUUCAAUAAUAAUACA UUAAUUAAAUGAUUUUAUACUGACUAAUUGGGCUGUU UUAAGGCUCAUAAGAAAAUUUCUGUGAAAGGUCUCU AGAAAAUGUAGGUUCCUUAUACAAUAAAAGAUACA UGUGCUUAUAAAAAAA

ARN de interferencia

Usando las composiciones y métodos descritos en este documento, a un paciente que tiene una espliceopatía y / o un trastorno caracterizado por predominio del ARN se le puede

administrar una molécula de ARN interferente, una composición que lo contenga o un vector que lo codifique, para suprimir la expresión de una transcripción de ARN mutante que contiene una región repetida expandida. Por ejemplo, en el caso de distrofia miotónica tipo I, el transcripto de ARN diana que se va a suprimir es ARN de DMPK humano que contiene regiones de repetición de CUG expandida en la UTR 3' del transcripto. En el caso de distrofia miotónica tipo II, el transcripto de ARN diana que se va a suprimir es ARN de ZNF9 humano que contiene regiones de repetición de CCUG expandido (SEQ ID NO: 164). En el caso de esclerosis lateral amiotrófica, el transcripto de ARN diana que se va a suprimir es ARN de C90RF72 humano que contiene regiones de repetición de GGGCC expandido (SEQ ID NO: 162).

Las moléculas de ARN de interferencia de ejemplo que se pueden utilizar en conjunto con las composiciones y métodos descritos en la presente para el tratamiento de trastornos de dominancia de ARN, tal como distrofia miotónica tipo I y otros, son moléculas de ARNip, moléculas de miARN, y moléculas de ARNhc, entre otros. En el caso de moléculas de ARNip, el ARNip puede ser de hebra individual o de doble hebra. Las moléculas de miARN, en contraste, son moléculas de hebra individual que forman una horquilla, adoptando de esta manera una estructura unida a hidrógeno evocadora de un dúplex de ácido nucleico. En cualquier caso, el ARN de interferencia puede contener una hebra antisentido o “guía” que se fija (por ejemplo, por medio de complementariedad) a la diana de ARN mutante expandida repetidamente. El ARN de interferencia también puede contener una hebra “pasajera” que es complementaria a la hebra guía y, por consiguiente, puede tener la misma secuencia de ácido nucleico que la diana de ARN.

Los ejemplos de moléculas de ARN de interferencia que se fijan a DMPK mutante que contienen motivos de repetición de CUG expandida y que se pueden utilizar en conjunto con las composiciones y métodos descritos en la presente para el tratamiento de distrofia miotónica tipo I se muestran en la tabla 4, a continuación. Una representación gráfica de los sitios en un transcripto de ARN de DMPK diana al que las siguientes moléculas de ARN de interferencia se fijan por medio de complementariedad de secuencia se muestra en la figura 1.

Tabla 4. Moléculas de ARNi de ejemplo útiles para suprimir la expresión de ARN de DMPK mutante

SEQ ID NO.	Tipo de ARN de interferencia	Secuencia de Ácido Nucleico
3	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CGCCAGUCAACUACGCGA
4	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CCUGCUCCUGUUCGCCGUU

5	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CCCGACAUUCUCCUGGUAUU
6	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CCUAGAACUGUCUUCGACU
7	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CCUAUCGUUGGUUCGCAA
8	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GCUGGGUGUAUUCGCCUAU
9	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GGACAUCAAAACCCGACAAC
10	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GCGGGCAGAUGGAACGGUG
11	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GGCCUAUCGGAGGCGCUUU
SEQ ID NO.	Tipo de ARN de interferencia	Secuencia de Ácido Nucleico
12	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CCCUAGAACUGUCUUCGAC
13	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GGACAACCAGAACUUCGCC
14	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CGCUGGGUGUAUUCGCCUA
15	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CACCUAUCGUUGGUUCGCA
16	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GGCGCUGGGUGUAUUCGCC
17	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CGCCCUUCUACGCGGAUUC
18	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CGAAGGUGCCACCGACACA
19	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CCAUUUCUUUCUUUCGGCC
20	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GCCGUUGUUCUGUCUCGUG
21	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GUCCUGUUCGCCGUUGUU
22	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GCCAGUUCACAACCGCUCC
23	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CCAGUUGACAAGCGCUCCG
24	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GGUCCUUGUAGCCGGGAU
25	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CCACAGUCAACUACGCGAG
26	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CGACCUCAGGUAGCGGUAG
27	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CGGGAAGGUGCGCCGCUAG
SEQ ID NO.	Tipo de ARN de interferencia	Secuencia de Ácido Nucleico
28	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GGGAUUCGAGGCGUGCGAG

29	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GGCUUAAGGAGGUCCGACU
30	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CCCUACGUCUUUGCGACUU
31	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CGACUGCAGAGGGACGACU
32	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CCAAUGACGAGUUCGGACG
33	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GGUCCAGGUGCGGUCGCUG
34	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GCAGGAGACACUGUCGGAC
35	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CCCACGUCUGGGCCGUUAC
36	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GCACCGGCUUGGCUACGUG
37	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GCUUGAUUCUGAACCGCUG
38	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	GCUUAAGGAGGUCCGACUG
39	ARNip (Idéntico a secuencia diana)	CGUGCUGUCACUGGACGAG
40	miARN (hebra pasajera)	AGCGCCAGUCAACUACGCGAG
41	miARN (hebra pasajera)	CCCCUGCUCCUGUUCGCCGUU
42	miARN (hebra pasajera)	AGCCCGACAUUCUCGGUAUU
43	miARN (hebra pasajera)	ACCCUAGAACUGUCUUCGAUU
SEQID NO.	Tipo de ARN de interferencia	Secuencia de Ácido Nucleico
44	miARN (hebra pasajera)	ACCCUAUCGUUGGUUCGCAAA
45	miARN (hebra pasajera)	ACGCUGGGUGUAUUCGCCUAU
46	miARN (hebra pasajera)	CGGGACAUCAAAACCCGACAAU
47	miARN (hebra pasajera)	ACGCGGGCAGAUGGAACGGUG
48	miARN (hebra pasajera)	ACGGCCUAUCGGAGGCGCUUU
49	miARN (hebra pasajera)	AGCCCUAGAACUGUCUUCGAU
50	miARN (hebra pasajera)	ACGGACAACCAGAACUUCGUU
51	miARN (hebra pasajera)	AGCGCUGGGUGUAUUCGCUUA
52	miARN (hebra pasajera)	ACCACCUAUCGUUGGUUCGUA
53	miARN (hebra pasajera)	CGGGCGCUGGGUGUAUUCGUU

54	miARN (hebra pasajera)	ACCGCCCUUCUACGCGGAUUU
55	miARN (hebra pasajera)	CGCGAAGGUGGGAGOGACAU
56	miARN (hebra pasajera)	ACCCAUUUCUUUCUUUCGGUU
57	miARN (hebra pasajera)	AGGCCGUUGUUCUGUCUCGUG
58	miARN (hebra pasajera)	ACGCUCCUGUUCGCCGUUGUU
59	miARN (hebra pasajera)	ACGCCAGUUCACAACCGCUUU
SEQ ID NO.	Tipo de ARN de interferencia	Secuencia de Ácido Nucleico
60	miARN (hebra pasajera)	CGCCAGUUCACAACCGGUUUG
61	miARN (hebra pasajera)	CGGGUCCUUGUAGCCGGGAU
62	miARN (hebra pasajera)	ACCCACAGUCAACUACGCGAG
63	miARN (hebra pasajera)	ACCGACCUCAGGUAGCGGUAG
64	miARN (hebra pasajera)	CGCGGGAAGGUGCGCCGCUAG
65	miARN (hebra pasajera)	ACGGGAUUCGAGGCGUGCGAG
66	miARN (hebra pasajera)	ACGGCUUAAGGAGGUCCGAUU
67	miARN (hebra pasajera)	AGCCCUACGUCUUUGCGAUUU
68	miARN (hebra pasajera)	CCCGACUGCAGAGGGACGAUU
69	miARN (hebra pasajera)	CGCCAAUGACGAGUUCGGAUG
70	miARN (hebra pasajera)	CGGGUCCAGGUGCGGUCGUUG
71	miARN (hebra pasajera)	ACGCAGGAGACACUGUCGGAU
72	miARN (hebra pasajera)	CGCCCACGUCUGGGCCGUUUAU
73	miARN (hebra pasajera)	ACGCACCGGCUUGGCUACGUG
74	miARN (hebra pasajera)	ACGCUUGAUUCUGAACCGUUG
75	miARN (hebra pasajera)	CGGCUUAAGGAGGUCCGAUUG
SEQ ID NO.	Tipo de ARN de interferencia	Secuencia de Ácido Nucleico
76	miARN (hebra pasajera)	ACCGUGCUGUCACUGGACGAG
77	miARN (hebra guía)	UUCGCGUAGUUGACUGGCGCC

78	miARN (hebra guía)	AACGGCGAACAGGAGCAGGGC
79	miARN (hebra guía)	AAUACCGAGGAAUGUCGGGCC
80	miARN (hebra guía)	AGUCGAAGACAGUUCUAGGGC
81	miARN (hebra guía)	UUUGCGAACCAACGAUAGGGC
82	miARN (hebra guía)	AUAGGCGAAUACACCCAGCGC
83	miARN (hebra guía)	GUUGUCGGGUUUGAUGUCCCA
84	miARN (hebra guía)	UACCGUUCCAUCUGCCCGCGC
85	miARN (hebra guía)	AAAGCGCCUCCGAUAGGCCGC
86	miARN (hebra guía)	GUCGAAGACAGUUCUAGGGCC
87	miARN (hebra guía)	GGCGAAGUUCUGGUUGUCCGC
88	miARN (hebra guía)	UAGGCGAAUACACCCAGCGCC
89	miARN (hebra guía)	UGCGAACCAACGAUAGGUGGC
90	miARN (hebra guía)	GGCGAAUACACCCAGCGCCCA
91	miARN (hebra guía)	GAAUCCGCGUAGAAGGGCGGC
92	miARN (hebra guía)	UGUGUCGGUGGCACCUUCGCA
93	miARN (hebra guía)	GGCCGAAAGAAAGAAAUGGGC
94	miARN (hebra guía)	UACGAGACAGAACAACGGCGC
95	miARN (hebra guía)	AACAACGGCGAACAGGAGCGC
96	miARN (hebra guía)	GGAGCGGUUGUGAACUGGCGC
97	miARN (hebra guía)	UGGAGCGGUUGUGAACUGGCA
98	miARN (hebra guía)	AUUCCCGGCUACAAGGACCCU
99	miARN (hebra guía)	UUCGCGUAGUUGACUGUGG
100	miARN (hebra guía)	UUACCGCUACCUGAGGUCGGC
101	miARN (hebra guía)	UUAGCGGCGCACCUUCCCGCA
102	miARN (hebra guía)	UUCGCACGCCUCGAAUCCCGC
103	miARN (hebra guía)	AGUCGGACCUCCUUAAGCCGC
104	miARN (hebra guía)	AAGUCGCAAAGACGUAGGGCC
105	miARN (hebra guía)	AGUCGUCCCUCUGCAGUCGGA

SEQ ID NO.	Tipo de ARN de interferencia	Secuencia de Ácido Nucleico
106	miARN (hebra guía)	UGUCCGAACUCGUCAUUGGCA
107	miARN (hebra guía)	UAGCGACCGCACCUGGACCCA
108	miARN (hebra guía)	GUCCGACAGUGUCUCCUGCGC
109	miARN (hebra guía)	GUAACGGCCCAGACGUGGGCA
110	miARN (hebra guía)	UACGUAGCCAAGCCGGUGCGC
111	miARN (hebra guía)	UAGCGGUUCAGAAUCAAGCGC
112	miARN (hebra guía)	UAGUCGGACCUCCUUAAGCCA
113	miARN (hebra guía)	UUCGUCCAGUGACAGCACGGC
114	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGCGGGCGCUGGGUGUAUUC GUUACUGUAAAGCCACAGAUG
115	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGACCGCCCUUCUACGCGGAU UUACUGUAAAGCCACAGAUG
116	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGCGCGAAGGUGCCACCGACA UAACUGUAAAGCCACAGAUG
117	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGACCCAUUUCUUCUUCGG UUACUGUAAAGCCACAGAUG
118	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGACGCGGUUGUUCUGUCUC GUGACUGUAAAGCCACAGAUG
119	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGACGCUCCUGUUCGCCGUU GUUACUGUAAAGCCACAGAUG
120	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGACGCCAGUUCACAACCGCU UUACUGUAAAGCCACAGAUG
121	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGCGCCAGUUCACAACCGCUU UGACUGUAAAGCCACAGAUG
122	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGCGGGUCCUUGUAGCCGGG AAUACUGUAAAGCCACAGAUG
123	miARN	UUUUACUAGUAGGCGUGGGCGCUGGGUGUAUUCG CCAGCAUCUGUGGCUUUACAG
124	miARN	UUUUACUAGUAGGCGGCGCCCUUCUACGCGGAU UCAGCAUCUGUGGCUUUACAG
125	miARN	UUUUACUAGUAGGCGUGCGAAGGUGCCACCGACA CAAGCAUCUGUGGCUUUACAG
SEQ ID NO.	Tipo de ARN de interferencia	Secuencia de Ácido Nucleico

126	miARN	UUUUACUAGUAGGCGGCCCAUUUCUUUCUUUCGG CCAGCAUCUGUGGCUUUACAG
127	miARN	UUUUACUAGUAGGCGGCGCCGUUGUUCUGUCUCG UAAGCAUCUGUGGCUUUACAG
128	miARN	UUUUACUAGUAGGCGGCGCUCCUGUUCGCCGUUG UUAGCAUCUGUGGCUUUACAG
129	miARN	UUUUACUAGUAGGCGGCGCCAGUUCACAACCGCU CCAGCAUCUGUGGCUUUACAG
130	miARN	UUUUACUAGUAGGCGUGCCAGUUCACAACCGCUCC AAGCAUCUGUGGCUUUACAG
131	miARN	UUUUACUAGUAGGCGUGGGUCCUUGUAGCCGGGA AUAGCAUCUGUGGCUUUACAG
132	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGACCCACAGUCAACUACGCG AGACUGUAAAGCCACAGAUG
133	miARN	UUUUACUAGUAGGCGGCCACAGUCAACUACGCGA AAGCAUCUGUGGCUUUACAG
134	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGACCGACCUCAGGUAGCGG UAGACUGUAAAGCCACAGAUG
135	miARN	UUUUACUAGUAGGCGGCCGACCUCAGGUAGCGGU AAAGCAUCUGUGGCUUUACAG
136	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGCGCGGGAAGGUGCGCCGC UAGACUGUAAAGCCACAGAUG
137	miARN	UUUUACUAGUAGGCGUGCGGGAAGGUGCGCCGCU AAAGCAUCUGUGGCUUUACAG
138	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGACGGGAUUCGAGGCGUGC GAGACUGUAAAGCCACAGAUG
139	miARN	UUUUACUAGUAGGCGGCGGGAUUCGAGGCGUGCG AAAGCAUCUGUGGCUUUACAG
140	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGACGGCUUAAGGAGGUCCG AUUACUGUAAAGCCACAGAUG
141	miARN	UUUUACUAGUAGGCGGCGGCUUAAGGAGGUCCGA CUAGCAUCUGUGGCUUUACAG
SEQID NO.	Tipo de ARN de interferencia	Secuencia de Ácido Nucleico
142	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGAGCCCUACGUCUUUGCGAU UUACUGUAAAGCCACAGAUG
143	miARN	UUUUACUAGUAGGCGGGCCCUACGUCUUUGCGAC UUAGCAUCUGUGGCUUUACAG

144	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGCCCGACUGCAGAGGGACG AUUACUGUAAAGCCACAGAUG
145	miARN	UUUUACUAGUAGGCGUCCGACUGCAGAGGGACGA CUAGCAUCUGUGGCUUUACAG
146	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGCGCCAAUGACGAGUUCGGA UGACUGUAAAGCCACAGAUG
147	miARN	UUUUACUAGUAGGCGUGCCAAUGACGAGUUCGGA CAAGCAUCUGUGGCUUUACAG
148	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGCGGGUCCAGGUGCGGUCG UUGACUGUAAAGCCACAGAUG
149	miARN	UUUUACUAGUAGGCGUGGGUCCAGGUGCGGUCGC UAAGCAUCUGUGGCUUUACAG
150	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGACGCAGGAGACACUGUCG GAUACUGUAAAGCCACAGAUG
151	miARN	UUUUACUAGUAGGCGGCGCAGGAGACACUGUCGG ACAGCAUCUGUGGCUUUACAG
152	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGCGCCACGUCUGGGCCGU UAUACUGUAAAGCCACAGAUG
153	miARN	UUUUACUAGUAGGCGUGCCCACGUCUGGGCCGUU ACAGCAUCUGUGGCUUUACAG
154	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGACGCACCGGCUUGGCUAC GUGACUGUAAAGCCACAGAUG
155	miARN	UUUUACUAGUAGGCGGCGCACCGGCUUGGCUACG UAAGCAUCUGUGGCUUUACAG
156	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGACGCUUGAUUCUGAACCGU UGACUGUAAAGCCACAGAUG
157	miARN	UUUUACUAGUAGGCGGCGCUUGAUUCUGAACCGC UAAGCAUCUGUGGCUUUACAG
SEQ ID NO.	Tipo de ARN de interferencia	Secuencia de Ácido Nucleico
158	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGCGGCUUAAGGAGGUCCGA UUGACUGUAAAGCCACAGAUG
159	miARN	UUUUACUAGUAGGCGUGGCUUAAGGAGGUCCGAC UAAGCAUCUGUGGCUUUACAG
160	miARN	AAAACUCGAGUGAGCGACCGUGCUGUCACUGGAC GAGACUGUAAAGCCACAGAUG
161	miARN	UUUUACUAGUAGGCGGCCGUGCUGUCACUGGACG AAAGCAUCUGUGGCUUUACAG

Las construcciones de miARN de ejemplo útiles en conjunto con las composiciones y métodos descritos en la presente son aquellos que tienen una combinación de hebras guía y pasajeras mostradas en la tabla 5, a continuación.

Tabla 5. Combinaciones de hebra guía/hebra pasajera de miARN anti-DMPK de ejemplo

Entrada No.	aRNip en el que se basa la construcción de miARN	Hebra pasajera de miARN	Hebra guía de miARN
1	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 77
2	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 78
3	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 79
4	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 80
5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 81
6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 82
7	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 83
8	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 84
9	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 85
10	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 86
11	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 87
12	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 88
13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 89
14	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 90
15	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 91
16	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 92
Entrada No.	aRNip en el que se basa la construcción de miARN	Hebra pasajera de miARN	Hebra guía de miARN
17	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 93
18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 94
19	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 95
20	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 96
21	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 97

22	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 98
23	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 99
24	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 100
25	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 101
26	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 102
27	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 103
28	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 104
29	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 105
30	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 106
31	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 107
32	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 108
33	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 109
34	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 110
35	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 111
36	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 112
37	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 113

Vectores para la administración de ARN de interferencia

Vectores virales para la administración de ARN de interferencia

Los genomas virales proporcionan una fuente rica de vectores que se pueden utilizar para la administración eficiente de un gen de interés en el genoma de una célula diana en un paciente (por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula humana). Los genomas virales son vectores en particular útiles para la administración de genes debido a que los polinucleótidos contenidos dentro de estos genomas se incorporan habitualmente en el genoma de una célula diana por transducción generalizada o especializada. Estos procesos se producen como parte del ciclo de replicación viral natural, y no requieren proteínas o reactivos adicionales a fin de inducir la integración génica. Los ejemplos de vectores virales que se pueden utilizar en conjunto con las composiciones y métodos descritos en la presente son AAV, retrovirus, adenovirus (por ejemplo, Ad5, Ad26, Ad34, Ad35 y Ad48), parvovirus (por ejemplo, virus adenoasociados), coronavirus, virus de ARN de hebra negativa tal como ortomixovirus (por ejemplo, virus de influenza), rabiovirus (por ejemplo, virus de la rabia y estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo, sarampión y Sendai), virus de ARN de

hebra positiva, tal como picornavirus y alfavirus, y virus de ADN de doble hebra que incluyen adenovirus, herpesvirus (por ejemplo, virus Herpes Simplex tipos 1 y 2, virus Epstein-Barr, citomegalovirus), y poxvirus (por ejemplo, variolovacuna, variolovacunamodificada Ankara (MVA), viruela aviar y viruela canaria). Otros virus que se pueden utilizar en conjunto con las composiciones y métodos descritos en la presente incluyen virus Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus, y virus de hepatitis, a manera de ejemplo. Los ejemplos de retrovirus incluyen: leucosis-sarcoma aviar, virus tipo C de mamífero, virus tipo B, virus tipo D, grupo de HTLV-BLV, lentivirus, spumavirus (Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, Third Edition, B. N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996). Otros ejemplos incluyen virus de leucemia murina, virus de sarcoma murino, virus de tumor mamario de ratón, virus de leucemia bovina, virus de leucemia felina, virus de sarcoma felino, virus de leucemia aviar, virus de leucemia de células T humanas, virus endógeno de babuino, virus de leucemia de mono gibón, virus de mono Maso-Pfizer, virus de la inmunodeficiencia de simio, virus de sarcoma de simio, virus de sarcoma de Rous y lentivirus. Otros ejemplos de vectores se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos de América No. 5,801,030, la descripción de la cual se incorpora en la presente como referencia en lo que se refiere a vectores virales para uso en terapia génica.

Vectores de AAV para la administración de ARN de interferencia

En algunas modalidades, las construcciones de ARN de interferencia descritas en la presente se incorporan en vectores de AAV recombinante (rAAV) a fin de facilitar su introducción en una célula, tal como una célula cardíaca diana (por ejemplo, una célula muscular) en un paciente. Los vectores de rAAV útiles en conjunto con las composiciones y métodos descritos en la presente incluyen construcciones de ácido nucleico recombinante que contienen (1) un transgén que codifica para una construcción de ARN de interferencia descrita en la presente (tal como un ARNip, ARNhc, o miARN descrito en la presente) y (2) ácidos nucleicos que facilitan y expresión de los genes heterólogos. Los ácidos nucleicos virales pueden incluir aquellas secuencias de AAV que se requieren en cis para la replicación y el empaquetamiento (por ejemplo, ITR funcionales) del ADN en un virión. Estos vectores de rAAV también pueden contener genes de marcador o indicador. Los vectores de rAAV útiles incluyen aquellos que tienen uno o más de los genes de AAV que se presentan naturalmente eliminados en su totalidad o en parte, pero retienen secuencias de ITR de flanco funcionales. Las ITR de AAV pueden ser de cualquier serotipo (por ejemplo, derivado del serotipo 2) adecuado para una aplicación particular. Los métodos para utilizar vectores de rAAV se describen, por ejemplo, en Tal et al., *J. Biomed. Sci.* 7:279-291 (2000), y Monahan y

Samulski, *Gene Delivery* 7:24-30 (2000), las descripciones de cada una de las cuales se incorporan en la presente como referencia en lo que se refiere a vectores de AAV para la administración de genes.

Los ácidos nucleicos y vectores descritos en la presente se pueden incorporar en un virión de rAAV a fin de facilitar la introducción del ácido nucleico o vector en una célula. Las proteínas de cápside de AAV componen la porción exterior de ácido no nucleico del virión y se codifican por el gen cap de AAV. El gen cap codifica para tres proteínas de recubrimiento viral, VP1, VP2 y VP3, que se requieren para el ensamble de viriones. La construcción de viriones de rAAV se ha descrito, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos de América No. 5,173,414; 5,139,941; 5,863,541; 5,869,305; 6,057,152; y 6,376,237; así como en Rabinowitz et al., *J. Virol.* 76:791-801 (2002) y Bowles et al., *J. Virol.* 77:423-432 (2003), las descripciones de cada una de las cuales se incorporan en la presente como referencia en lo que se refiere a vectores de AAV para la administración de genes. Los viriones de rAAV útiles en conjunto con las composiciones y métodos descritos en la presente incluyen aquellos derivados de una variedad de serotipos de AAV que incluyen AAV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9. La construcción y el uso de vectores de AAV y proteínas de AAV de diferentes serotipos se describen, por ejemplo, en Chao et al., *Mol. Ther.* 2:619-623 (2000); Davidson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3428-3432 (2000); Xiao et al., *J. Virol.* 72:2224-2232 (1998); Halbert et al., *J. Virol.* 74:1524-1532 (2000); Halbert et al., *J. Virol.* 75:6615-6624 (2001); y Auricchio et al., *Hum. Molec. Genet.* 10:3075-3081 (2001), las descripciones de cada una de las cuales se incorporan en la presente como referencia en lo que se refiere a vectores de AAV para la administración de genes.

También útiles en conjunto con las composiciones y métodos descritos en la presente son vectores de rAAV pseudotipados. Los vectores pseudotipados incluyen vectores de AAV de un serotipo determinado (por ejemplo, AAV2) pseudotipado con un gen de cápside derivado de un serotipo distinto del serotipo determinado (por ejemplo, AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9, entre otros). Por ejemplo, un vector pseudotipado representativo es un vector de AAV2 que codifica para una proteína terapéutica pseudotipada con un gen de cápside derivado del serotipo de AAV 8 o el serotipo de AAV 9. Las técnicas que implican la construcción y el uso de viriones de rAAV pseudotipados se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Duan et al., *J. Virol.* 75:7662-7671 (2001); Halbert et al., *J. Virol.* 74:1524-1532 (2000); Zolotukhin et al., *Methods*, 28:158-167 (2002); y Auricchio et al. *Hum. Molec. Genet.*, 10:3075-3081 (2001).

Los viriones de AAV que tienen mutaciones dentro de la cápside de virión se pueden utilizar para infectar tipos celulares particulares de manera más efectiva que los viriones de

cápside no mutados. Por ejemplo, los mutantes de AAV adecuados pueden tener mutaciones de inserción de ligando para la facilitación de dirigir AAV a tipos de células específicas. La construcción y caracterización de mutantes de cápside de AAV que incluyen mutantes de inserción, mutantes de evaluación de alanina, y mutantes de etiqueta de epítipo se describe en Wu et al., J. Virol. 74:8635-45 (2000). Otros viriones de rAAV que se pueden utilizar en métodos de la invención incluyen aquellos híbridos de cápside que se generan por reproducción molecular de virus, así como por transposiciones de exones. Ver, por ejemplo, Soong et al., Nat. Genet., 25:436-439 (2000) y Kolman y Stemmer, Nat. Biotechnol. 19:423-428 (2001).

Métodos adicionales para la administración de ARN de interferencia

Técnicas de transfección

Las técnicas que se pueden utilizar para introducir un transgén, tal como un transgén que codifica para una construcción de ARN de interferencia descrita en la presente, en una célula diana (por ejemplo, una célula diana de o dentro de un paciente humano que padece dominancia de ARN) se conocen en la técnica. Por ejemplo, la electroporación se puede utilizar para permeabilizar células de mamífero (por ejemplo, células diana humanas) por la aplicación de un potencial electrostático a la célula de interés. Las células de mamífero, tal como células humanas, sometidas a un campo eléctrico externo de esta manera están posteriormente predisuestas a la captación de ácidos nucleicos exógenos. La electroporación de células de mamífero se describe en detalle, por ejemplo, en Chu et al., Nucleic Acids Research 15:1311 (1987), la descripción de la cual se incorpora en la presente como referencia. Una técnica similar, Nucleofection^{MR}, utiliza un campo eléctrico aplicado a fin de estimular la captación de polinucleótidos exógenos en el núcleo de una célula eucariota. Nucleofection^{MR} y protocolos útiles para realizar esta técnica se describen en detalle, por ejemplo, en Distler et al., Experimental Dermatology 14:315 (2005), así como en US 2010/0317114, las descripciones de cada una de las cuales se incorporan en la presente como referencia.

Las técnicas adicionales útiles para la transfección de células diana incluyen la metodología de extracción por presión. Esta técnica induce la deformación mecánica rápida de células a fin de estimular la captación de ADN exógeno a través de poros membranosos que se forman en respuesta a la tensión aplicada. Esta tecnología es ventajosa porque no se requiere un vector para la administración de ácidos nucleicos en una célula, tal como una célula diana humana. La extracción por presión se describe en detalle, por ejemplo, en Sharei et al., Journal of Visualized Experiments 81 :e50980 (2013), la descripción de la cual se incorpora en la presente como referencia.

La lipofección representa otra técnica útil para la transfección de células diana. Este método implica la carga de ácidos nucleicos en un liposoma, que a menudo presenta grupos funcionales catiónicos, tal como aminas cuaternarias o protonadas, hacia el exterior de liposoma. Esto promueve interacciones electrostáticas entre el liposoma y una célula debido a la naturaleza aniónica de la membrana celular, que por último conduce a la captación de los ácidos nucleicos exógenos, por ejemplo, por fusión directa del liposoma con la membrana celular o por endocitosis del complejo. La lipofección se describe en detalle, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos de América No. 7,442,386, la descripción de la cual se incorpora en la presente como referencia. Las técnicas similares que aprovechan interacciones iónicas con la membrana celular para provocar la captación de ácidos nucleicos extraños incluyen poner en contacto una célula con un complejo de polímero catiónico-ácido nucleico. Las moléculas catiónicas de ejemplo que se asocian con polinucleótidos a fin de impartir una carga positiva favorable para la interacción con la membrana celular son dendrímeros activados (descritos, por ejemplo, en Dennig, *Topics in Current Chemistry* 228:227 (2003), la descripción de la cual se incorpora en la presente como referencia) y dietilaminoetil (DEAE)-dextrano, el uso de la cual como un agente de transfección se describe en detalle, por ejemplo, en Gulick et al., *Current Protocols in Molecular Biology* 40:1:9.2:9.2.1 (1997), la descripción de la cual se incorpora en la presente como referencia. Las cuentas magnéticas son otra herramienta que se puede utilizar para transfectar células diana de una manera suave y eficiente, puesto que esta metodología utiliza un campo magnético aplicado a fin de dirigir la captación de ácidos nucleicos. Esta tecnología se describe en detalle, por ejemplo, en US 2010/0227406, la descripción de la cual se incorpora en la presente como referencia.

Otra herramienta útil para inducir la captación de ácidos nucleicos exógenos por células diana es la laserfección, una técnica que implica exponer una célula a radiación electromagnética de una longitud de onda particular a fin de permeabilizar suavemente las células y permitir que los polinucleótidos penetren la membrana celular. Esta técnica se describe en detalle, por ejemplo, en Rhodes et al., *Methods in Cell Biology* 82:309 (2007), la descripción de la cual se incorpora en la presente como referencia.

Las microvesículas representan otro vehículo potencial que se puede utilizar para modificar el genoma de una célula diana de acuerdo con los métodos descritos en la presente. Por ejemplo, las microvesículas que se han inducido por la co-sobreexpresión de la glicoproteína VSV-G con, por ejemplo, una proteína modificadora de genoma, tal como una nucleasa, se pueden utilizar para administrar eficientemente proteínas en una célula que posteriormente cataliza la escisión específica de sitio de una secuencia de polinucleótidos endógena a fin de preparar el genoma de la célula para la incorporación covalente de un

polinucleótido de interés, tal como un gen o secuencia reguladora. El uso de estas vesículas, también conocidas como gesículas, para la modificación genética de células eucariotas se describe en detalle, por ejemplo, en Quinn et al., Genetic Modification of Target Cells by Direct Delivery of Active Protein [resumen]. En: Methylation changes in early embryonic genes in cancer [resumen], en: Proceedings of the 18th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy; 2015 Mayo 13, resumen No. 122.

Incorporación de ARN de interferencia de codificación de genes por edición génica

Además de lo anterior, se ha desarrollado una variedad de herramientas que se pueden utilizar para la incorporación de un transgén, tal como un transgén que codifica para una construcción de ARN de interferencia descrita en la presente, en una célula diana y en particular en una célula humana. Uno de estos métodos que se puede utilizar para incorporar polinucleótidos que codifican para construcciones de ARN de interferencia en células diana implica el uso de transposones. Los transposones son polinucleótidos que codifican para enzimas de transposasa y contienen una secuencia de polinucleótidos o gen de interés flanqueado por sitios de escisión de 5' y 3'. Una vez que se ha administrado un transposón en una célula, comienza la expresión del gen de transposasa y da por resultado enzimas activas que escinden el gen de interés del transposón. Esta actividad se media por el reconocimiento específico para sitio de los sitios de escisión de transposón por la transposasa. En algunos casos, estos sitios de extirpación pueden ser repeticiones terminales o repeticiones terminales invertidas. Una vez extirpado del transposón, el transgén de interés se puede integrar en el genoma de una célula de mamífero por escisión catalizada por transposasa de sitios de escisión similares que existen dentro del genoma nuclear de la célula. Esto permite que el transgén de interés se inserte en el ADN nuclear escindido en los sitios de escisión complementarios, y la ligadura covalente posterior de los enlaces fosfodiéster que unen el gen de interés al ADN del genoma de células de mamífero completa el proceso de incorporación. En ciertos casos, el transposón puede ser un retrotransposón, tal que el gen que codifica para el gen diana se transcriba primero a un producto de ARN y entonces se transcribe inversamente al ADN antes de la incorporación en el genoma de células de mamífero. Los ejemplos de sistemas de transposones son el transposón de piggybac (descrito en detalle en, por ejemplo, WO 2010/085699) y el transposón de sleeping beauty (descrito en detalle en, por ejemplo, US 2005/0112764), las descripciones de cada una de las cuales se incorporan en la presente como referencia en lo que se refiere a transposones para uso en la administración de genes a una célula de interés.

Otra herramienta para la integración de transgenes diana en el genoma de una célula diana es el sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente intercaladas

(CRISPR)/Cas, un sistema que originalmente evolucionó como un mecanismo de defensa adaptativa en bacterias y arqueobacterias contra infección viral. El sistema de CRISPR/Cas incluye secuencias de repeticiones palindrómicas dentro del ADN de plásmido y una nucleasa de Cas9 asociada. Este ensamble de ADN y proteína dirige la escisión de ADN específica en sitio de una secuencia diana al incorporar primero ADN extraño en los locus de CRISPR. Los polinucleótidos que contienen estas secuencias extrañas y los elementos de repetición-espaciador del locus de CRISPR se transcriben a su vez en una célula hospedadora para crear un ARN guía, que posteriormente se puede fijar a una secuencia diana y localizar la nucleasa de Cas9 a este sitio. De esta manera, la escisión de ADN mediada por cas9 altamente específica en sitio se puede engendrar en un polinucleótido extraño debido a que la interacción que trae cas9 dentro de proximidad cercana de la molécula de ADN diana se rige por la hibridación de ARN:ADN. Como resultado, se puede diseñar un sistema de CRISPR/Cas para escindir cualquier molécula de ADN diana de interés. Esta técnica se ha aprovechado a fin de editar genomas eucariotas (Hwang et al., *Nature Biotechnology* 31:227 (2013)) y se puede utilizar como un medio eficiente de editar en específico en sitio genomas de células diana a fin de escindir ADN antes de la incorporación de un gen que codifica para un gen diana. El uso de CRISPR/Cas para modular la expresión génica se ha descrito, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos de América No. 8,697,359, la descripción de la cual se incorpora en la presente como referencia en lo que se refiere al uso del sistema CRISPR/Cas para la edición de genoma. Los métodos alternativos para escindir en específico en sitio el ADN genómico antes de la incorporación de un transgén de interés en una célula diana incluyen el uso de nucleasas con dedo de zinc (ZFN) y nucleasas efectoras tipo activador de transcripción (TALEN). A diferencia del sistema de CRISPR/Cas, estas enzimas no contienen un polinucleótido guía para localizar a una secuencia diana específica. En su lugar, la especificidad diana se controla por dominios de unión a ADN dentro de estas enzimas. Se describe el uso de ZFN y TALEN en aplicaciones de edición de genoma, por ejemplo, en Urnov et al., *Nature Reviews Genetics* 11:636 (2010); y en Joung et al., *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14:49 (2013), la descripción de cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia en lo que se refiere a composiciones y métodos para la edición de genoma.

Las técnicas de edición de genoma adicionales que se pueden utilizar para incorporar polinucleótidos que codifican para transgenes diana en el genoma de una célula diana incluyen el uso de meganucleasas ARCUS^{MR} que se pueden diseñar racionalmente a fin de escindir en específico en sitio el ADN genómico. El uso de estas enzimas para la incorporación de genes que codifican para genes diana en el genoma de una célula de mamífero es

ventajoso en vista de las relaciones de estructura-actividad definidas que se han establecido para estas enzimas. Las meganucleasas de cadena individual se pueden modificar en ciertas posiciones de aminoácidos a fin de crear nucleasas que escinden selectivamente ADN en ubicaciones deseadas, lo que permite la incorporación específica in situ de un transgén diana en el ADN nuclear de una célula diana. Estas nucleasas de cadena individual se han descrito ampliamente en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos de América No. 8,021,867 y US 8,445,251, las descripciones de cada una de las cuales se incorporan en la presente como referencia en lo que se refiere a composiciones y métodos para la edición de genoma.

Métodos para detectar la expresión de transcripto de ARN

El nivel de expresión de un transcripto de ARN patológico, tal como un transcripto de ARN de DMPK que alberga una repetición de trinucleótidos CUG expandida o un transcripto de ARN de C90RF72 que alberga un hexanucleótidos GGGGCC expandido (SEQ ID NO: 162) se puede determinar, por ejemplo, por una variedad de técnicas de detección de ácido nucleico. De manera adicional o alternativamente, la expresión de transcripto de ARN se puede inferir por la evaluación de la concentración o abundancia relativa de una proteína codificada producida por la traducción del transcripto de ARN. Las concentraciones de proteína también se pueden evaluar, por ejemplo, utilizando ensayos funcionales. Al utilizar estas técnicas, se puede observar una reducción en la concentración de transcritos de ARN patológicos en respuesta a las composiciones y métodos descritos en la presente, en tanto que se monitorea la expresión de la proteína codificada. Las secciones que siguen describen técnicas de ejemplo que se pueden utilizar para medir el nivel de expresión de un transcripto de ARN patológico y su producto de proteína en dirección 3'. La expresión del transcripto de ARN se puede evaluar por una cantidad de metodologías conocidas en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, secuenciación de ácido nucleico, análisis de microarreglo, proteómica, hibridación in situ (por ejemplo, hibridación in situ de fluorescencia (FISH)), ensayos basados en amplificación, hibridación in situ, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), análisis Northern, y/o análisis de PCR de ARN.

Detección de ácido nucleico

Los métodos basados en ácido nucleico para la detección de la expresión de transcripto de ARN incluyen técnicas basadas en imágenes (por ejemplo, transferencia Northern o transferencia Southern), que se pueden utilizar en conjunto con células obtenidas de un paciente después de la administración de, por ejemplo, un vector que codifica para un ARN de interferencia descrito en la presente o una composición que contiene esta construcción de ARN de interferencia. El análisis de transferencia Northern es una técnica convencional bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Molecular Cloning, a

Laboratory Manual, segunda edición, 1989, Sambrook, Fritsch, Maniatis, Cold Spring Harbor Press, 10 Skyline Drive, Plainview, NY 11803-2500. Los protocolos habituales para evaluar el estado de genes y productos génicos se encuentran, por ejemplo, en Ausubel et al., eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Unidades 2 (transferencia Northern), 4 (transferencia Southern), 15 (inmunotransferencia) y 18 (análisis de PCR).

Técnicas de detección de ARN que se pueden utilizar en conjunto con las composiciones y métodos descritos en la presente para evaluar la supresión de transcritos de ARN que albergan regiones de repetición de nucleótidos expandidas, tal como transcritos de ARN de DMPK que albergan repeticiones de trinucleótidos CUG expandidos y transcritos de ARN de C90RF72 que albergan repeticiones de hexanucleótidos GGGGCC expandidos (SEQ ID NO: 162), además incluyen experimentos de secuenciación de microarreglo (por ejemplo, secuenciación de Sanger y métodos de secuenciación de próxima generación, también conocidos como secuenciación de alto rendimiento o secuenciación profunda). Las tecnologías de secuenciación de próxima generación de ejemplo incluyen, sin limitación, secuenciación de Illumina, secuenciación de Ion Torrent, secuenciación de 454, secuenciación de SOLiD, y plataformas de secuenciación de nanoporos. Los métodos adicionales de secuenciación conocidos en la técnica también se pueden utilizar. Por ejemplo, la expresión de transgén en el nivel de ARNm se puede determinar utilizando RNA-Seq (por ejemplo, como se describe en Mortazavi et al., Nat. Methods 5:621-628 (2008), la descripción de la cual se incorpora en la presente como referencia en su totalidad). RNA-Seq es una tecnología robusta para monitorear la expresión por secuenciación directa de las moléculas de ARN en una muestra. Brevemente, esta metodología puede implicar fragmentación de ARN a una longitud promedio de 200 nucleótidos, conversión a ADNc por cebado aleatorio, y síntesis de ADNc de doble hebra (por ejemplo, utilizando el Just cDNA DoubleStranded cDNA Synthesis Kit de Agilent Technology^{MR}). Entonces, el ADNc se convierte en una biblioteca molecular para la secuenciación por la adición de adaptadores de secuencia para cada biblioteca (por ejemplo, de Illumina^{MR}/Solexa), y las lecturas de 50-100 nucleótidos resultantes se mapean en el genoma.

Los niveles de expresión de ARN se pueden determinar utilizando plataformas basadas en microarreglo (por ejemplo, arreglos de polimorfismo de nucleótido individual), puesto que la tecnología de microarreglo ofrece alta resolución. Se pueden encontrar detalles de diversos métodos de microarreglo en la literatura. Ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos de América No. 6,232,068 y Pollack et al. Nat. Genet. 23:41 -46 (1999), las descripciones de cada una de las cuales se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. Utilizando microarreglos de ácido nucleico, las muestras de ARNm se transcriben

inversamente y se etiquetan para generar ADNc. Las sondas entonces se pueden hibridar a uno o más ácidos nucleicos complementarios arreglados e inmovilizados en un soporte sólido. El arreglo se puede configurar, por ejemplo, tal que se conozca la secuencia y posición de cada miembro del arreglo. La hibridación de una sonda etiquetada con un miembro de arreglo particular indica que la muestra a partir de la cual se derivó la sonda expresa ese gen. El nivel de expresión se puede cuantificar de acuerdo con la cantidad de señal detectada a partir de complejos de muestra de sonda hibridada. Un experimento habitual de microarreglo implica los siguientes pasos: 1) preparación de diana etiquetada fluorescentemente a partir de ARN aislado de la muestra, 2) hibridación de la diana etiquetada al microarreglo, 3) lavado, tinción, y escaneado del arreglo, 4) análisis de la imagen escaneada y 5) generación de perfiles de expresión génica. Un ejemplo de un procesador de microarreglo es el sistema Affymetrix GENECHIP^{MR}, que está disponible comercialmente y comprende arreglos fabricados por síntesis directa de oligonucleótidos en una superficie de vidrio. Otros sistemas se pueden utilizar como se conocen por un experto en la técnica.

Los ensayos basados en amplificación también se pueden utilizar para medir el nivel de expresión de un transcripto de ARN particular, tal como un transcripto de ARN de DMPK que alberga una repetición de trinucleótidos CUG expandida o un transcripto de ARN de C90RF72 que alberga una repetición de hexanucleótidos GGGGCC expandido (SEQ ID NO: 162).

En estos ensayos, la secuencia de ácidos nucleicos del transcripto actúa como una plantilla en una reacción de amplificación (por ejemplo, PCR, tal como qPCR). En una amplificación cuantitativa, la cantidad de producto de amplificación es proporcional a la cantidad de plantilla en la muestra original. La comparación a controles apropiados proporciona una medida del nivel de expresión del transcripto de interés, que corresponde a la sonda específica utilizada, de acuerdo con los principios descritos en la presente. Los métodos de qPCR en tiempo real que utilizan sondas TaqMan con bien conocidos en la técnica. Los protocolos detallados para qPCR en tiempo real se proporcionan, por ejemplo, en Gibson et al., *Genome Res.* 6:995-1001 (1996), y en Heid et al. *Genome Res.* 6:986-994 (1996), las descripciones de cada una de las cuales se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. Los niveles de expresión de transcripto de ARN como se describe en la presente se pueden determinar, por ejemplo, por tecnología de RT-PCR.

Las sondas utilizadas para PCR se pueden etiquetar con un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, quelante metálico, o enzima.

Detección de proteína

La expresión de una construcción de ARN también se puede inferir al analizar la expresión de la proteína codificada por la construcción. Los niveles de proteína se pueden evaluar utilizando técnicas de detección estándar conocidas en la técnica. Los ensayos de expresión de proteína adecuados para el uso con las composiciones y métodos descritos en la presente incluyen enfoques proteómicos, análisis inmunohistoquímico y/o transferencia Western, inmunoprecipitación, ensayos de unión molecular, ELISA, ensayo de inmunofiltración enzimática (ELIFA), espectrometría de masas, inmunoensayo espectrométrico de masas, y ensayos de actividad enzimática bioquímica. En particular, los métodos proteómicos se pueden utilizar para generar conjuntos de datos de expresión de proteína a gran escala en múltiplex. Los métodos proteómicos pueden utilizar espectrometría de masas para detectar y cuantificar polipéptidos (por ejemplo, proteínas) y/o microarreglos de péptidos que utilizan reactivos de captura (por ejemplo, anticuerpos) específicos para un panel de proteínas diana para identificar y medir los niveles de expresión de proteínas expresadas en una muestra (por ejemplo, una muestra de célula individual o una población de múltiples células).

Los microarreglos de péptidos de ejemplo tienen una pluralidad de polipéptidos unidos a sustrato, la unión de un oligonucleótido, un péptido, o una proteína a cada una de la pluralidad de polipéptidos unidos que es detectable por separado. Alternativamente, el microarreglo de péptido puede incluir una pluralidad de agentes de unión, incluyendo, pero no se limita a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, agentes de unión de expresión en fagos, agentes de unión doble híbridos de levadura, aptámeros, que pueden detectar en específico la unión de oligonucleótidos, péptidos, o proteínas específicas. Los ejemplos de arreglos de péptidos se pueden encontrar en las Patentes de Estados Unidos de América No. 6,268,210, 5,766,960 y 5,143,854, las descripciones de cada una de las cuales se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

Se puede utilizar espectrometría de masas (MS) en conjunto con los métodos descritos en la presente para identificar y caracterizar la expresión de transgén en una célula de un paciente (por ejemplo, un paciente humano) después de la administración del transgén. Cualquier método de MS conocido en la técnica se puede utilizar para determinar, detectar, y/o medir una proteína o fragmento de péptido de interés, por ejemplo, LC-MS, ESI-MS, ESI-MS/MS, MALDI-TOF-MS, MALDI-TOF/TOF-MS, MS en tándem, y similares. Los espectrómetros de masas en general contienen una fuente de iones y óptica, analizador de masas, y productos electrónicos de procesamiento de datos. Los analizadores de masas incluyen espectrómetros de masas de escaneo y haz iónico, tal como tiempo de vuelo (TOF)

y cuádruple (Q), y espectrómetros de masas de atrapamiento, tal como trampa iónica (IT), Orbitrap, y resonancia de ciclotrón de ión de transformada de Fourier (FT-ICR), se pueden utilizar en los métodos descritos en la presente. Se pueden encontrar detalles de diversos métodos de MS en la literatura. Ver, por ejemplo, Yates et al., Annu. Rev. Biomed. Eng. 11:49-79, 2009, la descripción de la cual se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

Antes del análisis de MS, las proteínas en una muestra obtenida del paciente se pueden digerir primero en péptidos más pequeños por digestión química (por ejemplo, mediante escisión de bromuro de cianógeno) o enzimática (por ejemplo, tripsina). Las muestras de péptidos de complejo también se benefician del uso de técnicas de separación de parte frontal, por ejemplo, 2D-PAGE, HPLC, RPLC, y cromatografía de afinidad. La muestra digerida, y opcionalmente separada, entonces se ioniza utilizando una fuente de iones para crear moléculas cargadas para un análisis adicional. La ionización de la muestra se puede realizar, por ejemplo, por ionización por electropulverización (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización, ionización de electrones, bombardeo rápido de átomos (FAB)/ionización secundaria de líquido (LSIMS), desorción/ionización de láser asistida por matriz (MALDI), ionización de campo, desorción de campo, ionización por termopulverización/plasma-pulverización, e ionización de haz de partículas. La información adicional con relación a la elección del método de ionización se conoce por aquellos expertos en la técnica.

Después de la ionización, los péptidos digeridos entonces se pueden fragmentar para generar espectros de MS/MS característicos. MS en tándem, también conocido como MS/MS, puede ser en particular útil para analizar mezclas complejas. MS en tándem implica múltiples pasos de selección de MS, con alguna forma de fragmentación de iones que se presenta entre los pasos, que se puede lograr con elementos de espectrómetro de masas individuales separados en el espacio o utilizando un espectrómetro de masas individual con los pasos de MS separados en el tiempo. En MS en tándem separada espacialmente, los elementos se separan físicamente y son distintos, con una conexión física entre los elementos para mantener un alto vacío. En MS en tándem separada temporalmente, la separación se logra con iones atrapados en el mismo lugar, con múltiples pasos de separación que tienen lugar con el paso del tiempo. Los espectros de MS/MS característicos entonces se pueden comparar con una base de datos de secuencias de péptidos (por ejemplo, SEQUEST). Las modificaciones postraduccionales a péptidos también se pueden determinar, por ejemplo, al buscar espectros contra una base de datos en tanto que se permiten modificaciones de péptidos específicas.

Composiciones Farmacéuticas

Las construcciones de ARN de interferencia, así como los vectores y composiciones que codifican para, o que contienen estas construcciones, se pueden incorporar en un vehículo para administración en un paciente, tal como un paciente humano que padece de dominancia de ARN, como se describe en la presente. Las composiciones farmacéuticas que contienen vectores, tal como vectores virales, que codifican para una construcción de ARN de interferencia descrita en la presente se pueden preparar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, estas composiciones se pueden preparar utilizando, por ejemplo, portadores, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables (Remington 's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980); incorporada en la presente como referencia), y en una forma deseada, por ejemplo, en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

Las mezclas de los ácidos nucleicos y vectores virales descritos en la presente se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con uno o más excipientes, portadores, o diluyentes. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservador para impedir el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen dispersiones o soluciones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles (descritas en US 5,466,468, la descripción de la cual se incorpora en la presente como referencia). En cualquier caso, la formulación puede ser estéril y puede ser fluida en la medida en que exista una fácil capacidad de manejo en jeringa. Las formulaciones pueden ser estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y se pueden conservar contra la acción contaminante de microorganismos, tal como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de agentes tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede provocar por diversos agentes antimicrobianos y antimicóticos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede provocar por el uso en las

composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Por ejemplo, una solución que contiene una composición farmacéutica descrita en la presente se puede amortiguar adecuadamente, si es necesario, y el diluyente líquido primero se vuelve isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son en especial adecuadas para administración intravenosa, intratecal, intracerebroventricular, intraparenquimatosa, intracisternal, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Con respecto a esto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos por aquellos expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación se puede disolver en 1 ml de solución de NaCl isotónico y ya sea se puede adicionar a 1000 ml de fluido de hipodermoclisis o inyectar en el sitio de infusión propuesto. Alguna variación en la dosificación necesariamente se presentará dependiendo de la condición del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para la administración en seres humanos, las preparaciones pueden cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general, y pureza como se requiere por los estándares de la Oficina de Biología de FDA.

Rutas de administración y dosificación

Los vectores virales, tal como vectores de AAV y otros descritos en la presente, que contienen un transgén que codifica para una construcción de ARN de interferencia descrita en la presente se pueden administrar a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) por una variedad de rutas de administración. La ruta de administración puede variar, por ejemplo, con el inicio y gravedad de la enfermedad, y puede incluir, por ejemplo, administración intravenosa, intratecal, intracerebroventricular, intraparenquimatosa, intracisternal, intradérmica, transdérmica, parenteral, intramuscular, intranasal, subcutánea, percutánea, intratraqueal, intraperitoneal, intraarterial, intravascular, inhalación, perfusión, lavado, y oral. La administración intravascular incluye la administración en la vasculatura de un paciente. En algunas modalidades, la administración es en un vaso considerado que es una vena (intravenosa), y en algunas administración, la administración es en un vaso considerado que es una arteria (intraarterial). Las venas incluyen, pero no se limitan a, la vena yugular interna, una vena periférica, una vena coronaria, una vena hepática, la vena porta, vena safena grande, la vena pulmonar, vena cava superior, vena cava inferior, una vena gástrica, una vena esplénica, vena mesentérica inferior, vena mesentérica superior, vena cefálica, y/o vena femoral. Las arterias incluyen, pero no se limitan a, arteria coronaria, arteria pulmonar, arteria braquial, arteria carótida interna, arco aórtico, arteria femoral, arteria periférica, y/o arteria

ciliar. Se contempla que la administración puede ser a través de, o hacia una arteriola o capilar.

Los regímenes de tratamiento pueden variar, y a menudo dependen de la gravedad de la enfermedad y la edad, peso, y del sexo del paciente. El tratamiento puede incluir la administración de vectores (por ejemplo, vectores virales) u otros agentes descritos en la presente como útiles para la introducción de un transgén en una célula diana en diversas dosis unitarias. Cada dosis unitaria contendrá normalmente una cantidad predeterminada de la composición terapéutica.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a aquellos expertos en la técnica con una descripción de cómo se pueden utilizar, producir, y evaluar las composiciones y métodos descritos en la presente, y se propone que sean puramente de ejemplo de la invención y no se propone que limiten el alcance de lo que los inventores consideran como su invención.

Ejemplo 1. Desarrollo y evaluación de vectores virales adenoasociados que codifican para construcciones de miARN para el tratamiento de trastornos asociados con la dominancia de ARN

Objetivo

Este ejemplo describe una serie de experimentos realizados a fin de caracterizar el desarrollo y la evaluación de vectores de rAAV que codifican para construcciones de miARN contra DMPK humana y HSA^{LR} murina, que se expresa en modelos de ratón del trastorno de dominancia de ARN, distrofia miotónica. La distrofia miotónica (DM) se provoca por la expansión de una repetición de microsatélite que conduce a la expresión de un ARNm de repetición expandido tóxico. Otro trastorno de dominancia de ARN, la distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD), se provoca por la contracción de una repetición de macrosatélite de D4Z4 que conduce a la expresión de DUX4, una proteína tóxica en el músculo adulto. El objetivo de los experimentos descritos en este ejemplo es desarrollar vectores de AAV que codifican para construcciones de miARN que se dirigen a DM muscular y ARNm relacionados con FSHD, a fin de impedir la disfunción muscular y la pérdida en individuos con enfermedad.

Materiales y Métodos

Para desarrollar la terapia de ARNi de rAAV para la distrofia miotónica tipo 1 (DM1), se diseñó y produjo una horquilla de ARN de interferencia dirigida por gen de actina esquelética humana (HSA) tal que su eficacia se pueda probar en el modelo de ratón de HSA^{LR} de DM1. El ratón de HSA^{LR} se produjo con la inserción de una repetición de CTG expandido

en la UTR 3' del gen de HSA, un contexto genético similar a la expansión de repetición que provoca la enfermedad en el gen de DMPK en seres humanos. El ratón de HSA^{LR} muestra muchos de los cambios genéticos y fenotípicos asociados con DM1 en el músculo esquelético, que incluyen miotonía, cambios de empalme en una variedad de ARNm, e inclusiones nucleares (focos). Entre los objetivos de este estudio estaba traducir el enfoque de reducir la expresión de transcritos de ARN de HSA^{LR} aberrantes que contienen regiones de repetición de CUG expandida para desarrollar un paradigma para suprimir el gen diana de enfermedad humana, DMPK.

Para este fin, se probaron casetes de expresión de ARNi con secuencias de reconocimiento de diana de 19-22 pb para una variedad de aplicaciones. Las horquillas de ARNi eran con base en la secuencia endógena de miR30a. Los genomas de rAAV de hebra individual se empaquetaron en una cápside de rAAV6 para dirigirse al músculo. Las construcciones de ARNi de HSA de rAAV6 se administraron por inyección intravenosa (IV) anteriormente en la vena de cola de ratones de HSA^{LR} a las 4 semanas de edad (n=7-9).

Resultados

Como se muestra en las figuras 2A - 2C, se desarrollaron tres generaciones de vectores de rAAV-ARNi para dirigirse a varios genes para la prueba y el desarrollo de ARNi terapéutico. El plásmido de rAAV pARAP4 incluye el gen indicador de fosfatasa alcalina humana (Hu Aik Phos), expresado a partir del promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV), y la secuencia de poliadenilación de SV40, pA. Las repeticiones terminales invertidas (ITR) se originan de rAAV2 y los genomas se empaquetan en cápsides de rAAV6. La modificación más nueva de vector remueve la secuencia de promotor de RSV para impedir la expresión de Hu Aik Phos que limitó la eficacia de rAAV-ARNi a dosis más altas debido a la toxicidad de células musculares.

Como se muestra en las figuras 3A - 3C, los ratones de HSA^{LR} muestran características de distrofia muscular que se parecen a DM en seres humanos. El transgén de HSA^{LR} se deriva de la inserción de una repetición de (CTG)₂₅₀ en la UTR 3' del gen de HSA. Cuando el transgén se expresa en el músculo esquelético de ratón, las descargas miotónicas son evidentes, se presentan alteraciones de empalme en una variedad de ARNm, y focos nucleares que contienen el ARNm transgénico expandido y los factores de empalme están presentes.

Como se muestra en la figura 4, los ratones de HSA^{LR} se transdujeron con DM10 de miR de HSA de rAAV6. La tinción con fosfatasa placentaria humana (AP) indica la presencia del genoma viral con expresión génica indicadora activa, y también se muestra la

tinción de hematoxilina–eosina de criosecciones de ratones tratados. Punto de tiempo, 8 semanas después de la inyección, ratones de HSA^{LR} de 4 semanas de edad.

Como se muestra en las figuras 5A y 5B, las figuras 6A - 6E y las figuras 7A - 7C, los vectores de rAAV-RNAi que codifican para construcciones de miARN complementarias a las transcripciones de HSA^{LR} redujeron la expresión de ARN de HSA^{LR} patológica y efectuaron la liberación de factores de empalme de unión a ARN que de otra manera se secuestrarían por la expansión de repetición de CUG, como se evidencia por la restauración del empalme correcto de ARNm de SERCA1 (figuras 6C y 6D). Inyección sistémica de DM10 de miR de HSA de rAAV6 mejora el empalme de SERCA1 y CLCN1 en el músculo tibialis anterior (TA). En contraste, una horquilla de ARNi diferente, miR DM4, no era tan efectiva para revertir estos defectos de empalme.

Selección de regiones de DMPK para ARNi

La selección de secuencias diana de ARN de DMPK para la incorporación en horquillas basadas en miARN se realizó utilizando directrices para el diseño de ARNip. Las secuencias diana candidatas se eliminaron con base en las coincidencias de secuencia de semillas previstas en otros locus o en regiones empalmadas alternativamente. La evaluación adicional incluyó análisis que utiliza análisis mariposa para la alineación de secuencia corta al genoma humano y búsquedas extensas de BLAST. Las construcciones de ARN de interferencia de ejemplo contra DMPK humana se muestran en la tabla 4, anterior, y se representan gráficamente en la figura 1.

Conclusiones

Como se demuestra en estos experimentos, la inyección local de vectores que carecen del promotor de Hu Aik Phos en el músculo mejora el fenotipo relacionado con empalme de los ratones de HSA^{LR}, como se mide por el aumento en la cantidad de producto de empalme de adulto de ARNm de SERCA1. El empalme para ARNm de SERCA1 se corrigió aproximadamente 95% y demuestra que las mejoras en la tecnología tienen el potencial de aumentar la eficacia de este enfoque.

Además, estos resultados demuestran que la administración mediada por rAAV6 de las horquillas de HSA mejora muchas características moleculares y fenotípicas de DM1 modeladas en el ratón de HSA^{LR}, que incluyen miotonía, cambios de empalme relacionados con la enfermedad, y secuestro de factores de empalme. Además, utilizando las composiciones y métodos descritos en la presente, vectores que portan miARN de DMPK expresados por U6 pueden reducir el ARNm de DMPK endógeno en células HEK293 después de la transfección. Estos datos indican la utilidad para una terapia génica mediada por ARNi para tratar DM1.

La terapia mediada por rAAV es efectiva para la atrofia muscular espinal y está progresando en ensayos clínicos para la distrofia muscular de Duchenne. Los estudios en primates no humanos demuestran que el AAV puede transducir el músculo de manera eficiente con la administración extremidades regional de y persistir tanto tiempo como 10 años. Estos estudios apoyan el desarrollo de terapia génica de ARNi mediada por rAAV para el tratamiento de enfermedades musculares dominantes en seres humanos, tal como distrofia miotónica tipo I, entre otros descritos en la presente.

Ejemplo 2. Tratamiento de la distrofia miotónica en un paciente humano por la administración de un vector viral que codifica para un miARN contra DMPK

Al utilizar las composiciones y métodos descritos en la presente, un facultativo experto en la técnica puede administrar, a un paciente que tiene distrofia miotónica tipo I, un vector viral que codifica para un miARN que se fija a, y reduce la expresión de, transcritos de ARN de DMPK mutantes que contienen regiones de repetición de CUG expandida. El vector puede ser un vector de AAV, tal como un vector de AAV2/8 o AAV2/9 pseudotipado. El vector se puede administrar por medio de una o más rutas de administración descritas en la presente, tal como por inyección intravenosa, intratecal, intracerebroventricular, intraparenquimatosa, intracisternal, intramuscular o subcutánea. El miARN codificado puede ser un miARN caracterizado en la presente, tal como un miARN que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de cualquiera de SEQ ID No: 40-161.

Después de la administración del vector, el médico puede monitorear la progresión del trastorno y la eficacia del tratamiento al evaluar, por ejemplo, la concentración de transcritos de ARNm empalmados correctamente que codifican para SERCA1, CLCN1 y/o ZASP, utilizando una técnica de detección de ARN descrita en la presente. El médico también puede monitorear la concentración de SERCA1 funcional, CLCN1, y/o producto de proteína ZASP que resulta de los transcritos empalmados correctamente. De manera adicional o alternativamente, el facultativo puede monitorear la concentración de transcritos de ARN de DMPK mutantes expresados por el paciente, en particular, transcritos de DMPK que tienen de aproximadamente 50 a aproximadamente 4,000, o más, repeticiones de trinucleótidos CUG. Un hallazgo de que (i) la concentración de transcritos de ARNm de SERCA1, CLCN1, y/o ZASP empalmados correctamente ha aumentado, (ii) la concentración de productos de proteína de SERCA1, CLCN1, y/o ZASP funcionales que resultan de la traducción de transcritos de ARNm empalmados correctamente ha aumentado, y/o (iii) la concentración de transcritos de ARN de DMPK mutantes que albergan regiones de repetición de trinucleótidos CUG expandida ha disminuido puede servir como un indicador de que el paciente se ha tratado con éxito. El facultativo también puede monitorear la progresión de uno o más

síntomas de la enfermedad, tal como miotonía, rigidez muscular, debilidad distal incapacitante, debilidad en los músculos de la cara y mandíbula, dificultad para tragar, caída de los párpados (ptosis), debilidad de los músculos del cuello, debilidad en los músculos del brazo y la pierna, dolor muscular persistente, hipersomnia, distrofia muscular, disfagia, insuficiencia respiratoria, latidos irregulares, daño muscular cardíaco, apatía, resistencia a la insulina, y cataratas. En los niños, los síntomas también pueden incluir retardos en el desarrollo, problemas de aprendizaje, dificultades de lenguaje y habla, y desafíos de desarrollo de personalidad. Un hallazgo de que uno o más, o todos, de los síntomas anteriores se han mejorado también puede servir como un indicador clínico de tratamiento exitoso.

Ejemplo 3. Tratamiento de la distrofia miotónica en un paciente humano por la administración de un oligonucleótido de ARNip contra DMPK

Al utilizar las composiciones y métodos descritos en la presente, un facultativo experto en la técnica puede administrar, a un paciente que tiene distrofia miotónica tipo I, un oligonucleótido de ARNip que se fija a, y reduce la expresión de, transcritos de ARN de DMPK mutantes que contienen regiones de repetición de CUG expandida. El oligonucleótido puede tener, por ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos de cualquiera de SEQ ID NO: 3-39.

Después de la administración del oligonucleótido, el médico puede monitorear la progresión del trastorno y la eficacia del tratamiento al evaluar, por ejemplo, la concentración de transcritos de ARNm empalmados correctamente que codifican para SERCA1, CLCN1 y/o ZASP, utilizando una técnica de detección de ARN descrita en la presente. El médico también puede monitorear la concentración de SERCA1 funcional, CLCN1, y/o producto de proteína ZASP que resulta de los transcritos empalmados correctamente. De manera adicional o alternativamente, el facultativo puede monitorear la concentración de transcritos de ARN de DMPK mutantes expresados por el paciente, en particular, transcritos de DMPK que tienen de aproximadamente 50 a aproximadamente 4,000, o más, repeticiones de trinucleótidos CUG.

Un hallazgo de que (i) la concentración de transcritos de ARNm de SERCA1, CLCN1, y/o ZASP empalmados correctamente ha aumentado, (ii) la concentración de productos de proteína de SERCA1, CLCN1, y/o ZASP funcionales que resultan de la traducción de transcritos de ARNm empalmados correctamente ha aumentado, y/o (iii) la concentración de transcritos de ARN de DMPK mutantes que albergan regiones de repetición de trinucleótidos CUG expandida ha disminuido puede servir como un indicador de que el paciente se ha tratado con éxito. El facultativo también puede monitorear la progresión de uno o más síntomas de la enfermedad, tal como miotonía, rigidez muscular, debilidad distal

incapacitante, debilidad en los músculos de la cara y mandíbula, dificultad para tragar, caída de los párpados (ptosis), debilidad de los músculos del cuello, debilidad en los músculos del brazo y la pierna, dolor muscular persistente, hipersomnia, distrofia muscular, disfagia, insuficiencia respiratoria, latidos irregulares, daño muscular cardíaco, apatía, resistencia a la insulina, y cataratas. En los niños, los síntomas también pueden incluir retardos en el desarrollo, problemas de aprendizaje, dificultades de lenguaje y habla, y desafíos de desarrollo de personalidad. Un hallazgo de que uno o más, o todos, de los síntomas anteriores se han mejorado también puede servir como un indicador clínico de tratamiento exitoso.

Ejemplo 4. Capacidad de las moléculas de ARNip anti-DMPK para suprimir la expresión de DMPK1 en células HEK293 cultivadas

Este ejemplo describe los resultados de experimentos realizados a fin de evaluar la capacidad de moléculas de ARNip anti-DMPK, tal como varias moléculas de ARNip descritas en la tabla 4 en la presente, para atenuar la expresión de ARNm de DMPK1 en células humanas cultivadas. Con propósitos de comparación, además de probar moléculas de ARNip descritas en la tabla 4, anteriormente, también se probaron una molécula de ARNip desordenada y moléculas de ARNip anti-DMPK disponibles comercialmente.

Para llevar a cabo estos experimentos, se transfectaron células HEK293 (2×10^5 células/concavidad) por triplicado con 5 pM de una molécula de ARNip anti-DMPK candidata (tal como una molécula de ARNip descrita en la tabla 4, anterior) o control de ARNip negativo desordenado 5 pM (ARNip Silencer^{MR} Select, Ambion por Life Technologies) utilizando 1 μ L Lipofectamine^{MR} RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific). Se incluyeron transfecciones simuladas de células tratadas sólo con Lipofectamine^{MR} RNAiMAX 1 μ L para la normalización. El ARN se recolectó después de 48 horas utilizando el Mini Kit RNeasy Plus (Qiagen). El ADNc generado se generó posteriormente utilizando la transcriptasa inversa SuperScript^{MR} III (Thermo Fisher Scientific) utilizando 150 ng de ARN por muestra. qPCR se realizó para detectar la reducción de DMPK1. Los experimentos de qPCR se establecieron por triplicado utilizando la Mezcla Maestra TaqMan^{MR} Fast Advanced y las reacciones se realizaron utilizando un instrumento de RT-PCR QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific). Los valores de expresión de DMPK1 se normalizaron a GAPDH (ID del ensayo de expresión génica TaqMan^{MR} Hs02786624_g1) utilizando el software QuantStudio 3.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 9. Como se evidencia por esta figura, varias moléculas de ARNip descritas en la tabla 4, anteriormente, son capaces de reducir en la expresión la expresión de DMPK1 en células humanas vivas. Los datos mostrados gráficamente en la figura 9 se proporcionan en forma numérica en la tabla 6, a continuación.

Tabla 6. Supresión de la expresión de DMPK1 en células HEK293 por moléculas de ARNip en la figura 9

Molécula de ARNip	Expresión de DMPK1 normalizada
SEQ ID NO: 19	36.535%
SEQ ID NO: 6	45.575%
SEQ ID NO: 20	45.748%
Anti-DMPK n351357	51.946%
SEQ ID NO: 5	60.258%
Anti-DMPK HSS1028253	60.498%
SEQ ID NO: 4	60.926%
Anti-DMPK HSS176211	63.934%
SEQ ID NO: 10	64.104%
Molécula de ARNip	Expresión de DMPK1 normalizada
SEQ ID NO: 16	66.067%
SEQ ID NO: 23	68.659%
SEQ ID NO: 24	79.758%
SEQ ID NO: 7	80.929%
SEQ ID NO: 22	84.449%
SEQ ID NO: 21	85.495%
Anti-DMPK n351358	86.927%
Anti-DMPK s4165	93.519%
SEQ ID NO: 18	97.217%
SEQ ID NO: 17	122.154%

Otras modalidades

Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación incorporadas en la presente como referencia al mismo grado que si cada publicación independiente o solicitud de patente se indicara de manera específica e individualmente para que se incorpore como referencia.

En tanto que la invención se ha descrito con relación a modalidades específicas de la misma, se entenderá que es capaz de modificaciones adicionales y se propone que esta

solicitud cubra cualquier variación, uso, o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo estas desviaciones de la invención que vienen dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y se pueden aplicar a las características esenciales expuestas anteriormente en la presente, y sigue en el alcance de las reivindicaciones. Otras modalidades están dentro de las reivindicaciones.