

COMPOSICIONES PARA LA REDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN TRANSGÉNICA ESPECÍFICA DE DRG

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La plataforma de vector de elección para el tratamiento génico *in vivo* se basa en virus adenoasociados (AAV) derivados de primates. En los sesenta, los productos de tratamiento génico derivaron de AAV aislados de preparaciones de adenovirus (Hoggan, M.D. *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 55:1467-1474, 1966). Aunque estos vectores eran seguros, muchos programas no tuvieron éxito en la clínica debido a una transducción deficiente. A finales de siglo, los investigadores descubrieron una familia de AAV endógenos que, como vectores, lograban eficiencias de transducción mucho más altas a la vez que retenían perfiles de seguridad favorables (Gao, G., *et al.* J Virol 78:6381-6388, 2004).

Las respuestas inadecuadas del huésped a vectores de AAV fueron mínimas. En contraste con vectores no virales y adenovirales, que generan respuestas inflamatorias agudas vibrantes (Raper, S.E., *et al.* Mol Genet Metab 80:148-158, 2003; Zhang, Y., *et al.* Mol Ther 3:697-707, 2001), los vectores de AAV no son proinflamatorios. Las respuestas inmunitarias adaptativas destructivas a células transducidas por vectores, tales como linfocitos T citotóxicos, han sido mínimas tras la administración de vectores de AAV. Existe evidencia en animales y seres humanos de que AAV puede inducir tolerancia a productos transgénicos o de la cápside en ciertas circunstancias según el serotipo, la dosis, la vía de administración y el régimen de inmunosupresión (Gernoux, G., *et al.* Hum Gene Ther 28:338-349, 2017; Mays, L.E. y Wilson, J.M. Mol Ther 19:16-27, 2011; Manno, C.S., *et al.* Nat Med 12:342-347, 2006; Mingozzi, F., *et al.* Blood 110:2334-2341, 2007). Sin embargo, dada la actual expansión de aplicaciones clínicas de tratamiento génico con AAV, se empiezan a ver toxicidades que pueden limitar el impacto clínico de esta tecnología.

Las toxicidades más graves ocurrieron tras la administración intravenosa de dosis altas de AAV para dirigirse al SNC y sistema musculoesquelético. Los estudios en primates no humanos (NHP) mostraron el desarrollo agudo de trombocitopenia y transaminitis que, en algunos casos, evolucionan a un síndrome fatal de hemorragia y choque (Hordeaux, J., *et al.* Mol Ther 26:664-668, 2018; Hinderer, C., *et al.* Hum Gene Ther. 29(3):285-298, 2018). También se observaron aumento agudos de las enzimas hepáticas y/o reducciones de plaquetas en la mayoría de los ensayos clínicos de AAV a dosis alta (AveXis, I.

ZOLGENSMA Prescribing Information, 2019; Solid Biosciences Provides SGT-001 Program Update, 2019; Pfizer, Pfizer Presents Initial Clinical Data on Phase 1b Gene Therapy Study for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), 2019; Flanigan, K.T. *et al.* *Molecular Genetics and Metabolism* 126:S54, 2019). Aunque no fueron frecuentes, las toxicidades graves se caracterizaron por anemia, insuficiencia renal y activación del complemento (Solid Biosciences, 2019; Pfizer, 2019).

Más recientemente, se observó el problema de las neuronas degenerativas en los ganglios de la raíz dorsal (DRG) de NHP y cerdos que fueron administrados con vector de AAV ya sea en el líquido cefalorraquídeo (CSF) o a dosis altas en la sangre (Hinderer, C., *et al.* *Hum Gene Ther.* 29(3):285-298, 2018; Hordeaux, J., *et al.* *Mol Ther Methods Clin Dev* 10:68-78, 2018; Hordeaux, J., *et al.* *Mol Ther Methods Clin Dev* 10:79-88, 2018). Esta toxicidad neuronal está asociada con la degeneración de los axones periféricos en los nervios periféricos y los axones centrales que ascienden por las columnas dorsales de la médula espinal.

Existe una necesidad en la técnica de composiciones y métodos para un tratamiento génico que minimice la expresión de un producto génico en células que son más sensibles a la toxicidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En ciertas formas de realización, se proporcionan composiciones y métodos que reprimen la expresión transgénica en neuronas de DRG. Ventajosamente, estas composiciones disminuyen la degeneración neuronal y/o disminuyen la degeneración axonal de la médula espinal dorsal secundaria que pueden ser generadas por la sobreexpresión y/o toxicidad mediada por el sistema inmunitario tras la administración intratecal o sistémica de tratamiento génico.

En ciertas formas de realización, se proporciona una composición para la administración génica que reprime específicamente la expresión de un producto génico en el ganglio de la raíz dorsal (DRG) que comprende un casete de expresión. En ciertas formas de realización, los casetes de expresión son una secuencia de ácidos nucleicos que comprende: (a) una secuencia codificante de un producto génico bajo el control de secuencias reguladoras que dirigen la expresión del producto génico en una célula que contiene el casete de expresión; y (b) al menos una secuencia diana específica para al menos uno de miR-183, miR-182 o miR-96, en donde la al menos una secuencia diana está ligada operativamente al extremo 3' de la secuencia codificante (a). En ciertas

formas de realización, el casete de expresión es transportado por un vector no viral, un vector viral o un sistema de administración no basado en vector. En ciertas formas de realización, la composición comprende al menos dos repeticiones en tándem de las secuencias de direccionamiento que comprenden al menos una primera secuencia diana de miARN y al menos una segunda secuencia diana de miARN que pueden ser iguales o diferentes. En ciertas formas de realización, el casete de expresión comprende al menos dos repeticiones en tándem de miARN que se ubican en la UTR 3'. En ciertas formas de realización, el casete de expresión comprende una UTR 3' que tiene tres repeticiones en tándem de miARN. En ciertas formas de realización, las al menos dos secuencias diana de miARN específicas de DRG se ubican tanto en la UTR 5' como en la UTR 3'. En ciertas formas de realización, el casete de expresión es transportado por un vector viral seleccionado de un parvovirus recombinante, un lentivirus recombinante, un retrovirus recombinante o un adenovirus recombinante. En ciertas formas de realización, el casete de expresión es transportado por un vector o sistema de administración no viral seleccionado de ADN desnudo, ARN desnudo, una partícula inorgánica, una partícula lipídica, un vector a base de polímero o una formulación a base de quitosano.

En ciertas formas de realización, se proporciona una composición que comprende un casete de expresión, en donde el inicio de la primera de las al menos dos repeticiones en tándem de miARN se encuentra dentro de 20 nucleótidos del extremo 3' de la secuencia codificante génica. En ciertas formas de realización, la composición comprende un casete de expresión, en donde el inicio de la primera de las al menos dos repeticiones en tándem de miARN es de al menos 100 nucleótidos del extremo 3' de la secuencia codificante génica. En ciertas formas de realización, se proporciona una composición que comprende un casete de expresión, en donde la UTR 3' y las repeticiones en tándem de miARN comprenden de 200 a 1200 nucleótidos de longitud. En ciertas formas de realización, el casete de expresión comprende cuatro secuencias diana de miARN ubicadas en la UTR 3'. En ciertas formas de realización, se proporciona una composición, en donde el casete de expresión comprende además al menos una secuencia diana específica para miR-183, miR-182 o miR-96 en la UTR 5'. En ciertas formas de realización, el casete de expresión comprende al menos dos secuencias diana de miARN ubicadas en la UTR 5' y la UTR 3'. En ciertas formas de realización, el casete de expresión comprende al menos una secuencia diana específica para miR-183, miR-182 o miR-96 en la UTR 5'. En ciertas formas de realización, el casete de expresión comprende al menos dos secuencias diana de miARN ubicadas en la UTR 5' y la UTR 3'.

En ciertas formas de realización, se proporciona una composición que comprende un

casete de expresión, en donde dos o más secuencias diana de miARN consecutivas son continuas y no están separadas por un espaciador. En ciertas formas de realización, dos o más de las secuencias diana de miARN están separadas por un espaciador, y cada espaciador es diferente. En ciertas formas de realización, el espaciador ubicado entre las secuencias diana de miARN se ubica 3' con respecto a la primera secuencia diana de miARN y/o 5' con respecto a la última secuencia diana de miARN. En ciertas formas de realización, los espaciadores entre las secuencias diana de miARN son iguales.

En ciertas formas de realización, se proporciona un AAV recombinante (rAAV) para la administración de un producto génico a un paciente que lo necesite que reprime específicamente la expresión de un producto génico en DRG, en donde el rAAV comprende una cápside viral que tiene empaquetado en su interior un genoma del vector de AAV, en donde el genoma del vector comprende: (a) una secuencia codificante para el producto génico bajo el control de secuencias reguladoras que dirigen la expresión del producto génico en una célula que contiene el genoma del vector; y (b) al menos una secuencia diana de miARN específica para al menos uno de miR-183, miR-182 o miR-96.

En ciertas formas de realización, la composición comprende el casete de expresión o el rAAV y un amortiguador de formulación adecuada para la administración mediante inyección intracerebroventricular (ICV), intratecal (IT), intracisternal o intravenosa (IV).

En ciertas formas de realización, se proporciona un método para reprimir la expresión transgénica en neuronas de DRG. El método comprende administrar una composición que contiene el casete de expresión y/o el rAAV a un paciente. En ciertas formas de realización, el método permite una dosis o duración del tratamiento inmunosupresor reducida en comparación con un tratamiento génico sin las repeticiones en tándem de miARN.

En ciertas formas de realización, se proporciona un método para modular la degeneración neuronal y/o disminuir la degeneración axonal de la médula espinal dorsal secundaria tras la administración intratecal o sistémica de tratamiento génico. El método comprende administrar una composición que contiene el casete de expresión y/o el rAAV a un paciente. En ciertas formas de realización, el método permite una dosis o duración del tratamiento inmunosupresor reducida en comparación con un tratamiento génico sin las repeticiones en tándem de miARN.

En ciertas formas de realización, se proporciona un método para mejorar la expresión de un transgén en células del sistema nervioso central (SNC) tras la administración intratecal o sistémica de tratamiento génico. El método comprende administrar una composición

que contiene el casete de expresión y/o el rAAV a un paciente. En ciertas formas de realización, el casete de expresión o genoma del vector de rAAV comprende al menos una secuencia diana de miR183. En ciertas formas de realización, la expresión transgénica se mejora en células del SNC, que incluyen una o más de neuronas piramidales, neuronas de Purkinje, células granulosas, neuronas del huso, células interneuronales, astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células endoteliales.

Otros aspectos y ventajas de la invención serán fácilmente evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1A – Figura 1C muestran toxicidad y axonopatía secundaria de DRG después de la administración ICM de AAV. (Figura 1A). Los DRG contienen los cuerpos celulares de neuronas pseudounipolares sensoriales, que transmiten mensajes sensoriales desde la periferia del SNC a través de axones periféricos ubicados en nervios periféricos y axones centrales ubicados en los tractos dorsales de sustancia blanca ascendente de la médula espinal. (Figura 1B). Axonopatía y degeneración neuronal de DRG. La axonopatía (arriba a la izquierda) se manifiesta como vacuolas claras que están vacías (axón faltante) o llenas con macrófagos que digieren mielina y residuos celulares (flecha). Las lesiones en el DRG (arriba a la derecha y abajo a la izquierda) consisten en degeneración neuronal de cuerpos celulares (flecha) con infiltración de células mononucleares (círculo). Un citoplasma eosinofílico (rosa) debido a la disolución de los cuerpos de Nissl (cromatolisis central) caracteriza a las neuronas degenerativas. La mayor celularidad se debe a la proliferación de células satélite (satelitosis) e infiltrados celulares inflamatorios. Algunos infiltrados celulares mononucleares fagocitan el cuerpo celular neuronal (neuronofagia). La imagen abajo a la derecha muestra inmunotinción del transgén codificado por AAV (GFP en este caso). Las neuronas que muestran cambios degenerativos e infiltrados celulares mononucleares son las que muestran la expresión de proteína más fuerte (evidenciada por la tinción con marrón oscuro en IHC). (Figura 1C). Ejemplos de lesión en DRG de grado 1 a grado 5 y axonopatía de la médula espinal dorsal de grado 1 a grado 4. Los grados de gravedad se definen de la siguiente manera: 1 mínima (<10 %), 2 leve (10-25 %), 3 moderada (25-50 %), 4 marcada (50-95 %) y 5 grave (>95 %). El grado 5 no se observó nunca en la médula espinal. Las flechas y los círculos delinean la degeneración neuronal con infiltrados celulares mononucleares en DRG (columna izquierda) y axonopatía (columna derecha).

La Figura 2A – Figura 2B muestran un modelo de toxicidad relacionada con la sobreexpresión y una estrategia de mitigación mediante el uso de silenciamiento inducido por miARN. (Figura 2A). Los cuerpos celulares de neuronas pseudounipolares sensoriales se ubican dentro del DRG, rodeados por células satélite y capilares fenestrados. El axón periférico de neuronas pseudounipolares sensoriales se ubica en nervios periféricos y el axón central se ubica en los tractos dorsales de la médula espinal. Los vectores de AAV secuestran y sobrecargan la transcripción y la maquinaria de síntesis de proteína, lo que produce el estrés de ER y falla secundaria para mantener los axones distales. Las células satélite se someten a proliferación reactiva y segregan citocinas, lo que atrae células inflamatorias, tales como linfocitos. Esos cambios reversibles pueden culminar en la muerte celular. Posteriormente, las células gliales y los macrófagos se infiltran y fagocitan los cuerpos celulares neuronales. (Figura 2B). Un diseño de casete de expresión de AAV de ejemplo para el silenciamiento específico de DRG. Cuatro repeticiones en tándem cortas de una secuencia inversa-complementaria de miARN (dianas o secuencias diana de miR) se introducen entre el codón de detención y la poli-A. En neuronas de DRG, miARN, tal como miARN 183, se fija a la región no traducida 3' del mRNA y recluta el complejo silenciador inducido por ARN (RISC), el cual a su vez produce el silenciamiento a través de escisión de mRNA. En otros tipos de células que no expresan miARN 183, la traducción y la síntesis de proteína se producen sin ningún impacto de la región UTR 3'.

La Figura 3A – Figura 3D muestran que las dianas de miR183 silencian específicamente la expresión transgénica *in vitro* y en neuronas de DRG de ratones. (Figura 3A). Se cotransfectaron de manera transitoria 293 células con plásmidos de AAV que expresan GFP que albergan dianas de miR183 o miR145 y vector de control o de expresión de miR183. Se detectaron niveles de proteína GFP 72 horas después de la transfección y los niveles se cuantificaron con transferencia Western. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Las barras de error indican la desviación estándar. (Figura 3B). Ratones C57BL6/J se inyectaron IV con vector de control AAV9.CB7.GFP o vectores AAV9.CB7.GFP-miR a una dosis de 4×10^{12} gc. Se cribaron tres miR enriquecidas en DRG: miR183, miR145 y miR182. Se recolectaron DRG dos semanas después de la inyección y se tiñeron para determinar la GFP mediante el uso de IHC. Mediante el uso de la herramienta de recuento celular ImageJ, se contó el porcentaje de neuronas que expresan GFP sobre las neuronas de DRG totales. Prueba de Wilcoxon, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (Figura 3C). Aquí se muestran imágenes representativas de inmunotinciones de GFP de los DRG cuantificadas en el panel en la Figura 3B. (Figura

3D). Ratones C57BL6/J se inyectaron IV con vector de control AAV-PHP.B.CB7.GFP o AAV-PHP.B.CB7.GFP-miR (miR183, miR145, miR182). Se recolectaron el SNC e hígado tres semanas después de la inyección para observar directamente la GFP mediante el uso de microscopía fluorescente. Aquí se muestran imágenes representativas de cerebelo, corteza e hígado.

La Figura 4A – Figura 4C muestran dianas de miR183 que silencian específicamente la expresión de GFP en DRG y disminuyen la toxicidad después de la administración ICM de AAVhu68.GFP a NHP. Los *Macaca mulatta* adultos recibieron una inyección ICM con $3,5 \times 10^{13}$ GC de vector de control AAVhu68.CB7.GFP (n=2) o AAVhu68.CB7.GFP-miR183 (n=4). La mitad de los animales se sometieron a eutanasia dos semanas después de la inyección para el análisis de la expresión de GFP y la otra mitad se sometió a eutanasia dos meses después de la inyección para determinar la expresión e histopatología de GFP. (Figura 4A). Imágenes representativas de secciones inmunoteñidas con GFP de DRG, neuronas motoras de la médula espinal, cerebelo, corteza, corazón e hígado dos semanas después de la administración de vector. (Figura 4B). Cuantificación de células positivas en GFP en DRG (neuronas sensoriales), médula espinal (neuronas motoras inferiores), cerebelo y corteza en NHP (n=2 AAV.GFP, n=4 AAV.GFP-miR183). Se cuantificó un mínimo de cinco campos de magnificación 20x por región por animal mediante el uso de la herramienta de recuento celular ImageJ. Las barras de error indican la desviación estándar. Prueba de Wilcoxon, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (Figura 4C). La histopatología dos meses después de la inyección muestra los grados de gravedad de axonopatía de la médula espinal dorsal, axonopatía de nervios periféricos (nervios medianos, peroneos y radiales), y degeneración neuronal e infiltración mononuclear en DRG. Un patólogo veterinario certificado por el comité sin conocimiento del grupo de vector estableció los grados de gravedad, que se definieron de la siguiente manera: 1 mínima (<10 %), 2 leve (10-25 %), 3 moderada (25-50 %), 4 marcada (50-95 %) y 5 grave (>95 % - no observada). Cada barra representa un animal. 0 representa la ausencia de lesión.

La Figura 5 muestra que las dianas de miR183 silencian específicamente la expresión de hIDUA en DRG después de la administración ICM de AAVhu68.hIDUA a NHP. Los *Macaca mulatta* adultos recibieron una inyección ICM con 1) 1×10^{13} GC de vector de control AAVhu68.CB7.hIDUA (n=3); 2) vector de control AAVhu68.CB7.hIDUA con tratamiento con esteroides profilácticos (1 mg/kg/día de prednisolona desde el día menos 7 al día 30 seguido de disminución progresiva, n=3); o 3) AAVhu68.CB7.hIDUA-miR183 (n=3). Los animales se sometieron a eutanasia tres meses después de la inyección para

analizar la expresión transgénica e histopatología. Las imágenes representativas muestran el análisis de la expresión de hIDUA mediante inmunofluorescencia de anticuerpos anti-hIDUA (DRG, primera fila), IHC anti-hIDUA (neuronas motoras inferiores, cerebelo, corteza) e ISH anti-IDUA (DRG, última fila). ISH de hIDUA: el tiempo de exposición es de 200 ms para AAVhu68.hIDUA con y sin esteroides. Las neuronas sensoriales muestran expresión masiva de mARN del transgén. El tiempo de exposición es de 1 s para AAV.hIDUA-miR183. Las neuronas sensoriales tienen señal de ISH baja (mARN) en el núcleo y citoplasma. El mARN es visible en células satélite que rodean las neuronas en este tiempo de exposición más alto.

La Figura 6A – Figura 6C muestran que el silenciamiento mediado por miR183 es específico de neuronas de DRG y previene por completo la toxicidad de DRG en NHP tratados ICM con AAVhu68.hIDUA. (Figura 6A). Cuantificación de células positivas en hIDUA en DRG (neuronas sensoriales), médula espinal (neuronas motoras inferiores), cerebelo y corteza en NHP (n=3 por grupo). Se cuantificó un mínimo de cinco campos de magnificación 20x por región por animal. Las barras de error representan la desviación estándar. Prueba de Wilcoxon, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (Figura 6B). Calificación de histopatología tres meses después de la inyección: calificaciones acumulativas de axonopatía dorsal (suma de grados de gravedad de segmentos cervical, torácico y lumbar – calificación máxima posible: 15); calificación acumulativa de DRG (suma de grados de gravedad de segmentos cervical, torácico y lumbar – calificación máxima posible: 15) y mediante de calificación de nervios (suma de grados de gravedad de axonopatía y fibrosis – calificación máxima posible: 10). Un patólogo veterinario certificado por el comité sin conocimiento del grupo de vector estableció los grados de gravedad definidos de la siguiente manera: 1 mínima (<10 %), 2 leve (10-25 %), 3 moderada (25-50 %), 4 marcada (50-95 %) y 5 grave (>95 % - no observada). 0 representa la ausencia de lesión. Las barras de error representan la desviación estándar. (Figura 6C). ISH mediante el uso de sondas específicas del transgén hIDUA, magnificación alta de neuronas sensoriales y células satélite del DRG; tiempo de exposición de 1 s con contratinción nuclear con DAPI azul. Flechas: neuronas sensoriales del DRG; puntas de flechas: células satélite.

La Figura 7A – Figura 7D muestran respuestas de linfocitos T y anticuerpos a hIDUA en NHP. Los *Macaca mulatta* adultos recibieron una inyección ICM con 1) 1×10^{13} GC de vector de control AAVhu68.CB7.hIDUA (n=3); 2) vector de control AAVhu68.CB7.hIDUA con tratamiento con esteroides profilácticos (1 mg/kg/día de prednisolona desde el día menos 7 al día 30 seguido de disminución progresiva, n=3); o 3) AAVhu68.CB7.hIDUA-

miR183 (n=3). (Figura 7A – Figura 7C). Respuestas de ELISPOT de interferón gamma en linfocitos aislados de PBMC, bazo, hígado y ganglios linfáticos cervicales profundos 90 días después de la inyección. Cada animal tuvo tres valores que representaron una agrupación de péptidos diferente (tres agrupaciones de péptidos superpuestas para abarcar la totalidad de la secuencia de hIDUA). El rojo indica una respuesta de ELISPOT positiva definida como >55 unidades formadoras de manchas por 106 linfocitos y tres veces el control negativo medio sin estimulación. (Figura 7D). Ensayo ELISA de anticuerpos anti-hIDUA, dilución en suero 1:1.000.

La Figura 8 muestra la concentración de citocinas/quimiocinas en el CSF. Las muestras se recolectaron al momento de la administración del vector (D0) y 24 horas (24 h), 21 (D21) y 35 (D35) días después de la administración del vector.

La Figura 9 muestra la biodistribución del vector en el cerebro, médula espinal y DRG en NHP. Los *Macaca mulatta* adultos recibieron una inyección ICM con 1) 1×10^{13} GC de vector de control AAVhu68.CB7.hIDUA (n=3); 2) vector de control AAVhu68.CB7.hIDUA con tratamiento con esteroides profilácticos (1 mg/kg/día de prednisolona desde el día menos 7 al día 30 seguido de disminución progresiva, n=3); o 3) AAVhu68.CB7.hIDUA-miR183 (n=3). Se extrajo ADN de los tejidos de NHP con un minikit de ADN QIAamp. Se cuantificaron los genomas del vector mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con reactivos Taqman y cebadores/sondas que se dirigieron a la secuencia de poliadenilación de rBG de los vectores. Los resultados se expresan en copia del genoma por genoma diploide. Las barras de error representan la desviación estándar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las composiciones y los métodos proporcionados en la presente son útiles en tratamientos para la administración génica para reprimir la expresión transgénica en neuronas de DRG mediante el uso de miARN. Como se usa en la presente, el término "represión" incluye la reducción parcial o la extinción o silenciamiento completo de la expresión transgénica. La expresión transgénica se puede evaluar mediante un ensayo adecuado para el transgén seleccionado. Las composiciones y métodos proporcionados disminuyen la toxicidad del DRG caracterizada por degeneración neuronal, degeneración axonal de la médula espinal dorsal secundaria y/o infiltración de células mononucleares. En ciertas formas de realización, el casete de expresión o genoma del vector comprende una o más secuencias diana de miARN en la región no traducida (UTR) 3' con respecto a una secuencia codificante del producto génico. De manera adecuada, dos o más secuencias diana de miARN se proporcionan en tándem, opcionalmente separadas por una secuencia espaciadora. En ciertas formas de realización, tres o más secuencias diana de miARN se proporcionan en tándem, opcionalmente separadas por una secuencia espaciadora. En ciertas formas de realización, tres o más secuencias diana de miARN se proporcionan en tándem, opcionalmente separadas por una secuencia espaciadora. Se puede usar una variedad de sistemas de administración para administrar el casete de expresión a un sujeto, por ejemplo, un paciente humano. Tales sistemas de administración pueden ser un vector viral, un vector no viral, o un sistema no a base de vector (por ejemplo, un liposoma, ADN desnudo, ARN desnudo, etc.). Estos sistemas de administración se pueden usar para la administración directamente en el sistema nervioso central (SNC), sistema nervioso periférico (SNP) o para la administración intravenosa u otra vía alternativa. En otras formas de realización, estas composiciones y métodos se usan para la administración sistémica de vectores de tratamiento génico (por ejemplo, rAAV). En ciertas formas de realización, estas composiciones y métodos son útiles cuando se administran dosis altas de vector (por ejemplo, rAAV). En ciertas formas de realización, las composiciones y métodos proporcionados en la presente permiten la coadministración de una dosis reducida, una longitud reducida y/o una cantidad reducida de inmunomoduladores con un vector de tratamiento génico (por ejemplo, un tratamiento génico mediado por rAAV). En ciertas formas de realización, las composiciones y métodos proporcionados en la presente eliminan la necesidad de coadministrar inmunosupresores o tratamiento inmunomodulador antes de, con y/o tras la administración de un vector viral (por ejemplo, un rAAV).

Una "UTR 5'" está corriente arriba del codón de inicio de una secuencia codificante del

producto génico. La UTR 5' es generalmente más corta que la UTR 3'. Generalmente, la UTR 5' tiene de alrededor de 3 nucleótidos a alrededor de 200 nucleótidos de longitud, pero puede ser más larga opcionalmente.

Una "UTR 3'" está corriente abajo de la secuencia codificante de un producto génico y generalmente es más larga que la UTR 5'. En ciertas formas de realización, la UTR 3' tiene de alrededor de 200 nucleótidos a alrededor de 800 nucleótidos de longitud, pero puede ser más larga o más corta opcionalmente.

Como se usa en la presente, un "miARN" se refiere a un microARN que es una molécula pequeña de ARN no codificante que regula mARN y detiene su traducción en proteína. El miARN contiene una "secuencia semilla" que es una región de nucleótidos que se fija específicamente a mARN mediante apareamiento de bases complementarias, lo que destruye o silencia el mARN. En ciertas formas de realización, la secuencia semilla se ubica en el miARN maduro (5' a 3') y generalmente se ubica en la posición 2 a 7 o 2 a 8 (del extremo 5' de la cadena sentido (+)) del miARN, aunque puede ser más larga. En ciertas formas de realización, la longitud de la secuencia semilla es no menor de alrededor de 30 % de la longitud de la secuencia de miARN, que puede tener de al menos 7 nucleótidos a alrededor de 28 nucleótidos de longitud, al menos de 8 nucleótidos a alrededor de 28 nucleótidos de longitud, de 7 nucleótidos a 28 nucleótidos, de 8 nucleótidos a 18 nucleótidos, de 12 nucleótidos a 28 nucleótidos de longitud, de alrededor de 20 a alrededor de 26 nucleótidos, alrededor de 22 nucleótidos, alrededor de 24 nucleótidos o alrededor de 26 nucleótidos.

Como se usa en la presente, una "secuencia diana de miARN" es una secuencia ubicada en la cadena positiva de ADN (5' a 3') y es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de miARN, que incluye la secuencia semilla de miARN. La secuencia diana de miARN es exógena a la región no traducida del producto transgénico codificado y está diseñada para ser dirigida específicamente por miARN en células en las que es conveniente la represión de la expresión transgénica. La expresión "secuencia diana del agrupamiento de miR183" se refiere a una secuencia diana que responde a un miR183 o miembros del agrupamiento de miR183 (alternativamente denominado familia), que incluye miR-183, -96 y -182 (descritos por Dambal, S. *et al.* Nucleic Acids Res 43:7173-7188, 2015, que se incorpora en la presente por referencia). Sin limitarse a la teoría, el ARN mensajero (mARN) del transgén (que codifica el producto génico) está presente en un tipo de célula en el que se administra el casete de expresión que contiene el miARN, de manera tal que la fijación específica del miARN a la secuencias diana de miARN de UTR 3' da como resultado el silenciamiento y la escisión de mARN, lo cual reduce o

elimina la expresión transgénica solo en las células que expresan el miARN.

Por lo general, la secuencia diana de miARN tiene al menos de 7 nucleótidos a alrededor de 28 nucleótidos de longitud, al menos de 8 nucleótidos a alrededor de 28 nucleótidos de longitud, de 7 nucleótidos a 28 nucleótidos, de 8 nucleótidos a 18 nucleótidos, de 12 nucleótidos a 28 nucleótidos de longitud, de alrededor de 20 a alrededor de 26 nucleótidos, alrededor de 22 nucleótidos, alrededor de 24 nucleótidos o alrededor de 26 nucleótidos, y contiene al menos una región consecutiva (por ejemplo, 7 u 8 nucleótidos) que es complementaria a la secuencia semilla de miARN. En ciertas formas de realización, la secuencia diana comprende una secuencia con complementariedad exacta (100 %) o complementariedad parcial a la secuencia semilla de miARN con algunos errores de apareamiento. En ciertas formas de realización, la secuencia diana comprende al menos 7 u 8 nucleótidos que son 100 % complementarios a la secuencia semilla de miARN. En ciertas formas de realización, la secuencia diana consiste en una secuencia que es 100 % complementaria a la secuencia semilla de miARN. En ciertas formas de realización, la secuencia diana contiene múltiples copias (por ejemplo, dos o tres copias) de la secuencia que es 100 % complementaria a la secuencia semilla. En ciertas formas de realización, la región de 100 % de complementariedad comprende al menos 30 % de la longitud de la secuencia diana. En ciertas formas de realización, el resto de la secuencia diana tiene al menos alrededor de 80 % a alrededor de 99 % de complementariedad con el miARN. En ciertas formas de realización, en un casete de expresión que contiene una cadena positiva de ADN, la secuencia diana de miARN es el complemento inverso del miARN.

En ciertas formas de realización, en la presente se proporcionan casetes de expresión o genomas del vector diseñados por ingeniería genética que comprenden al menos una copia de una secuencia diana de miR dirigida a uno o más miembros de la familia o agrupamiento de miR-183 ligados operativamente a un transgén que reprime la expresión del transgén en DRG y/o reduce o elimina la toxicidad y/o axonopatía de DRG. En ciertas formas de realización, el casete de expresión o genoma del vector diseñado por ingeniería genética comprende múltiples secuencias diana de miARN, de manera que la cantidad de secuencias diana de miARN sea suficiente para reducir o minimizar la expresión transgénica en DRG y/o para reducir o eliminar la toxicidad y/o axonopatía de DRG. El casete de expresión o genoma del vector se puede administrar mediante cualquier sistema portador, vector viral o vector no viral, o vía adecuados, pero es particularmente útil para la administración intratecal.

Como se usa en la presente, la expresión "administración intratecal" se refiere a una vía

de administración mediante una inyección en el canal vertebral, más específicamente en el espacio subaracnoideo, de modo que alcance el líquido cefalorraquídeo (CSF). La administración intratecal puede incluir punción lumbar, intraventricular (que incluye intracerebroventricular (ICV)), suboccipital/intracisternal y/o punción C1-2. Por ejemplo, se puede introducir material para su difusión por todo el espacio subaracnoideo mediante punción lumbar. En otro ejemplo, la inyección puede realizarse en la cisterna magna.

Como se usa en la presente, la expresión "administración intracisternal" se refiere a una vía de administración directamente en el líquido cefalorraquídeo de la cisterna magna cerebelomedular, más específicamente mediante una punción suboccipital o mediante inyección directa en la cisterna magna o mediante un tubo posicionado de manera permanente.

Inesperadamente, se observó que las composiciones que comprenden las secuencias diana de miR-183 descritas en la presente para reprimir la expresión en el DRG proporcionan una mejor expresión transgénica en uno o más tipos de células diferentes (distintas de DRG) dentro del sistema nervioso central, que incluyen, entre otros, neuronas (que incluyen, por ejemplo, piramidales, de Purkinje, granulosas, del huso e interneuronales) o células gliales (que incluyen, por ejemplo, astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células ependimarias). Si bien esta observación se hizo tras una administración intratecal, este efecto de mejora en el SNC no se limita a vías de administración en el SNC y se puede lograr mediante el uso de otras vías, por ejemplo, intravenosa a dosis alta, intramuscular a dosis alta u otras vías de administración sistémica.

En ciertas formas de realización, uno puede querer seleccionar secuencias diana de miR-182 y/o secuencias diana de miR-96 para casetes de expresión que comprenden transgenes que no se dirigen al SNC, para evitar mejorar la expresión en el SNC del transgén (mientras se reprime la expresión en el DRG). Por ejemplo, se puede desear evitar que los casetes de expresión que comprenden transgenes para la administración al músculo esquelético o el hígado mejoren la expresión en el SNC, pero sí que eviten toxicidad y/o axonopatía en el DRG, que pueden estar asociadas con las dosis altas que se pueden requerir.

En ciertas formas de realización, el genoma del vector o casete de expresión contiene al menos una secuencia diana de miARN que es una secuencia diana de miR-183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector o casete de expresión contiene una secuencia diana de miR-183 que incluye AGTGAATTCTACCAGTGCCATA (SEQ ID

NO: 1), donde se subraya la secuencia complementaria a la secuencia semilla de miR-183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector o casete de expresión contiene más de una copia (por ejemplo, dos o tres copias) de una secuencia que es 100 % complementaria a la secuencia semilla de miR-183. En ciertas formas de realización, una secuencia diana de miR-183 tiene de alrededor de 7 nucleótidos a alrededor de 28 nucleótidos de longitud e incluye al menos una región que es al menos 100 % complementaria a la secuencia semilla de miR-183. En ciertas formas de realización, una secuencia diana de miR-183 contiene una secuencia con complementariedad parcial con SEQ ID NO: 1 y, por ende, cuando se alinea con SEQ ID NO: 1, hay uno o más errores de apareamiento. En ciertas formas de realización, una secuencia diana de miR-183 comprende una secuencia que tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 errores de apareamiento cuando se alinea con SEQ ID NO: 1, donde los errores de apareamiento pueden ser no contiguos. En ciertas formas de realización, una secuencia diana de miR-183 incluye una región de 100 % de complementariedad que también comprende al menos 30 % de la longitud de la secuencia diana de miR-183. En ciertas formas de realización, la región de 100 % de complementariedad incluye una secuencia con 100 % de complementariedad con la secuencia semilla de miR-183. En ciertas formas de realización, el resto de una secuencia diana de miR-183 tiene al menos de alrededor de 80 % a alrededor de 99 % de complementariedad con miR-183. En ciertas formas de realización, el casete de expresión o genoma del vector incluye una secuencia diana de miR-183 que comprende una SEQ ID NO: 1 truncada, es decir, una secuencia que carece de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos en cualquiera de los extremos 5' o 3' o ambos de SEQ ID NO: 1. En ciertas formas de realización, el casete de expresión o genoma del vector comprende un transgén y una secuencia diana de miR-183. Aun en otras formas de realización, el casete de expresión o genoma del vector comprende al menos dos, tres o cuatro secuencias diana de miR-183.

En ciertas formas de realización, el casete de expresión o genoma del vector incluye una combinación de secuencias diana de miARN. En ciertas formas de realización, la combinación de secuencias diana incluye diferentes secuencias diana con al menos complementariedad parcial con el mismo miARN (tal como miR-183). En ciertas formas de realización, el casete de expresión o genoma del vector incluye una combinación de secuencias diana de miARN seleccionadas de secuencias diana de miR-183, miR-182 y/o miR-96 proporcionadas en la presente. En ciertas formas de realización, el casete de expresión o genoma del vector comprende un transgén y dos, tres o cuatro secuencias diana de miR-96. En ciertas formas de realización, un casete de expresión o genoma del

vector comprende un transgén y dos, tres o cuatro secuencias diana de miR-182. En ciertas formas de realización, un casete de expresión o genoma del vector comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR-183, opcionalmente en combinación con al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR-182, y/o opcionalmente en combinación con al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR-96.

Se observó que las composiciones que comprenden un transgén y miR-182 minimizan o eliminan la toxicidad y/o previenen la axonopatía de los ganglios de la raíz dorsal. Sin embargo, si bien son eficaces para este fin, no se observó que los casetes de expresión o genomas del vector que contienen una secuencia diana de miR-182 mejoren la expresión en el SNC, como se descubrió de manera inesperada en la composición que tenía la secuencia diana de miR-183. Por lo tanto, estas composiciones pueden ser convenientes para dirigirse a genes fuera del SNC.

En ciertas formas de realización, en la presente se proporciona un casete de expresión o genoma del vector que comprende una o más secuencias diana de la familia de miR-183 y que carece de un transgén (es decir, las secuencias diana de la familia de miR-183 no están ligadas operativamente a una secuencia que codifica un producto génico heterólogo).

En ciertas formas de realización, el genoma del vector o casete de expresión contiene al menos una secuencia diana de miARN que es una secuencia diana de miR-182. En ciertas formas de realización, el genoma del vector o casete de expresión contiene una secuencia diana de miR-182 que incluye AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA (SEQ ID NO: 3). En ciertas formas de realización, el genoma del vector o casete de expresión contiene más de una copia (por ejemplo, dos o tres copias) de una secuencia que es 100 % complementaria a la secuencia semilla de miR-182. En ciertas formas de realización, una secuencia diana de miR-182 tiene de alrededor de 7 nucleótidos a alrededor de 28 nucleótidos de longitud e incluye al menos una región que es al menos 100 % complementaria a la secuencia semilla de miR-182. En ciertas formas de realización, una secuencia diana de miR-182 contiene una secuencia con complementariedad parcial con SEQ ID NO: 3 y, por ende, cuando se alinea con SEQ ID NO: 3, hay uno o más errores de apareamiento. En ciertas formas de realización, una secuencia diana de miR-183 comprende una secuencia que tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 errores de apareamiento cuando se alinea con SEQ ID NO: 3, donde los errores de apareamiento pueden ser no contiguos. En ciertas formas de realización, una secuencia diana de miR-182 incluye una región de 100 % de complementariedad que

también comprende al menos 30 % de la longitud de la secuencia diana de miR-182. En ciertas formas de realización, la región de 100 % de complementariedad incluye una secuencia con 100 % de complementariedad con la secuencia semilla de miR-182. En ciertas formas de realización, el resto de una secuencia diana de miR-182 tiene al menos de alrededor de 80 % a alrededor de 99 % de complementariedad con miR-182. En ciertas formas de realización, el casete de expresión o genoma del vector incluye una secuencia diana de miR-182 que comprende una SEQ ID NO: 3 truncada, es decir, una secuencia que carece de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos en cualquiera de los extremos 5' o 3' o ambos de SEQ ID NO: 3. En ciertas formas de realización, el casete de expresión o genoma del vector comprende un transgén y una secuencia diana de miR-182. Aun en otras formas de realización, el casete de expresión o genoma del vector comprende al menos dos, tres o cuatro secuencias diana de miR-182.

En ciertas formas de realización, un casete de expresión o genoma del vector tiene dos o más secuencias diana de miARN consecutivas que son continuas y no están separadas por un espaciador. En ciertas formas de realización, dos o más de las secuencias diana de miARN están separadas por un espaciador. En ciertas formas de realización, el espaciador es una secuencia no codificante de alrededor de 1 a alrededor de 12 nucleótidos, de alrededor de 2 a alrededor de 10 nucleótidos de longitud, de alrededor de 3 a alrededor de 10 nucleótidos, de alrededor de 4 a alrededor de 6 nucleótidos de longitud o de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 nucleótidos de longitud. Opcionalmente, un solo casete de expresión puede contener tres o más secuencias diana de miARN, que tienen opcionalmente diferentes secuencias espaciadoras entre estas. En ciertas formas de realización, uno o más espaciadores se seleccionan independientemente de (i) GGAT (SEQ ID NO: 5); (ii) CACGTG (SEQ ID NO: 6); o (iii) GCATGC (SEQ ID NO: 7). En ciertas formas de realización, un espaciador se ubica 3' con respecto a la primera secuencia diana de miARN y/o 5' con respecto a la última secuencia diana de miARN. En ciertas formas de realización, los espaciadores entre las secuencias diana de miARN son iguales.

En ciertas formas de realización, un casete de expresión comprende un transgén y una secuencia diana de miR-183 y una o más secuencias diana de miARN diferentes. En ciertas formas de realización, los casetes de expresión contienen una secuencia diana miR-96: mARN y cadena positiva de ADN (5' a 3'): AGCAAAATGTGCTAGTGCCAAA (SEQ ID NO: 2); secuencia diana de miR-182: mARN y cadena positiva de ADN (5' a 3'): y/o AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA (SEQ ID NO: 3).

Aunque miR-145 se ha asociado con el cerebro en la literatura, los estudios realizados hasta la actualidad mostraron que las secuencias diana de miR-145 no tienen efecto

alguno en la reducción de la expresión transgénica en los ganglios de la raíz dorsal. Secuencia diana de miR-145: mRNA y cadena positiva de ADN (5' a 3'): AGGGATTCCTGGGAAAACCTGGAC (SEQ ID NO: 4).

Como se proporciona en la presente, los casetes de expresión y genomas del vector contienen transgenes ligados operativamente a, o bajo el control de, secuencias reguladoras que dirigen la expresión del producto transgénico en la célula diana. En ciertas formas de realización, el casete de expresión o genoma del vector contiene un transgén que está ligado operativamente a una o más secuencias diana de miARN proporcionadas en la presente. En ciertas formas de realización, el casete de expresión o genoma del vector está diseñado para contener múltiples secuencias diana de miARN. Las secuencias diana de miARN se incorporan en la UTR del transgén (es decir, 3' o corriente abajo del marco de lectura abierto del gen).

La expresión "repeticiones en tándem" se usa en la presente para referirse a la presencia de dos o más secuencias diana de miARN consecutivas. Estas secuencias diana de miARN pueden ser continuas, es decir, pueden estar ubicadas una luego de la otra de manera tal que el extremo 3' de una esté directamente corriente arriba del extremo 5' de la siguiente sin secuencias intermedias, o viceversa. En otra forma de realización, dos o más de las secuencias diana de miARN están separadas por una secuencia espaciadora corta.

Como se usa en la presente, "espaciador" es cualquier secuencia de ácidos nucleicos seleccionada, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de longitud que se ubica entre dos o más secuencias diana de miARN consecutivas. En ciertas formas de realización, el espaciador tiene de 1 a 8 nucleótidos de longitud, de 2 a 7 nucleótidos de longitud, de 3 a 6 nucleótidos de longitud, cuatro nucleótidos de longitud, de 4 a 9 nucleótidos, de 3 a 7 nucleótidos o valores más largos. De manera adecuada, un espaciador es una secuencia no codificante. En ciertas formas de realización, el espaciador puede tener cuatro (4) nucleótidos. En ciertas formas de realización, el espaciador es GGAT. En ciertas formas de realización, el espaciador tiene seis (6) nucleótidos. En ciertas formas de realización, el espaciador es CACGTG o GCATGC.

En ciertas formas de realización, las repeticiones en tándem contienen dos, tres, cuatro o más de la misma secuencia diana de miARN. En ciertas formas de realización, las repeticiones en tándem contienen al menos dos secuencias diana de miARN diferentes, al menos tres secuencias diana de miARN diferentes o al menos cuatro secuencias diana de miARN diferentes, etc. En ciertas formas de realización, las repeticiones en tándem

pueden contener dos o tres de la misma secuencia diana de miARN y una cuarta secuencia diana de miARN que es diferente.

En ciertas formas de realización, puede haber al menos dos conjuntos diferentes de repeticiones en tándem en el casete de expresión. Por ejemplo, una UTR 3' puede contener una repetición en tándem inmediatamente corriente abajo del transgén, secuencias de UTR y dos o más repeticiones en tándem más cerca del extremo 3' de la UTR. En otro ejemplo, la UTR 5' puede contener una, dos o más secuencias diana de miARN. En otro ejemplo, la 3' puede contener repeticiones en tándem y la UTR 5' puede contener al menos una secuencia diana de miARN.

En ciertas formas de realización, el casete de expresión contiene dos, tres, cuatro o más repeticiones en tándem que comienzan dentro de alrededor de 0 a 20 nucleótidos del codón de detención del transgén. En otras formas de realización, el casete de expresión contiene las repeticiones en tándem de miARN de al menos 100 a alrededor de 4000 nucleótidos del codón de detención del transgén.

"Que comprende" es una expresión que significa inclusive los otros componentes o etapas del método. Cuando se usa "que comprende", debe entenderse que las formas de realización relacionadas incluyen descripciones que usan la terminología "que consiste en", que excluye otros componentes o etapas del método, y la terminología "que consiste esencialmente en", que excluye cualquier componente o etapa del método que cambie sustancialmente la naturaleza de la forma de realización o invención. Debe entenderse que si bien se presentan diversas formas de realización en la memoria descriptiva que usan la expresión "que comprende", en diversas circunstancias, también se describe que una forma de realización relacionada mediante el uso de las expresiones "que consiste en" o "que consiste esencialmente en".

Cabe señalar que el término "un" o "una" se refiere a uno o más, por ejemplo, se entiende que "un vector" representa uno o más vectores. De este modo, los términos "uno/a", "uno/a o más" y "al menos uno/a" se usan indistintamente en la presente.

Como se usa en la presente, la expresión "alrededor de" significa una variabilidad de más o menos 10 % de la referencia otorgada, a menos que se especifique lo contrario.

1. Casete de expresión

Como se describe en la presente, un "casete de expresión" incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un producto génico funcional ligado operativamente a secuencias reguladoras que dirigen su expresión en una célula diana y secuencias diana

de miARN en la UTR. Como se describe en la presente, las secuencias diana de miARN están diseñadas para ser reconocidas específicamente por miARN presente en células en las que no es conveniente la expresión transgénica y/o son convenientes niveles reducidos de expresión transgénica. En ciertas formas de realización, las secuencias diana de miARN reducen específicamente la expresión del transgén en el ganglio de la raíz dorsal. En ciertas formas de realización, las secuencias diana de miARN se ubican en la UTR 3', UTR 5' y/o tanto en la UTR 3' como en la UTR 5'. El análisis de las secuencias diana de miARN que se encuentra en esta memoria descriptiva se incorpora en la presente por referencia.

En una forma de realización, el casete de expresión se diseña para la expresión en un sujeto humano a la vez que reduce o elimina la expresión en DRG del producto transgénico. En una forma de realización, el casete de expresión se diseña para la expresión en el sistema nervioso central (SNC), que incluye el líquido cefalorraquídeo y el cerebro. En ciertas formas de realización, el casete de expresión o genoma del vector se diseña para la expresión o expresión mejorada del transgén en uno o más tipos de células presentes en el SNC (sin incluir los ganglios de la raíz dorsal), que incluye células nerviosas (tales como piramidales, de Purkinje, granulosas, del huso e interneuronales) y células gliales (tales como astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células endoteliales). En ciertas formas de realización, la expresión mejorada del transgén se logra en uno o más tipos de células con poca o nula expresión del transgén en otro tipo de célula del SNC. En ciertas formas de realización, el casete de expresión es útil para la expresión en células distintas de aquellas en el SNC.

Como se usa en la presente, el término "expresión" o "expresión génica" se refiere al proceso mediante el cual se usa información de un gen en la síntesis de un producto génico funcional. El producto génico puede ser una proteína, un péptido o un polímero de ácido nucleico (tal como un ARN, un ADN o un PNA).

Como se usa en la presente, el término "secuencia reguladora" o "secuencia de control de la expresión" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos, tales como secuencias iniciadoras, secuencias potenciadoras y secuencias promotoras, que inducen, reprimen o de lo contrario controlan la transcripción de proteínas que codifican secuencias de ácidos nucleicos a las que están ligadas operativamente.

Como se usa en la presente, la expresión "ligado/a operativamente" se refiere a secuencias de control de la expresión que son contiguas a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un producto génico y/o secuencias de control de la expresión que

actúan en *trans* o a una distancia para controlar la transcripción y expresión de estas.

El término "exógeno/a", como se usa para describir una secuencia de ácidos nucleicos o proteína, significa que el ácido nucleico o la proteína no se produce naturalmente en la posición en la que existe en un cromosoma o una célula huésped. Una secuencia de ácidos nucleicos exógena se refiere a una secuencia derivada de e insertada en la misma célula o sujeto huésped, pero que está presente en un estado no natural, por ejemplo, una cantidad de copias diferente o bajo el control de diferentes elementos reguladores.

El término "heterólogo/a", como se usa para describir una secuencia de ácidos nucleicos o proteína, significa que el ácido nucleico o la proteína derivó de un organismo diferente o una especie diferente del mismo organismo que la célula o sujeto huésped en el que se expresa. El término "heterólogo/a", cuando se usa en referencia a una proteína o un ácido nucleico en un plásmido, casete de expresión o vector, indica que la proteína o el ácido nucleico está presente con otra secuencia o subsecuencia con la que la proteína o el ácido nucleico en cuestión no se encuentra en la misma relación entre sí en la naturaleza.

En una forma de realización, la secuencia reguladora comprende un promotor. En una forma de realización, el promotor es un promotor de la β -actina de pollo. En una forma de realización adicional, el promotor es un híbrido de un potenciador temprano inmediato de citomegalovirus y el promotor de la β -actina de pollo (un promotor ver CB7). En otra forma de realización, un promotor adecuado puede incluir, entre otros, un promotor del factor de elongación humano 1 alfa (EF1 alfa) (ver, por ejemplo, Kim DW *et al*, Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. Gene. 16 de julio de 1990;91(2):217-23), un promotor de la sinapsina 1 (ver, por ejemplo, Kügler S *et al*, Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. Gene Ther. Febrero de 2003;10(4):337-47), un promotor de enolasa específica de neuronas (NSE) (ver, por ejemplo, Kim J *et al*, Involvement of cholesterol-rich lipid rafts in interleukin-6-induced neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate cancer cells. Endocrinology. Febrero de 2004;145(2):613-9. Epub, 16 de octubre de 2003) o un promotor de CB6 (ver, por ejemplo, Large-Scale Production of Adeno-Associated Viral Vector Serotype-9 Carrying the Human Survival Motor Neuron Gene, *Mol Biotechnol*. enero de 2016;58(1):30-6. doi: 10.1007/s12033-015-9899-5).

Se pueden seleccionar promotores adecuados, que incluyen, entre otros, un promotor constitutivo, un promotor específico de tejido o un promotor inducible/regulador. Un

ejemplo de un promotor constitutivo es un promotor de la beta-actina de pollo. Se ha descrito una variedad de promotores de la beta-actina de pollo solos o en combinación con diversos elementos potenciadores (por ejemplo, CB7 es un promotor de la beta-actina de pollo con elementos potenciadores de citomegalovirus; un promotor de CAG, que incluye el promotor, el primer exón y el primer intrón de la beta-actina de pollo, y el aceptor de empalme del gen de beta-globina de conejo; un promotor de CBh, SJ Gray *et al.*, Hu Gene Ther, 2011 Sep; 22(9): 1143-1153). Los ejemplos de promotores que son específicos de tejido son conocidos para el hígado (albúmina, Miyatake *et al.*, (1997) J. Virol., 71:5124-32; promotor del núcleo del virus de la hepatitis B, Sandig *et al.*, (1996) Gene Ther., 3:1002-9; alfa-fetoproteína (AFP), Arbuthnot *et al.*, (1996) Hum. Gene Ther., 7:1503-14), neurona (tal como promotor de enolasa específica de neuronas (NSE), Andersen *et al.*, (1993) Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15; gen de la cadena liviana de neurofilamento, Piccioli *et al.*, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5; y el gen vgf específico de neuronas, Piccioli *et al.*, (1995) Neuron, 15:373-84) y otros tejidos. Alternativamente, se puede seleccionar un promotor regulable. Ver, por ejemplo, WO 2011/126808B2, que se incorpora en la presente por referencia.

En una forma de realización, la secuencia reguladora comprende además un potenciador. En una forma de realización, la secuencia reguladora comprende un potenciador. En otra forma de realización, la secuencia reguladora contiene dos o más potenciadores de la expresión. Estos potenciadores pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, un potenciador puede incluir un potenciador alfa mic/bik o un potenciador de CMV. Este potenciador puede estar presente en dos copias que se encuentran adyacentes entre sí. Alternativamente, las copias dobles del potenciador pueden estar separadas por una o más secuencias.

En una forma de realización, la secuencia reguladora comprende además un intrón. En una forma de realización adicional, el intrón es un intrón de beta-actina de pollo. Otros intrones adecuados incluyen aquellos que se conocen en la técnica, tal como un intrón de β -globulina humana y/o un intrón Promega® disponible en el comercio, y aquellos descritos en WO 2011/126808.

En una forma de realización, la secuencia reguladora comprende además una señal de poliadenilación (poliA). En una forma de realización adicional, la poliA es una globina poli A de conejo. Ver, por ejemplo, WO 2014/151341. Alternativamente, otra poliA, por ejemplo, una secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana (hGH), una poliA de SV40 o una poliA sintética se puede incluir en un casete de expresión.

Debería entenderse que las composiciones en el casete de expresión descrito en la presente pretenden ser aplicadas a otras composiciones, regímenes, aspectos, formas de realización y métodos descritos a lo largo de la memoria descriptiva.

Se pueden administrar casetes de expresión mediante cualquier sistema de administración de vector no viral adecuado o mediante un vector viral adecuado. Los sistemas de administración de vector no viral adecuados son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Ramamoorth y Narvekar. J Clin Diagn Res. enero de 2015; 9(1):GE01-GE06, que se incorpora en la presente por referencia), y una persona del oficio de nivel medio puede seleccionarlos, los cuales pueden incluir, por ejemplo, ADN desnudo, ARN desnudo, dendrímeros, PLGA, polimetacrilato, una partícula inorgánica, una partícula lipídica, un vector a base de polímero o una formulación a base de quitosano.

2. Vector

Como se usa en la presente, un "vector" es una porción biológica o química que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que se puede introducir en una célula diana adecuada para la replicación o expresión de dicha secuencia de ácidos nucleicos. Los ejemplos de un vector incluyen, entre otros, un virus recombinante, un plásmido, lipoplejos, una polimerosoma, poliplejos, un dendrímero, un conjugado de péptido penetrante de células (CPP), una partícula magnética o una nanopartícula. En una forma de realización, un vector es una molécula de ácido nucleico en la que un ácido nucleico exógeno, heterólogo o diseñado por ingeniería genética que codifica un producto génico funcional se puede introducir en una célula diana adecuada. Preferentemente, tales vectores tienen uno o más orígenes de replicación y uno o más sitios en los que el ADN recombinante se puede insertar. A menudo, los vectores tienen medios mediante los cuales las células con vectores se pueden seleccionar de aquellas sin vectores, por ejemplo, codifican genes resistentes a fármacos. Los vectores comunes incluyen plásmidos, genomas virales y "cromosomas artificiales". Una persona del oficio de nivel medio tiene disponibles métodos convencionales de generación, producción, caracterización o cuantificación de los vectores.

En una forma de realización, el vector es un plásmido no viral que comprende un casete de expresión descrito allí, por ejemplo, "ADN desnudo", "plásmido desnudo ADN", ARN y mARN; acoplado con diversas composiciones y nanopartículas, que incluyen, por ejemplo, micelas, liposomas, composiciones de lípido catiónico-ácido nucleico, composiciones de poliglicano y otros polímeros, conjugados de ácido nucleico a base de lípido y/o colesterol

y otros constructos, como se describen en la presente. Ver, por ejemplo, X. Su *et al*, Mol. Pharmaceutics, 2011, 8 (3), páginas 774–787; publicación en línea: 21 de marzo de 2011; WO2013/182683, WO 2010/053572 y WO 2012/170930, todos los cuales se incorporan en la presente por referencia.

En ciertas formas de realización, el vector descrito en la presente es un "virus incapaz de replicarse" o un "vector viral" que se refiere a una partícula viral sintética o artificial en la cual un casete de expresión que contiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un producto génico funcional y las secuencias diana de miARN que se dirigen al DRG están empaquetados en una cápside o envoltura viral, donde cualquier secuencia genómica viral empaquetada también dentro de la cápside o envoltura viral es incapaz de replicarse; es decir, no pueden generar viriones de progenie, pero retienen la capacidad de infectar células diana. En una forma de realización, el genoma del vector viral no incluye genes que codifican las enzimas requeridas para replicarse (el genoma se puede diseñar por ingeniería genética para que sea "*gutless*", conteniendo solo la secuencia codificante de ácidos nucleicos flanqueada por las señales requeridas para la amplificación y el empaquetamiento del genoma artificial), pero estos genes pueden suministrarse durante la producción. Por lo tanto, se considera seguro su uso en tratamiento génico ya que la replicación e infección mediante viriones de progenie no puede ocurrir excepto en presencia de la enzima viral requerida para la replicación.

Como se usa en la presente, un vector viral recombinante es cualquier vector viral adecuado. Los ejemplos proporcionan virus adenoasociados recombinantes (rAAV) ilustrativos. Otros vectores virales adecuados pueden incluir, por ejemplo, un adenovirus, un poxvirus, un bocavirus, un AAV/bocavirus híbrido, un virus del herpes simple o un lentivirus. En formas de realización preferidas, estos virus recombinantes son incapaces de replicación.

Como se usa en la presente, el término "célula huésped" puede referirse a la línea celular de empaquetamiento en la que se produce un vector (por ejemplo, un AAV recombinante). Una célula huésped puede ser una célula procariota o eucariota (por ejemplo, de ser humano, insecto o levadura) que contiene ADN exógeno o heterólogo que se introdujo en la célula mediante cualquier medio, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección, transformación, infección viral, transfección, administración de liposoma, técnicas de fusión de membrana, pélets recubiertos con ADN de alta velocidad y fusión de protoplastos. Los ejemplos de células huésped pueden incluir, entre otras, una célula aislada, un cultivo celular, una célula *Escherichia coli*, una célula de levadura, una célula humana, una célula no humana, una célula de mamífero, una célula no de

mamífero, una célula de insecto, una célula HEK-293, una célula de hígado, una célula de riñón, una célula del sistema nervioso central, una neurona, una célula glial o una célula madre.

Como se usa en la presente, el término "célula diana" se refiere a cualquier célula diana en la que sea conveniente la expresión del producto génico funcional. Los ejemplos de células diana pueden incluir, entre otras, una célula de hígado, una célula de riñón, una célula del sistema nervioso central, una neurona, una célula glial y una célula madre. En ciertas formas de realización, el vector se administra a una célula diana *ex vivo*. En ciertas formas de realización, el vector se administra a la célula diana *in vivo*.

Como se usa en la presente, un "genoma del vector" se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos empaquetada dentro de un vector viral. En un ejemplo, un "genoma del vector" contiene, como mínimo, de 5' a 3', una secuencia específica del vector, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un producto génico funcional ligado operativamente a secuencias de control reguladoras que dirigen su expresión en una célula diana y secuencias diana de miARN en las regiones no traducidas y una secuencia específica del vector. Por ejemplo, un genoma del vector de AAV contiene secuencias de repetición terminal invertida y un casete de expresión que comprende, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un producto génico funcional ligado operativamente a secuencias de control reguladoras que dirigen su expresión en una célula diana y secuencias diana de miARN en las regiones no traducidas. Como se describe en la presente, las secuencias diana de miARN están diseñadas para ser reconocidas específicamente por secuencias de miARN en células en las que no es conveniente la expresión transgénica (por ejemplo, ganglios de la raíz dorsal) y/o son convenientes niveles reducidos de expresión transgénica.

Debería entenderse que las composiciones en el vector descrito en la presente pretenden ser aplicadas a otras composiciones, regímenes, aspectos, formas de realización y métodos descritos a lo largo de la memoria descriptiva.

3. Virus adenoasociado (AAV)

En un aspecto, en la presente se proporciona un AAV recombinante (rAAV) que comprende una cápside de AAV y un genoma del vector empaquetado en su interior.

En una forma de realización, la secuencia reguladora es como se describe anteriormente. En una forma de realización, el genoma del vector comprende una repetición terminal

invertida (ITR) de AAV 5', un casete de expresión como se describe en la presente y una ITR de AAV 3'. En una forma de realización, el genoma del vector se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos empaquetada dentro de una cápside de rAAV que formar un vector de rAAV. Tal secuencia de ácidos nucleicos contiene secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV que flanquean un casete de expresión. En un ejemplo, un "genoma del vector" contiene, como mínimo, de 5' a 3', una ITR de AAV 5', una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un producto génico funcional ligado operativamente a secuencias de control reguladoras que dirigen su expresión en una célula diana y secuencias diana de miARN en las regiones no traducidas y una ITR de AAV 3'. En ciertas formas de realización, las ITR son de AAV2, y la cápside es de un AAV diferente. Alternativamente, se pueden usar otras ITR. Como se describe en la presente, las secuencias diana de miARN están diseñadas para ser reconocidas específicamente por secuencias de miARN en células en las que no es conveniente la expresión transgénica y/o son convenientes niveles reducidos de expresión transgénica.

Las ITR son los elementos genéticos responsables de la replicación y el empaquetamiento del genoma durante la producción del vector y son los únicos elementos cis virales necesarios para generar rAAV. En una forma de realización, las ITR son de un AAV diferente del que administra una cápside. En una forma de realización preferida, las secuencias de ITR de AAV2, o la versión eliminada de estas (Δ ITR), se pueden usar por conveniencia y para acelerar la aprobación reguladora. Sin embargo, se pueden seleccionar ITR de otras fuentes de AAV. Cuando la fuente de las ITR es de AAV2 y la cápside de AAV es de otra fuente de AAV, el vector resultante puede denominarse pseudotipado. Por lo general, el genoma del vector de AAV comprende una ITR de AAV 5', las secuencias codificantes NAGLU y cualquier secuencia reguladora, y una ITR de AAV 3'. Sin embargo, pueden ser adecuadas otras configuraciones de estos elementos. Se ha descrito una versión acortada de la ITR 5', denominada Δ ITR, en la que se eliminan la secuencia D y el sitio de resolución terminal (trs). En otras formas de realización, se usan las ITR 5' y 3' de AAV de longitud completa.

Como se usa en la presente, el término "AAV" se refiere a virus adenoasociados naturales, virus adenoasociados disponibles para una persona del oficio de nivel medio y/o a la luz de las composiciones y métodos descritos en la presente, así como también AAV artificial. Un vector viral de virus adenoasociado (AAV) es una partícula resistente a DNasa de AAV que tiene una cápside de la proteína de AAV en la que se empaqueta un casete de expresión flanqueado por secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV para la administración a células diana. Una cápside de AAV está compuesto por 60

subunidades proteicas de la cápside (cap), VP1, VP2 y VP3, que se disponen en una simetría icosaédrica en una relación de aproximadamente 1:1:10 a 1:1:20, según el AAV seleccionado. Se pueden seleccionar diversos AAV como fuentes de cápsides de vectores virales de AAV como se identifican anteriormente. Ver, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense publicada N.º 2007-0036760-A1; la solicitud de patente estadounidense publicada N.º 2009-0197338-A1; EP 1310571. Ver también WO 2003/042397 (AAV7 y otros AAV de simio), la patente estadounidense 7790449 y la patente estadounidense 7282199 (AAV8), WO 2005/033321, US 7.906.111 (AAV9), WO 2006/110689 y WO 2003/042397 (rh.10). Estos documentos también describen otros AAV que se pueden seleccionar para generar AAV y se incorporan por referencia. Entre los AAV aislados o diseñados por ingeniería genética de primates humanos o no humanos (NHP) y caracterizados, el AAV2 humano es el primer AAV que se desarrolló como un vector de transferencia génica; se ha usado ampliamente para experimentos de transferencia génica eficaz en diferentes tejidos diana y modelos animales. A menos que se especifique lo contrario, la cápside de AAV, ITR y otros componentes de AAV seleccionados descritos en la presente se pueden seleccionar fácilmente de cualquier AAV, que incluye, entre otros, el AAV identificado comúnmente como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV8bp, AAVrh10, AAVhu37, AAV7M8 y AAVAnc80, variantes de cualquiera de los AAV conocidos o mencionados o AAV aún no descubiertos o variantes o mezclas de estos. Ver, por ejemplo, WO 2005/033321, que se incorpora en la presente por referencia. En una forma de realización, la cápside de AAV es una cápside de AAV9 cápside o una variante de esta. En ciertas formas de realización, la proteína de la cápside se diseña mediante un número o una combinación de números y letras tras el término "AAV" en el nombre del vector de rAAV.

Como se usa en la presente, con relación a AAV, el término "variante" significa cualquier secuencia de AAV que deriva de una secuencia de AAV conocida, que incluye aquellas con un reemplazo de aminoácido conservador, y aquellas que comparten al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 99 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos. En otra forma de realización, la cápside de AAV incluye variantes que pueden incluir hasta alrededor de 10 % de variación de cualquier secuencia de cápside de AAV descrita o conocida. Es decir, la cápside de AAV comparte de alrededor de 90 % de identidad a alrededor de 99,9 % de identidad, de alrededor de 95 % a alrededor de 99 % de identidad o de alrededor de 97 % a alrededor de 98 % de identidad con una cápside de AAV proporcionada en la presente y/o conocida en la técnica. En una forma

de realización, la cápside de AAV comparte al menos 95 % de identidad con una cápside de AAV. Cuando se determina el porcentaje de identidad de una cápside de AAV, la comparación se puede hacer con cualquiera de las proteínas variables (por ejemplo, vp1, vp2 o vp3).

Las ITR u otros componentes de AAV se pueden aislar o diseñar por ingeniería genética fácilmente mediante el uso de técnicas disponibles para las personas del oficio de nivel medio a partir de un AAV. Tal AAV se puede aislar, diseñar por ingeniería genética u obtener de fuentes académicas, comerciales o públicas (por ejemplo, la American Type Culture Collection, Manassas, VA). Alternativamente, las secuencias de AAV se pueden diseñar por ingeniería genética mediante medios de síntesis u otros adecuados por referencia a secuencias publicadas, tales como las disponibles en la literatura o en bases de datos tales como, por ejemplo, GenBank, PubMed o similares. Un virus AAV se puede diseñar por ingeniería genética mediante técnicas de biología molecular convencionales, lo que hace posible optimizar estas partículas para la administración específica de células de secuencias de ácidos nucleicos, para minimizar la inmunogenicidad, para ajustar la estabilidad y la vida de las partículas, para una degradación eficiente, para la administración precisa al núcleo, etc.

Como se usan en la presente, los términos "rAAV" y "AAV artificial" usados indistintamente significan, entre otros, un AAV que comprende una proteína de la cápside y un genoma del vector empaquetado en su interior, en donde el genoma del vector comprende un ácido nucleico heterólogo al AAV. En una forma de realización, la proteína de la cápside es una cápside no natural. Tal cápside artificial se puede generar mediante cualquier técnica adecuada, mediante el uso de una secuencia de AAV seleccionada (por ejemplo, un fragmento de una proteína de la cápside vp1) en combinación con secuencias heterólogas que se pueden obtener de un AAV seleccionado diferente, porciones no contiguas del mismo AAV, de una fuente viral no de AAV o de una fuente no viral. Un AAV artificial puede ser, entre otros, un AAV pseudotipado, una cápside del AAV quimérica, una cápside del AAV recombinante o una cápside del AAV "humanizada". Los vectores pseudotipados, en donde la cápside de un AAV se reemplaza con una proteína de la cápside heteróloga, son útiles en la invención. En una forma de realización, AAV2/5 y AAV2/8 son vectores pseudotipados de ejemplo. El elemento genético seleccionado puede administrarse mediante cualquier método adecuado, que incluye transfección, electroporación, administración de liposomas, técnicas de fusión de membrana, pélets recubiertos con ADN de alta velocidad, infección viral y fusión de protoplastos. Los métodos utilizados para elaborar tales constructos son conocidos por las personas del

oficio de nivel medio en la manipulación de ácidos nucleicos e incluyen diseño por ingeniería genética, diseño por ingeniería genética recombinante y técnicas de síntesis. Ver, por ejemplo, Green y Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

Como se usa en la presente, "cápside de AAV9" se refiere al AAV9 que tiene la secuencia de aminoácidos de (a) acceso a GenBank: AAS99264, que se incorpora en la presente por referencia, y la proteína de la cápside vp1 de AAV se reproduce SEQ ID NO: 17 y/o (b) la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de acceso a GenBank: AY530579.1: (nt 1...2211) (reproducida en SEQ ID NO: 16). La presente invención contempla alguna variación de esta secuencia codificada, que puede incluir secuencias que tienen alrededor de 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos a la que se hace referencia en acceso a GenBank: AAS99264 y US7906111 (también WO 2005/033321) (es decir, menos de alrededor de 1 % de variación de la secuencia a la que se hace referencia). Tal AAV puede incluir, por ejemplo, cepas aisladas naturales (por ejemplo, hu68, hu31 o hu32), o variantes de AAV9 que tienen sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos, por ejemplo, que incluyen, entre otras, sustituciones de aminoácidos seleccionadas de residuos alternativos "reclutados" de la posición correspondiente en cualquier otra cápside de AAV alineada con la cápside de AAV9; por ejemplo, tal como se describe en US 9.102,949, US 8.927.514, US2015/349911; WO 2016/049230A1; US 9.623.120; US 9.585.971. Sin embargo, en otras formas de realización, se pueden seleccionar otras variantes de AAV9, o cápsides de AAV9 que tienen al menos alrededor de 95 % de identidad con las secuencias mencionadas anteriormente. Ver, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense publicada N.º 2015/0079038. Se han descrito métodos para generar la cápside, secuencias codificantes de esta y métodos para la producción de vectores virales de rAAV. Ver, por ejemplo, Gao *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (10), 6081-6086 (2003) y US 2013/0045186A1.

AAVhu68 varía de otro virus AAV9 del clado F en dos aminoácidos codificados en las posiciones 67 y 157 de vp1, SEQ ID NO: 9. Por el contrario, el otro AAV del clado F (AAV9, hu31, hu31) tiene una Ala en la posición 67 y una Ala en la posición 157. Se proporcionan novedosas cápsides AAVhu68 y/o cápsides de AAV diseñadas por ingeniería genética que tienen valina (Val o V) en la posición 157 en función de la numeración de SEQ ID NO: 9 y, opcionalmente, un ácido glutámico (Glu o E) en la posición 67. Ver también WO 2018/160582, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad (que incluye el listado de secuencias).

Como se usa en la presente, el término "clado", en relación a grupos de AAV, se refiere a grupos de AAV filogenéticamente relacionados entre sí según se determina mediante un algoritmo Neighbor-Joining mediante un valor de remuestreo (*bootstrap*) de al menos 75 % (de al menos 1000 réplicas) y una medición de distancia de corrección de Poisson no mayor de 0,05, en función de la alineación de la secuencia de aminoácidos de vp1 de AAV. El algoritmo Neighbor-Joining se describió en la literatura. Ver, por ejemplo, M. Nei y S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics* (Oxford University Press, Nueva York (2000)). Hay disponibles programas informáticos que se pueden usar para implementar este algoritmo. Por ejemplo, el programa MEGA v2.1 implementa el método Nei-Gojobori modificado. Mediante estas técnicas y programas informáticos, y la secuencia de una proteína de la cápside vp1 de AAV, una persona del oficio de nivel medio puede determinar si un AAV seleccionado está contenido en uno de los clados identificados en la presente, en otro clado o fuera de estos clados. Ver, por ejemplo, G Gao, *et al*, *J Virol*, junio de 2004; 78(10: 6381-6388, que identifica los clados A, B, C, D, E y F y proporciona secuencias de ácidos nucleicos de un AAV novedoso, números de acceso a GenBank AY530553 a AY530629. Ver también WO 2005/033321.

En ciertas formas de realización, una cápside AAV68 se caracteriza además por uno o más de los siguientes. Las proteínas de la cápside AAV hu68 comprenden: proteínas vp1 de AAVhu68 producidas mediante la expresión a partir de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos prevista de 1 a 736 de SEQ ID NO: 8, proteínas vp1 producidas a partir de SEQ ID NO: 9 o proteínas vp1 producidas a partir de una secuencia de ácidos nucleicos al menos 70 % idéntica a SEQ ID NO: 8 que codifica la secuencia de aminoácidos prevista de 1 a 736 de SEQ ID NO: 9; proteínas vp2 AAVhu68 producidas mediante la expresión a partir de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos prevista de al menos los aminoácidos de alrededor de 138 a 736 de SEQ ID NO: 9, proteínas vp2 producidas a partir de una secuencia que comprende al menos los nucleótidos 412 a 2211 de SEQ ID NO: 8 o proteínas vp2 producidas a partir de una secuencia de ácidos nucleicos al menos 70 % idéntica a al menos los nucleótidos 412 a 2211 de SEQ ID NO: 8 que codifica la secuencia de aminoácidos prevista de al menos los aminoácidos de alrededor de 138 a 736 de SEQ ID NO: 9 y/o proteínas vp3 AAVhu68 producidas mediante la expresión a partir de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos prevista de al menos los aminoácidos de alrededor de 203 a 736 de SEQ ID NO: 9, proteínas vp3 producidas a partir de una secuencia que comprende al menos los nucleótidos 607 a 2211 de SEQ ID NO: 8 o proteínas vp3 producidas a partir de una

secuencia de ácidos nucleicos al menos 70 % idéntica a al menos los nucleótidos 607 a 2211 de SEQ ID NO: 8 que codifica la secuencia de aminoácidos prevista de al menos los aminoácidos de alrededor de 203 a 736 de SEQ ID NO: 9.

Las proteínas vp1, vp2 y vp3 de AAVhu68 se expresan por lo general como variantes de empalme alternativas codificadas por la misma secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de vp1 de longitud completa de SEQ ID NO: 9 (aminoácidos 1 a 736). Opcionalmente, la secuencia que codifica vp1 se usa sola para expresar las proteínas vp1, vp2 y vp3. Alternativamente, esta secuencia se puede coexpresar con uno o más de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de vp3 AAVhu68 de SEQ ID NO: 9 (alrededor de aa 203 a 736) sin la región única de vp1 (alrededor de aa 1 a alrededor de 137) y/o la región única de vp2 (alrededor de aa 1 a alrededor de 202), o una cadena complementaria de esta, el mRNA o tARN correspondiente (alrededor de nt 607 a alrededor de nt 2211 de SEQ ID NO: 8), o una secuencia al menos 70 % a al menos 99 % (por ejemplo, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %) idéntica a SEQ ID NO: 8 que codifica los aa 203 a 736 de SEQ ID NO: 9. De manera adicional o alternativa, la secuencia que codifica vp1 y/o que codifica vp2 puede coexpresarse con la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de vp2 AAVhu68 de SEQ ID NO: 9 (alrededor de aa 138 a 736) sin la región única de vp1 (alrededor de aa 1 a alrededor de 137), o una cadena complementaria de esta, el mRNA o tARN correspondiente (nt 412 a 22121 de SEQ ID NO: 8), o una secuencia al menos 70 % a al menos 99 % (por ejemplo, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %) idéntica a SEQ ID NO: 8 que codifica alrededor de aa 138 a 736 de SEQ ID NO: 9.

Como se describe en la presente, un rAAVhu68 tiene una cápside rAAVhu68 producida en un sistema de producción que expresa cápsides a partir de un ácido nucleico de AAVhu68 que codifica la secuencia de aminoácidos de vp1 de SEQ ID NO: 9, y opcionalmente secuencias de ácidos nucleicos adicionales, por ejemplo, que codifican una proteína vp3 libre de las regiones únicas de vp1 y/o vp2. El rAAVhu68 que resulta de la producción mediante el uso de una única secuencia de ácidos nucleicos de vp1 produce las poblaciones heterogéneas de las proteínas vp1, proteínas vp2 y proteínas vp3. Más particularmente, la cápside AAVhu68 contiene subpoblaciones dentro las proteínas vp1, dentro de las proteínas vp2 y dentro de las proteínas vp3 que tienen modificaciones de los residuos de aminoácidos previstos en SEQ ID NO: 9. Estas subpoblaciones incluyen, como mínimo, residuos de asparagina desamidada (N o Asn).

Por ejemplo, las asparaginas en los pares asparagina - glicina están altamente desamidados.

En una forma de realización, la secuencia de ácidos nucleicos de vp1 de AAVhu68 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 8, o una cadena complementaria de esta, por ejemplo, el mRNA o tARN correspondiente. En ciertas formas de realización, las proteínas vp2 y/o vp3 se pueden expresar de manera adicional o alternativa a partir de secuencias de ácidos nucleicos diferentes de la vp1, por ejemplo, para alterar la relación de las proteínas vp en un sistema de expresión seleccionado. En ciertas formas de realización, también se proporciona una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de vp3 AAVhu68 de SEQ ID NO: 9 (alrededor de aa 203 a 736) sin la región única de vp1 (alrededor de aa 1 a alrededor de aa 137) y/o regiones únicas de vp2 (alrededor de aa 1 a alrededor de aa 202), o una cadena complementaria de esta, el mRNA o tARN correspondiente (alrededor de nt 607 a alrededor de nt 2211 de SEQ ID NO: 8). En ciertas formas de realización, también se proporciona una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de vp2 AAVhu68 de SEQ ID NO: 9 (alrededor de aa 138 a 736) sin la región única de vp1 (alrededor de aa 1 a alrededor de 137), o una cadena complementaria de esta, el mRNA o tARN correspondiente (nt 412 a 2211 de SEQ ID NO: 8).

Sin embargo, se pueden seleccionar otras secuencias de ácidos nucleicos que codifican la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 para usar en la producción de cápsides rAAVhu68. En ciertas formas de realización, la secuencia de ácidos nucleicos tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia al menos 70 % a 99 % idéntica, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 8 que codifica SEQ ID NO: 9. En ciertas formas de realización, la secuencia de ácidos nucleicos tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia al menos 70 % a 99 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 99 % idéntica a alrededor de nt 412 a alrededor de nt 2211 de SEQ ID NO: 8 que codifica la proteína de la cápside vp2 (alrededor de aa 138 a 736) de SEQ ID NO: 9. En ciertas formas de realización, la secuencia de ácidos nucleicos tiene la secuencia de ácidos nucleicos de alrededor de nt 607 a alrededor de nt 2211 de SEQ ID NO: 8 o una secuencia al menos 70 % a 99 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 99 % idéntica a nt SEQ ID NO: 8 que codifica la proteína de la cápside vp3 (alrededor de aa 203 a 736) de SEQ ID NO: 9.

En ciertas formas de realización, la cápside AAVhu68 se produce mediante el uso de una

secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 99 % idéntica, que codifica la secuencia de aminoácidos de vp1 de SEQ ID NO: 9 con una modificación (por ejemplo, aminoácido desamidado) como se describe en la presente. En ciertas formas de realización, la secuencia de aminoácidos de vp1 se reproduce en SEQ ID NO: 9.

Como se usa en la presente, cuando se usa para referirse a las proteínas de la cápside vp, el término "heterogéneo" o cualquier variación gramatical de este, se refiere a una población que consiste en elementos que no son los mismos, por ejemplo, que tienen monómeros (proteínas) vp1, vp2 o vp3 con diferentes secuencias de aminoácidos modificadas. SEQ ID NO: 9 proporciona la secuencia de aminoácidos codificada de la proteína vp1 de AAVhu68. El término "heterogéneo", como se usa en relación con las proteínas vp1, vp2 y vp3 (alternativamente denominadas isoformas), se refiere a diferencias en la secuencia de aminoácidos de las proteínas vp1, vp2 y vp3 dentro de una cápside. La cápside de AAV contiene subpoblaciones dentro de las proteínas vp1, dentro de las proteínas vp2 y dentro de las proteínas vp3 que tienen modificaciones de los residuos de aminoácidos previstos. Como mínimo, estas subpoblaciones incluyen ciertos residuos de asparagina (N o Asn) desamidados. Por ejemplo, ciertas subpoblaciones comprenden al menos una, dos, tres o cuatro posiciones de asparaginas (N) altamente desamidadas en pares asparagina - glicina y comprenden además opcionalmente otros aminoácidos desamidados, en donde la desamidación da como resultado un cambio de aminoácido y otras modificaciones opcionales.

Como se usa en la presente, una "subpoblación" de proteínas vp se refiere a un grupo de proteínas vp que tiene al menos una característica definida en común y que consiste en de al menos un miembro del grupo a menos que todos los miembros del grupo de referencia, a menos que se especifique lo contrario.

Por ejemplo, una "subpoblación" de proteínas vp1 es al menos una (1) proteína vp1 y menos que todas las proteínas vp1 en una cápside de AAV ensamblada, a menos que se especifique lo contrario. Una "subpoblación" de proteínas vp3 puede ser de una (1) proteína vp3 a menos que todas las proteínas vp3 en una cápside de AAV ensamblada, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, las proteínas vp1 pueden ser una subpoblación de proteínas vp; las proteínas vp2 pueden ser una subpoblación separada de proteínas vp, y vp3 es aun otra subpoblación de proteínas vp en una cápside de AAV ensamblada. En otro ejemplo, las proteínas vp1, vp2 y vp3 pueden contener subpoblaciones que tienen modificaciones diferentes, por ejemplo, al menos una, dos,

tres o cuatro asparaginas altamente desamidadas, por ejemplo, en pares asparagina - glicina.

A menos que se especifique lo contrario, altamente desamidado se refiere a al menos 45 % desamidado, al menos 50 % desamidado, al menos 60 % desamidado, al menos 65 % desamidado, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 99 %, o hasta alrededor de 100 % desamidado en una posición de aminoácido de referencia, en comparación con la secuencia de aminoácidos prevista en la posición de aminoácido de referencia (por ejemplo, al menos 80 % de las asparaginas en el aminoácido 57 en función de la numeración de SEQ ID NO: 9 [AAVhu68] se puede desamidar en función de las proteínas vp1 totales, se puede desamidar en función de las proteínas vp1, vp2 y vp3 totales). Tales porcentajes pueden determinarse mediante técnicas de gel 2D, espectrometría de masas u otras técnicas adecuadas.

La proteína de la cápside AAVhu68, 4 residuos (N57, N329, N452, N512) muestran habitualmente niveles de desamidación >70 % y en la mayoría de los casos >90 % en varios lotes. Los residuos de asparagina adicionales (N94, N253, N270, N304, N409, N477 y Q599) también muestran niveles de desamidación de hasta ~20 % en varios lotes. Los niveles de desamidación se identificaron inicialmente usando una digestión con tripsina y se verificaron con una digestión con quimotripsina.

La cápside AAVhu68 contiene subpoblaciones dentro las proteínas vp1, dentro de las proteínas vp2 y dentro de las proteínas vp3 que tienen modificaciones de los residuos de aminoácidos previstos en SEQ ID NO: 9. Como mínimo, estas subpoblaciones incluyen ciertos residuos de asparagina (N o Asn) desamidados. Por ejemplo, ciertas subpoblaciones comprenden al menos una, dos, tres o cuatro posiciones de asparaginas (N) altamente desamidadas en pares asparagina - glicina en SEQ ID NO: 9 y opcionalmente comprenden además otros aminoácidos desamidados, en donde la desamidación da como resultado un cambio de aminoácido y otras modificaciones opcionales.

En otras formas de realización, el método implica aumentar el rendimiento de un rAAV y, por ende, aumentar la cantidad de un rAAV que está presente en sobrenadante antes del lisado celular o sin necesidad de este. Este método implica diseñar por ingeniería genética un gen de la cápside de AAV VP1 para expresar una proteína de la cápside que tiene Glu en la posición 67, Val en la posición 157 o ambos en función de una alineación que tiene la enumeración de aminoácidos de la proteína de la cápside AAVhu68 vp1. En

otras formas de realización, el método implica diseñar por ingeniería genética el gen de la cápside de VP2 para expresar una proteína de la cápside que tiene Val en la posición 157. Aun en otras formas de realización, el rAAV tiene una cápside modificada que comprende ambas proteínas de la cápside vp1 y vp2 que tienen Glu en la posición 67 y Val en la posición 157.

En ciertas formas de realización, el rAAV descrito en la presente es un AAV autocomplementario. "AAV autocomplementario" se refiere a un constructo en el que una región codificante transportada por una secuencia de ácidos nucleicos de AAV recombinante se diseñó para formar una plantilla de ADN bicatenario intramolecular. Tras la infección, en lugar de esperar la síntesis mediada por células de la segunda cadena, las dos mitades complementarias de scAAV se asociarán para formar una unidad de ADN bicatenario (dsADN) que está lista para la replicación y transcripción inmediatas. Ver, por ejemplo, D M McCarty et al, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", *Gene Therapy* (agosto de 2001), volumen 8, número 16, páginas 1248-1254. Se describen AAV autocomplementarios en, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 6.596.535; 7.125.717 y 7.456.683, cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

En ciertas formas de realización, el rAAV descrito en la presente es resistente a nucleasa. Tal nucleasa puede ser una sola nucleasa, o mezclas de nucleasas, y puede ser endonucleasas o exonucleasas. Un rAAV resistente a nucleasa indica que la cápside de AAV se ensambló por completo y protege estas secuencias genómicas empaquetadas de la degradación (digestión) durante las etapas de incubación de nucleasa diseñadas para eliminar los ácidos nucleicos contaminantes que pueden estar presentes a partir del proceso de producción. En muchos casos, el rAAV descrito en la presente es resistente a DNasa.

El virus adenoasociado (AAV) recombinante descrito en la presente puede generarse mediante técnicas conocidas. Ver, por ejemplo, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2. Tal método implica cultivar una célula huésped que contiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cápside de AAV; un gen rep funcional; un casete de expresión descrito en la presente flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV; y suficientes funciones auxiliares para permitir el empaquetamiento del casete de expresión en la proteína de la cápside de AAV. También se proporciona en la presente la célula huésped que contiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cápside de AAV; un gen rep funcional; un genoma del vector

como se describe; y suficientes funciones auxiliares para permitir el empaquetamiento del genoma del vector en la proteína de la cápside de AAV. En una forma de realización, la célula huésped es una célula HEK 293. Estos métodos se describen con mayor detalle en WO2017160360 A2, que se incorpora por referencia en la presente.

Se pueden utilizar otros métodos para producir rAAV disponibles para una persona del oficio de nivel medio. Los métodos adecuados pueden incluir, entre otros, sistema de expresión de baculovirus o producción mediante levadura. Ver, por ejemplo, Robert M. Kotin, Large-scale recombinant adeno-associated virus production. *Hum Mol Genet.* 15 de abril de 2011; 20(R1): R2–R6. Publicado en línea el 29 de abril de 2011. doi: 10.1093/hmg/ddr141; Aucoin MG *et al.*, Production of adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: optimization of baculovirus concentration ratios. *Biotechnol Bioeng.* 20 de diciembre de 2006;95(6):1081-92; SAMI S. THAKUR, Production of Recombinant Adeno-associated viral vectors in yeast. Tesis presentada en la Escuela de Posgrado de la Universidad de Florida (*Graduate School of the University of Florida*), 2012; Kondratov O *et al.* Direct Head-to-Head Evaluation of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors Manufactured in Human versus Insect Cells, *Mol Ther.* 10 de agosto de 2017. pii: S1525-0016(17)30362-3. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.08.003. (Epub antes de versión impresa); Mietzsch M *et al.*, OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV1, AAV2, and AAV8 Vectors with Minimal Encapsidation of Foreign DNA. *Hum Gene Ther Methods.* Febrero de 2017;28(1):15-22. doi: 10.1089/hgtb.2016.164.; Li L *et al.* Production and characterization of novel recombinant adeno-associated virus replicative-form genomes: a eukaryotic source of DNA for gene transfer. *PLoS One.* 1 de agosto de 2013;8(8):e69879. doi: 10.1371/journal.pone.0069879. Print 2013; Galibert L *et al.*, Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases. *J Invertebr Pathol.* julio de 2011;107 Supl:S80-93. doi: 10.1016/j.jip.2011.05.008; y Kotin RM, Large-scale recombinant adeno-associated virus production. *Hum Mol Genet.* 15 de abril de 2011;20(R1):R2-6. doi: 10.1093/hmg/ddr141. Epub del 29 de abril de 2011.

Se utiliza una purificación mediante cromatografía de afinidad en dos etapas a alta concentración de sal seguida de una cromatografía de resina de intercambio aniónico para purificar el producto farmacológico de vector y eliminar las cápsides vacías. Estos métodos se describen con mayor detalle en WO 2017/160360, que se titula "Scalable Purification Method for AAV9" y que se incorpora en la presente por referencia. En resumen, el método para separar partículas de rAAV9 que tienen secuencias genómicas empaquetadas de intermediarios de AAV9 de genoma deficiente implica someter una

suspensión que comprende partículas virales de AAV9 recombinante e intermediarios de la cápside de AAV9 a cromatografía de líquidos de rendimiento rápido, en donde las partículas virales de AAV9 y los intermediarios de AAV9 se fijan a una resina de intercambio aniónico fuerte equilibrada a un pH de 10,2, y se someten a un gradiente de sal mientras se monitorea el eluato para la absorbancia ultravioleta a alrededor de 260 y alrededor de 280. Si bien es menos óptimo para rAAV9, el pH puede estar en el rango de alrededor de 1,0 a 10,4. En este método, las cápsides completas de AAV9 se recolectan de una fracción que se eluye cuando la relación A260/A280 alcanza un punto de inflexión. En un ejemplo, para la etapa de cromatografía de afinidad, el producto diafiltrado se puede aplicar a una resina de afinidad Capture Select™ Poros-AAV2/9 (Life Technologies) que captura de manera eficiente el serotipo AAV2/9. En estas condiciones iónicas, un porcentaje significativo de ADN celular residual y proteínas fluye a través de la columna, mientras que las partículas de AAV se capturan de manera eficiente.

Una persona del oficio tiene disponibles métodos convencionales para caracterizar o cuantificar rAAV. Para calcular el contenido de partículas vacías y llenas, los volúmenes de banda de VP3 para una muestra seleccionada (por ejemplo, en los ejemplos en la presente, una preparación purificada con gradiente de iodixanol donde # de GC = # de partículas) se representan en comparación con las partículas de GC cargadas. La ecuación lineal resultante ($y = mx + c$) se usa para calcular la cantidad de partículas en los volúmenes de banda de los picos del artículo de prueba. La cantidad cargada de partículas (pt) por 20 μ l se multiplica luego por 50 para obtener las partículas (pt)/ml. Pt/ml dividido por GC/ml proporciona la relación de partículas con respecto a copias del genoma (pt/GC). Pt/ml-GC/ml proporciona pt/ml vacías. Las pt/ml vacías divididas por pt/ml y x 100 proporciona el porcentaje de partículas vacías. Generalmente, en la técnica se conocen métodos para analizar cápsides vacías y partículas de vector de AAV con genomas empaquetados. Ver, por ejemplo, Grimm *et al.*, Gene Therapy (1999) 6:1322-1330; Sommer *et al.*, Molec. Ther. (2003) 7: 122-128. Para evaluar la cápside desnaturalizada, los métodos incluyen someter la reserva de AAV tratada a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, que consiste en cualquier gel capaz de separar las tres proteínas de la cápside, por ejemplo, un gel de gradiente que contiene 3-8 % de tris-acetato en el amortiguador, luego hacer correr el gel hasta que el material de muestra se separe y transferir el gel a membranas de nylon o nitrocelulosa, preferentemente nylon. Los anticuerpos de la cápside anti-AAV se utilizan luego como anticuerpos primarios que se fijan a las proteínas de la cápside desnaturalizadas, preferentemente un anticuerpo monoclonal de la cápside anti-AAV, con máxima preferencia el anticuerpo monoclonal B1

anti-AAV-2 (Wobus *et al.*, J. Viral. (2000) 74:9281-9293). Luego se usa un anticuerpo secundario, uno que se fija al anticuerpo primario y contiene un medio para detectar la fijación con el anticuerpo primario, con mayor preferencia un anticuerpo anti-IgG que contiene una molécula de detección fijada covalentemente a él, con máxima preferencia un anticuerpo anti-IgG de ratón en oveja fijado covalentemente a la peroxidasa de rábano picante. Se usa un método para detectar la fijación para determinar semicuantitativamente la unión entre los anticuerpos primarios y secundarios, preferentemente un método de detección capaz de detectar emisiones de isótopos radiactivos, radiación electromagnética o cambios colorimétricos, con máxima preferencia un kit de detección por quimioluminiscencia. Por ejemplo, para SDS-PAGE, las muestras de las fracciones de la columna se pueden tomar y calentar en amortiguador de carga SDS-PAGE que contiene agente reductor (por ejemplo, DTT), y las proteínas de la cápside se resolvieron en geles de poliacrilamida de gradiente prefabricados (por ejemplo, Novex). La tinción con plata se puede realizar con SilverXpress (Invitrogen, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante u otro método de tinción adecuado, es decir, tinciones SYPRO Ruby o Coomassie. En una forma de realización, la concentración de genomas del vector (vg) de AAV en fracciones de columna se puede medir mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR). Las muestras se diluyen y se digieren con DNasa I (u otra nucleasa adecuada) para eliminar el ADN exógeno. Después de la inactivación de la nucleasa, las muestras se diluyen y se amplifican adicionalmente con cebadores y una sonda fluorogénica TaqMan™ específica para la secuencia de ADN entre los cebadores. La cantidad de ciclos necesarios para alcanzar un nivel definido de fluorescencia (umbral de ciclo, Ct) se mide para cada muestra en un sistema de detección de secuencias Applied Biosystems Prism 7700. Se emplea ADN plasmídico que contiene secuencias idénticas a la contenida en el vector de AAV para generar una curva estándar en la reacción de Q-PCR. Se utilizan los valores de umbral de ciclo (Ct) obtenidos de las muestras para determinar el título del genoma del vector al normalizarlo al valor de Ct de la curva estándar del plásmido. También se pueden utilizar ensayos de punto final en función de la PCR digital.

En un aspecto, se usa un método de q-PCR optimizado que utiliza una serina proteasa de amplio espectro, por ejemplo, proteinasa K (tal como está disponible en el comercio a través de Qiagen). Más particularmente, el ensayo de título del genoma de qPCR optimizado es similar a un ensayo estándar, excepto que, después de la digestión con DNasa I, las muestras se diluyen con amortiguador de proteinasa K y se tratan con proteinasa K, y luego inactivación por calor. De manera adecuada, las muestras se

diluyen con amortiguador de proteinasa K en una cantidad igual al tamaño de la muestra. El amortiguador de proteinasa K puede concentrarse al doble o más. Generalmente, el tratamiento con proteinasa K es de alrededor de 0,2 mg/ml, pero puede variar de 0,1 mg/ml a alrededor de 1 mg/ml. La etapa de tratamiento se realiza generalmente a alrededor de 55 °C durante alrededor de 15 minutos, pero puede realizarse a una temperatura más baja (por ejemplo, de alrededor de 37 °C a alrededor de 50 °C) durante un período de tiempo más largo (por ejemplo, de alrededor de 20 minutos a alrededor de 30 minutos), o una temperatura más alta (por ejemplo, hasta alrededor de 60 °C) durante un período de tiempo más corto (por ejemplo, de alrededor de 5 a 10 minutos). De manera similar, la inactivación por calor es generalmente a alrededor de 95 °C durante alrededor de 15 minutos, pero la temperatura puede reducirse (por ejemplo, de alrededor de 70 a alrededor de 90 °C) y el tiempo puede prolongarse (por ejemplo, de alrededor de 20 minutos a alrededor de 30 minutos). Después, las muestras se diluyen (por ejemplo, 1000 veces) y se someten a análisis TaqMan como se describe en el ensayo estándar.

Además, o alternativamente, se puede usar PCR digital en gotas (ddPCR). Por ejemplo, se han descrito métodos para determinar los títulos del genoma del vector de AAV monocatenario y autocomplementario mediante ddPCR. Ver, por ejemplo, M. Lock *et al.*, Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods. Abril de 2014;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub del 14 de febrero de 2014.

También están disponibles métodos para determinar la relación entre vp1, vp2 y vp3 de la proteína de la cápside. Ver, por ejemplo, Vamseedhar Rayaprolu *et al.*, Comparative Analysis of Adeno-Associated Virus Capsid Stability and Dynamics, J Virol. Diciembre de 2013; 87(24): 13150–13160; Buller RM, Rose JA. 1978. Characterization of adenovirus-associated virus-induced polypeptides in KB cells. J. Virol. 25:331–338; y Rose JA, Maizel JV, Inman JK, Shatkin AJ. 1971. Structural proteins of adenovirus-associated viruses. J. Virol. 8:766–770.

Debe entenderse que se pretende que las composiciones en el rAAV descrito en la presente se apliquen a otras composiciones, regímenes, aspectos, formas de realización y métodos descritos a lo largo de la memoria descriptiva.

4. Composición farmacéutica

Una composición farmacéutica que comprende el casete de expresión que comprende el transgén y las secuencias diana de miARN puede ser una suspensión líquida, una composición liofilizada o congelada, u otra formulación adecuada. En ciertas formas de

realización, la composición comprende el casete de expresión y un líquido fisiológicamente compatible (por ejemplo, una solución, diluyente, portador) que forman una suspensión. Tal líquido es preferentemente de base acuosa y puede contener uno o más de los siguientes: agentes amortiguadores, tensioactivos, ajustadores de pH, conservantes u otros excipientes adecuados. Más adelante se analizan componentes adecuados con mayor detalle. La composición farmacéutica comprende el líquido de suspensión acuoso y cualesquier excipientes seleccionados, y el casete de expresión.

El casete de expresión que comprende el transgén y las secuencias diana de miARN es como se describe a lo largo de la memoria descriptiva en la presente. Por ejemplo, un casete de expresión puede ser una secuencia de ácidos nucleicos que comprende: (a) una secuencia codificante para el producto génico bajo el control de secuencias reguladoras que dirigen la expresión del producto génico en una célula que contiene el virus recombinante; (b) secuencias reguladoras que dirigen la expresión del producto génico en una célula; (c) una secuencia de región no traducida (UTR) 5' que está en sentido 5' de la secuencia codificante; (d) una secuencia UTR 3' que está en sentido 3' de la secuencia codificante; y e) al menos dos secuencias diana de miARN específicas de ganglio de la raíz dorsal (DRG) en tándem, en donde las al menos dos secuencias diana de miARN comprenden al menos una primera secuencia diana de miARN y al menos una segunda secuencia diana de miARN que puede ser igual o diferente.

En ciertas formas de realización, la composición farmacéutica comprende el casete de expresión que comprende el transgén y las secuencias diana de miARN y un sistema de administración no viral. Esto puede incluir, por ejemplo, ADN desnudo, ARN desnudo, una partícula inorgánica, un lípido o una partícula similar a lípido, una formulación a base de quitosano y otras conocidas en la técnica y descritas, por ejemplo, por Ramamoorth y Narvekar, como se citó anteriormente.

En otras formas de realización, la composición farmacéutica es una suspensión que comprende el casete de expresión que comprende el transgén y las secuencias diana de miARN y se diseña por ingeniería genética en un sistema de vectores virales o no virales. Un sistema de vectores no virales tal puede incluir, por ejemplo, un plásmido o elemento genético no viral, o un vector a base de proteína.

En ciertas formas de realización, la composición farmacéutica comprende un vector viral no replicante. Los vectores virales adecuados pueden incluir cualquier vector de administración adecuado, tal como, por ejemplo, un adenovirus recombinante, un lentivirus recombinante, un bocavirus recombinante, un virus adenoasociado

recombinante (AAV) u otro parvovirus recombinante. En ciertas formas de realización, el vector viral es un AAV recombinante para la administración de un producto génico a un paciente que lo necesite.

En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende el casete de expresión que comprende el transgén y las secuencias diana de miARN y un amortiguador de formulación adecuado para la administración mediante inyección intracerebroventricular (ICV), intratecal (IT), intracisternal o intravenosa (IV). En una forma de realización, el casete de expresión que comprende el transgén y las secuencias diana de miARN está empaquetado en un AAV recombinante.

En una forma de realización, una composición proporcionada en la presente comprende un tensioactivo, conservante, excipientes y/o amortiguador disuelto en el líquido de suspensión acuoso. En una forma de realización, el amortiguador es PBS. En otra forma de realización, el amortiguador es un líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF), por ejemplo, amortiguador de formulación de Elliott; o fluido de perfusión de aparato de Harvard (un CSF artificial con concentraciones iónicas finales (en mM): Na 150; K 3,0; Ca 1,4; Mg 0,8; P 1,0; Cl 155). Se conocen diversas soluciones adecuadas, que incluyen aquellas que incluyen uno o más de los siguientes: solución salina amortiguadora, un tensioactivo y una sal o mezcla de sales fisiológicamente compatible ajustada a una fuerza iónica equivalente a cloruro de sodio (NaCl) de alrededor de 100 mM a alrededor 250 mM, o una sal fisiológicamente compatible ajustada a una concentración iónica equivalente.

De manera adecuada, la formulación se ajusta a un pH adecuado desde el punto de vista fisiológico, por ejemplo, en el rango de pH 6 a 8, de pH 6,5 a 7,5, de pH 7,0 a 7,7 o de pH 7,2 a 7,8. Como el pH del líquido cefalorraquídeo es de alrededor de 7,28 a alrededor de 7,32, para la administración intratecal, puede ser conveniente un pH dentro de este rango; mientras que, para la administración intravenosa, puede ser conveniente un pH de 6,8 a alrededor de 7,2. Sin embargo, otros pH dentro de los rangos más amplios y estos subrangos pueden seleccionarse para otras vías de administración.

Un tensioactivo adecuado, o una combinación de tensioactivos, se puede seleccionar de tensioactivos no iónicos que no sean tóxicos. En una forma de realización, se selecciona un tensioactivo de copolímero en bloque disfuncional que termina en grupos hidroxilo primarios, por ejemplo, tal como Pluronic® F68 [BASF], también denominado Poloxámero 188, que tiene un pH neutro y un peso molecular promedio de 8400. Se pueden seleccionar otros tensioactivos y otros poloxámeros, es decir, copolímeros tribloque no iónicos compuestos por una cadena hidrófoba central de polioxipropilen(poli(óxido de

propileno)) flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietilen(poli(óxido de etileno)), SOLUTOL HS 15 (macrogol-15 hidroxistearato), LABRASOL (glicérido polioxi caprílico), oleil éter de polioxi 10, TWEEN (ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán), etanol y polietilenglicol. En una forma de realización, la formulación contiene un poloxámero. Estos copolímeros se denominan normalmente con la letra "P" (de poloxámero), seguida de tres dígitos: los dos primeros dígitos x 100 proporcionan la masa molecular aproximada del núcleo de polioxipropileno, y el último dígito x 10 proporciona el porcentaje de contenido de polioxietileno. En una forma de realización, se selecciona el Poloxámero 188. El tensioactivo puede estar presente en una cantidad de hasta alrededor de 0,0005 % a alrededor de 0,001 % de la suspensión.

En un ejemplo, la formulación puede contener, por ejemplo, solución salina amortiguada que comprende uno o más de cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, dextrosa, sulfato de magnesio (por ejemplo, sulfato de magnesio $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$), cloruro de potasio, cloruro de calcio (por ejemplo, cloruro de calcio $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosfato de sodio dibásico y mezclas de estos en agua. De manera adecuada, para administración intratecal, la osmolaridad está dentro de un rango compatible con el líquido cefalorraquídeo (por ejemplo, de alrededor de 275 a alrededor de 290); ver, por ejemplo, emedicine.medscape.com/article/2093316-overview. Opcionalmente, para administración intratecal, se puede usar un diluyente disponible en el comercio como un agente de suspensión, o en combinación con otro agente de suspensión y otros excipientes opcionales. Ver, por ejemplo, la solución Elliotts B® [Lukare Medical].

En otras formas de realización, la formulación puede contener uno o más mejoradores de la permeación. Los ejemplos de potenciadores de penetración adecuados pueden incluir, por ejemplo, manitol, glicolato de sodio, taurocolato de sodio, desoxicolato de sodio, salicilato de sodio, caprilato de sodio, caprato de sodio, lauril sulfato de sodio, polioxietilen-9-laurel éter o EDTA.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico y un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos descrita en la presente. Como se usa en la presente, "portador" incluye todos los solventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardadores de la absorción, amortiguadores, soluciones portadoras, suspensiones, coloides y similares. El uso de tales agentes mediáticos para sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. También se pueden incorporar ingredientes activos complementarios en las composiciones. Se pueden usar vehículos de

administración, tales como liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares, para la introducción de las composiciones de la presente invención en células huésped adecuadas. En particular, el vector de rAAV puede formularse para su administración encapsulado en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera o una nanopartícula o similares. En una forma de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho vector está incluida en la composición farmacéutica. La selección del portador no es una limitación de la presente invención. Otros portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico convencionales, tales como conservantes o estabilizantes químicos. Los conservantes de ejemplo adecuados incluyen clorobutanol, sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, galato de propilo, parabenos, etilvanilina, glicerina, fenol y paraclorofenol. Los estabilizantes químicos adecuados incluyen gelatina y albúmina.

La frase "aceptable desde el punto de vista farmacéutico" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción alérgica u otra reacción inadecuada similar cuando se administran a un huésped.

Como se usa en la presente, el término "dosis" o "cantidad" puede referirse a la dosis o cantidad total administrada al sujeto durante el tratamiento, o la dosis o cantidad administrada en la administración de una sola unidad (o múltiples unidades o dosis dividida).

La suspensión acuosa o las composiciones farmacéuticas descritas en la presente están diseñadas para la administración a sujetos que lo necesiten mediante cualquier vía adecuada o una combinación de diferentes vías.

En una forma de realización, la composición farmacéutica está formulada para la administración mediante inyección intracerebroventricular (ICV), intratecal (IT) o intracisternal. En una forma de realización, las composiciones descritas en la presente están diseñadas para la administración a sujetos que lo necesiten mediante inyección intravenosa. De manera alternativa, se pueden seleccionar otras vías de administración (por ejemplo, oral, inhalación, intranasal, intratraqueal, intraarterial, intraocular, intramuscular y otras vías parenterales).

Como se usa en la presente, la expresión "administración intratecal" se refiere a una vía de administración para fármacos mediante una inyección en el canal vertebral, más específicamente en el espacio subaracnoideo, de modo que alcance el líquido cefalorraquídeo (CSF). La administración intratecal puede incluir punción lumbar, intraventricular, suboccipital/intracisternal y/o punción C1-2. Por ejemplo, se puede

introducir material para su difusión por todo el espacio subaracnoideo mediante punción lumbar. En otro ejemplo, la inyección puede realizarse en la cisterna magna. La administración intracisternal puede aumentar la difusión de vectores y/o reducir la toxicidad y la inflamación causadas por la administración. Ver, por ejemplo, Christian Hinderer *et al.*, Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna, *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2014; 1: 14051. Publicado en línea el 10 de diciembre de 2014. doi: 10.1038/mtm.2014.51.

Como se usa en la presente, la expresión "administración intracisternal" se refiere a una vía de administración para fármacos directamente en el líquido cefalorraquídeo de los ventrículos cerebrales o dentro de la cisterna magna cerebelomedular, más específicamente mediante una punción suboccipital o mediante inyección directa en la cisterna magna o mediante un tubo posicionado de manera permanente.

En un aspecto, se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende un vector descrito en la presente en un amortiguador de formulación. En ciertas formas de realización, las composiciones de virus incapaz de replicarse se pueden formular en unidades de dosis que contengan una cantidad de virus incapaz de replicarse en el rango de alrededor de $1,0 \times 10^9$ GC a alrededor de $1,0 \times 10^{16}$ GC (para tratar a un sujeto promedio de 70 kg de peso corporal), lo cual incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del rango y, preferentemente, de $1,0 \times 10^{12}$ GC a $1,0 \times 10^{14}$ GC para un paciente humano. En una forma de realización, las composiciones se formulan con al menos 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 o 9×10^9 GC por dosis, lo cual incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del rango. En otra forma de realización, las composiciones se formulan con al menos 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} o 9×10^{10} GC por dosis, lo cual incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del rango. En otra forma de realización, las composiciones se formulan para que contengan al menos 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} o 9×10^{11} GC por dosis, incluso todos los números enteros o cantidades fraccionales dentro del rango. En otra forma de realización, las composiciones se formulan para que contengan al menos 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} o 9×10^{12} GC por dosis, incluso todos los números enteros o cantidades fraccionales dentro del rango. En otra forma de realización, las composiciones se formulan para que contengan al menos 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} o 9×10^{13} GC por dosis, incluso todos los números enteros o cantidades fraccionales dentro del rango. En otra forma de realización, las

composiciones se formulan para que contengan al menos 1×10^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} , 6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} o 9×10^{14} GC por dosis, incluso todos los números enteros o cantidades fraccionales dentro del rango. En otra forma de realización, las composiciones se formulan para que contengan al menos 1×10^{15} , 2×10^{15} , 3×10^{15} , 4×10^{15} , 5×10^{15} , 6×10^{15} , 7×10^{15} , 8×10^{15} o 9×10^{15} GC por dosis, incluso todos los números enteros o cantidades fraccionales dentro del rango. En una forma de realización, para la aplicación en seres humanos, la dosis puede variar de 1×10^{10} a alrededor de 1×10^{12} GC por dosis, lo cual incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del rango.

En una forma de realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un rAAV descrito en la presente en un amortiguador de formulación. En una forma de realización, el rAAV se formula a de alrededor de 1×10^9 copias del genoma (GC)/ml a alrededor de 1×10^{14} GC/ml. En una forma de realización adicional, el rAAV se formula a de alrededor de 3×10^9 GC/ml a alrededor de 3×10^{13} GC/ml. En aun otra forma de realización, el rAAV se formula a de alrededor de 1×10^9 GC/ml a alrededor de 1×10^{13} GC/ml. En una forma de realización, el rAAV se formula a al menos alrededor de 1×10^{11} GC/ml. En una forma de realización, la composición farmacéutica que comprende un rAAV descrito en la presente puede administrarse a una dosis de alrededor de 1×10^9 GC por gramo de masa cerebral a alrededor de 1×10^{14} GC por gramo de masa cerebral.

En ciertas formas de realización, la composición puede formularse en un medio de suspensión acuoso adecuado (por ejemplo, una solución salina amortiguada) para su administración mediante cualquier vía adecuada. Las composiciones proporcionadas en la presente son útiles para la administración sistémica de dosis altas de vector viral. Para rAAV, una dosis alta puede ser de al menos 1×10^{13} GC o al menos 1×10^{14} GC. Sin embargo, para una mayor seguridad, las secuencias de miARN proporcionadas en la presente pueden incluirse en casetes de expresión y/o genomas del vector que se administran a otras dosis más bajas.

En ciertas formas de realización, la composición se administra mediante dos vías diferentes esencialmente al mismo tiempo.

Debe entenderse que se pretende que las composiciones en la composición farmacéutica descrita en la presente se apliquen a otras composiciones, regímenes, aspectos, formas de realización y métodos descritos a lo largo de la memoria descriptiva.

5. Método de tratamiento

En ciertas formas de realización, las composiciones proporcionadas en la presente son útiles para administrar un producto transgénico deseado a un paciente, al tiempo que reprimen la expresión transgénica en neuronas de los ganglios de la raíz dorsal. El método implica administrar a un paciente una composición que comprende un casete de expresión que comprende el transgén y secuencias diana de miARN.

Ejemplos de transgenes adecuados que son útiles en el tratamiento de uno o más trastornos neurodegenerativos. Tales trastornos pueden incluir, entre otros, encefalopatías espongiformes transmisibles (por ejemplo, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob), distrofia muscular de Duchenne (DMD), miopatía miotubular y otras miopatías, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Canavan, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal (ATI335, anti-nogo1 de Novartis), migraña (ALD403 de Alder Biopharmaceuticals; LY2951742 de Eli; RN307 de Labrys Biologics), enfermedades de almacenamiento lisosomal, apoplejía y enfermedad infecciosa que afecta el sistema nervioso central. Los ejemplos de enfermedad de almacenamiento lisosomal incluyen, por ejemplo, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, enfermedad de Niemann-Pick, síndrome de Hunter, enfermedad de almacenamiento de glicógeno II (enfermedad de Pompe) o enfermedad de Tay-Sachs. Para algunas de estas afecciones, por ejemplo, DMD y miopatías, las composiciones proporcionadas en la presente son útiles para reducir o eliminar la axonopatía asociada con dosis altas de casetes de expresión (por ejemplo, transportadas por un vector viral) para la transducción o invención de músculo esquelético y cardíaco.

Aun otros ácidos nucleicos pueden codificar una inmunoglobulina que se dirige a la proteína que contiene dominio similar a la inmunoglobulina y de repetición rica en leucina 1 (LINGO-1), que es un componente funcional del receptor de Nogo y que está asociada con temblores esenciales en pacientes con esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson o temblores esenciales. Un anticuerpo disponible en el comercio tal es ocrelizumab (Biogen, B1B033). Ver, por ejemplo, la patente estadounidense 8.425.910. En una forma de realización, los constructos de ácido nucleico codifican constructos de inmunoglobulina útiles para pacientes con ALS. Los ejemplos de anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos contra la enzima de ALS superóxido dismutasa 1 (SOD1) y variantes de esta (por ejemplo, variante de ALS G93A, anticuerpo contra SOD1 C4F6); MS785, que se dirige a la región de fijación a Derlin-1; anticuerpos contra el inhibidor de brote de neuritas (NOGO-A o reticulón 4), por ejemplo, GSK1223249, ozanezumab (humanizado, GSK, también descrito como útil para la esclerosis múltiple). Se pueden diseñar o

seleccionar secuencias de ácidos nucleicos que codifican inmunoglobulinas útiles en pacientes que tienen la enfermedad de Alzheimer. Tales constructos de anticuerpo incluyen, por ejemplo, adumanucab (Biogen), Bapineuzumab (Eli Lilly, un mAb humanizado dirigido al terminal amino de A β); Solanezumab (Eli Lilly, un mAb humanizado contra la parte central de A β soluble); Gantenerumab (Chugai y Hoffmann-La Roche, es un mAb humano completo dirigido tanto contra el terminal amino como contra porciones centrales de A β); Crenezumab (Genentech, un mAb humanizado que actúa sobre epítomos monoméricos y conformacionales, incluso formas oligoméricas y protofibrilares de A β); BAN2401 (Eli Lilly, un mAb de inmunoglobulina humanizada G1 (IgG1) que se fija selectivamente a protofibrillas de A β y que se cree que mejora la depuración de las protofibrillas de A β y/o neutraliza sus efectos tóxicos sobre las neuronas en el cerebro); GSK 933776 (un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado dirigido contra el terminal amino de A β); AAB-001, AAB-002, AAB-003 (bapineuzumab diseñado por ingeniería genética con Fc); SAR228810 (un mAb humanizado dirigido contra protofibrillas y A β de bajo peso molecular); BIIB037/BART (una IgG1 humana completa contra A β humana fibrilar insoluble, Biogen Idec), un anticuerpo anti-A β tal como m266, tg2576 (especificidad relativa para oligómeros de A β) (Brody y Holtzman, *Annu Rev Neurosci*, 2008; 31: 175-193). Otros anticuerpos pueden dirigirse a proteínas beta-amiloides, A β , beta secretasa y/o la proteína tau. Aun en otras formas de realización, un anticuerpo anti- β -amiloide deriva de anticuerpos monoclonales IgG4 para dirigirse a β -amiloide para minimizar las funciones efectoras, o se selecciona un constructo distinto de un scFv que carece de una región Fc para evitar anomalías en las imágenes relacionadas con amiloide (ARIA) y una respuesta inflamatoria. En algunas de estas formas de realización, se usa la región variable de la cadena pesada y/o la región variable de la cadena liviana de uno o más de los constructos de scFv en otro constructo de inmunoglobulina adecuado proporcionado en la presente. Estos scFv y otras inmunoglobulinas diseñadas por ingeniería genética pueden reducir la semivida de la inmunoglobulina en el suero, en comparación con las inmunoglobulinas que contienen regiones Fc. Reducir la concentración sérica de las moléculas anti-amiloide puede reducir adicionalmente el riesgo de ARIA, ya que los niveles extremadamente altos de anticuerpos anti-amiloide en suero pueden desestabilizar los vasos cerebrales con una alta carga de placas amiloides, lo que produce permeabilidad vascular. Se pueden diseñar o diseñar por ingeniería genética ácidos nucleicos que codifican otros constructos de inmunoglobulina para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Parkinson a fin de que expresen constructos, incluso, por ejemplo, quinasa de repetición rica en leucina 2, anticuerpos contra la

dardarina (LRRK2); anticuerpos anti-sinucleína y alfa-sinucleína y anticuerpos contra DJ-1 (PARK7). Otros anticuerpos pueden incluir PRX002 (Prothena y Roche), enfermedad de Parkinson y sinucleinopatías relacionadas. Estos anticuerpos, particularmente los anticuerpos anti-sinucleína, también pueden ser útiles en el tratamiento de una o más enfermedades de almacenamiento lisosomal.

Se pueden diseñar por ingeniería genética o seleccionar constructos de ácido nucleico que codifican un constructo de inmunoglobulina para tratar la esclerosis múltiple. Tales inmunoglobulinas pueden incluir o derivar de anticuerpos tales como natalizumab (un anticuerpo anti-a4-ingrina humanizado, iNATA, Tysabri, Biogen Idec y Elan Pharmaceuticals), que se aprobó en 2006, alemtuzumab (Campath-1H, un anticuerpo anti-CD52 humanizado), rituximab (rituzina, un anticuerpo anti-CD20 quimérico), daclizumab (Zenepax, un anticuerpo anti-CD25 humanizado), ocrelizumab (humanizado, anti-CD20, Roche), ustekinumab (CNTO-1275, un anticuerpo anti-IL12 p40+IL23p40 humano); anti-LINGO-1, ch5D12 (un anticuerpo anti-CD40 quimérico) y rHlgM22 (un anticuerpo monoclonal remielinizado; Acorda y la Mayo Foundation for Medical Education and Research). Aun otros anticuerpos anti-a4-integrina, anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-CD52, anticuerpos anti-IL17, anti-CD19, anti-SEMA4D y anti-CD40 pueden administrarse mediante los vectores de AAV descritos en la presente.

La presente invención también contempla anticuerpos contra diversas infecciones del sistema nervioso central. Tales enfermedades infecciones pueden incluir enfermedades fúngicas tales como meningitis criptocócica, absceso cerebral, infección epidural espinal causada por, por ejemplo, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, orden Mucorales, *Aspergillus spp* y *Candida spp*; infección protozoaria, tal como toxoplasmosis, malaria y meningoencefalitis amebiana primaria, causada por agentes tales como, por ejemplo, *Toxoplasma gondii*, *Taenia solium*, *Plasmodium falciparum*, *Spirometra mansonoides* (esparganosis), *Echinococcus spp* (que produce neurohidatidosis) y amebiasis cerebral; infección bacteriana, tal como, por ejemplo, tuberculosis, lepra, neurosífilis, meningitis bacteriana, enfermedad de Lyme (*Borrelia burgdorferi*), fiebre maculosa de las montañas rocosas (*Rickettsia rickettsia*), nocardiosis del SNC (*Nocardia spp*), tuberculosis del SNC (*Mycobacterium tuberculosis*), listeriosis del SNC (*Listeria monocytogenes*), absceso cerebral y neuroborreliosis; infecciones virales, tales como, por ejemplo, meningitis viral, encefalitis equina del este (EEE), encefalitis de San Luis, encefalitis y/o virus del Nilo Occidental, rabia, virus de la encefalitis de California, encefalitis de La Crosse, encefalitis por sarampión, poliomielitis, que puede ser causada por, por ejemplo, virus de la familia del herpes (HSV), HSV-1, HSV-2 (encefalitis por

herpes simple neonatal), virus de la varicela-zóster (VZV), encefalitis de Bickerstaff, virus de Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV, tal como TCN-202, que está en desarrollo por Theraclone Sciences), herpesvirus humano 6 (HHV-6), virus B (*herpesvirus simiae*), encefalitis por flavivirus, encefalitis japonesa, fiebre del Valle de Murray, virus JC (leucoencefalopatía multifocal progresiva), virus Nipah (NiV), sarampión (panencefalitis esclerosante subaguda); y otras infecciones, tales como, por ejemplo, panencefalitis esclerosante subaguda, leucoencefalopatía multifocal progresiva; virus de la inmunodeficiencia humana (síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA)); *Streptococcus pyogenes* y otros estreptococos β -hemolíticos (por ejemplo, trastornos neuropsiquiátricos autoinmunitarios pediátricos asociados con infección estreptocócica, PANDAS) y/o corea de Sydenham, y síndrome de Guillain-Barré y priones.

Los ejemplos de constructos de anticuerpo adecuados pueden incluir los descritos, por ejemplo, en WO 2007/012924A2, 29 de enero de 2015, que se incorpora por referencia en la presente.

Por ejemplo, otras secuencias de ácidos nucleicos pueden codificar constructos de inmunoglobulina antipriones. Tales inmunoglobulinas pueden dirigirse contra la proteína priónica principal (PrP, de proteína priónica o proteína resistente a la proteasa, también denominada CD230 (agrupamiento de diferenciación 230)). Se proporciona la secuencia de aminoácidos de PrP, por ejemplo, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000302, incorporada por referencia en la presente. La proteína puede existir en múltiples isoformas, la PrPC normal, la PrPSc que produce enfermedad y una isoforma ubicada en las mitocondrias. La versión plegada de manera incorrecta PrPSc está asociada con diversos trastornos cognitivos y enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, encefalopatía espongiiforme bovina, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, insomnio familiar fatal y kuru.

Los ejemplos de productos génicos adecuados pueden incluir los asociados con hipercolesterolemia familiar, distrofia muscular, fibrosis quística y enfermedades raras o huérfanas. Los ejemplos de tales enfermedades raras pueden incluir atrofia muscular espinal (SMA), enfermedad de Huntington, síndrome de Rett (por ejemplo, proteína de fijación a metil-CpG 2 (MeCP2); UniProtKB - P51608), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), distrofia muscular tipo Duchenne, ataxia de Friedrich (por ejemplo, frataxina), progranulina (PRGN) (asociada con degeneraciones cerebrales distintas del Alzheimer, que incluyen demencia frontotemporal (FTD), afasia progresiva no fluente (PNFA) y demencia semántica), entre otras. Otros productos génicos útiles incluyen carbamoyl sintetasa I, ornitina transcarbamilasa (OTC), arginosuccinato sintetasa, arginosuccinato

liasa (ASL) para el tratamiento de la deficiencia de arginosuccinato liasa, arginasa, fumarilacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, alfa-fetoproteína de *Macaca mulatta*, gonadotropina coriónica (CG) de *Macaca mulatta*, glucosa-6-fosfatasa, porfobilinógeno deaminasa, cistationina beta-sintasa, cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, albúmina, isovaleril-CoA deshidrogenasa, propionil-CoA carboxilasa, metilmalonil-CoA mutasa, glutaril-CoA deshidrogenasa, insulina, beta-glucosidasa, piruvato carboxilato, fosforilasa hepática, fosforilasa quinasa, glicina descarboxilasa, proteína H, proteína T, una secuencia de regulador transmembrana de fibrosis quística (CFTR) y un producto del gen de la distrofina [por ejemplo, una minidistrofina o microdistrofina]. Aun otros productos génicos útiles incluyen enzimas que pueden ser útiles en el tratamiento de reemplazo de enzimas, que es útil en una variedad de afecciones que surgen de una actividad deficiente de la enzima. Por ejemplo, las enzimas que contienen manosa-6-fosfato pueden utilizarse en tratamientos para enfermedades de almacenamiento lisosomal (por ejemplo, un gen adecuado incluye el que codifica la β -glucuronidasa (GUSB)).

Otros genes ilustrativos que pueden administrarse a través del rAAV incluyen, entre otros, glucosa-6-fosfatasa, asociada con la enfermedad de almacenamiento de glucógeno o deficiencia de tipo 1A (GSD1), fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (PEPCK), asociada con deficiencia de PEPCK; quinasa dependiente de ciclina 5 (CDKL5), también denominada serina/treonina quinasa 9 (STK9) asociada con convulsiones y deterioro grave del neurodesarrollo; galactosa-1 fosfato uridil transferasa, asociada con galactosemia; fenilalanina hidroxilasa, asociada con fenilcetonuria (PKU); alfa-cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, asociada con la enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce; fumarilacetoacetato hidrolasa, asociada con tirosinemia tipo 1; metilmalonil-CoA mutasa, asociada con acidemia metilmalónica; acil-CoA deshidrogenasa de cadena media, asociada con deficiencia de acetil CoA de cadena media; ornitina transcarbamilasa (OTC), asociada con deficiencia de ornitina transcarbamilasa; ácido argininosuccínico sintetasa (ASS1), asociada con citrulinemia; deficiencia de lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT); una acidemia metilmalónica (MMA); enfermedad de Niemann-Pick, tipo C1; acidemia propiónica (PA); proteína de receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), asociada con hipercolesterolemia familiar (FH); UDP-glucuronosiltransferasa, asociada con la enfermedad de Crigler-Najjar; adenosina desaminasa, asociada con la enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave; hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, asociada con gota y síndrome de Lesch-Nyan; biotinidasa, asociada con deficiencia de biotinidasa; alfa-galactosidasa A (a-

Gal A) asociada con la enfermedad de Fabry; ATP7B asociado con la enfermedad de Wilson; beta-glucocerebrosidasa, asociada con la enfermedad de Gaucher tipo 2 y 3; proteína de membrana peroxisomal de 70 kDa, asociada con el síndrome de Zellweger; arilsulfatasa A (ARSA) asociada con leucodistrofia metacromática, enzima galactocerebrosidasa (GALC) asociada con la enfermedad de Krabbe, alfa-glucosidasa (GAA) asociada con la enfermedad de Pompe; gen de la esfingomielinasa (SMPD1) asociado con la enfermedad de Nieman Pick tipo A; argininosuccinato sintasa asociada con citrulinemia tipo II de inicio en el adulto (CTLN2); carbamoil-fosfato sintasa 1 (CPS1) asociada con trastornos del ciclo de la urea; proteína de la supervivencia de neuronas motoras (SMN), asociada con atrofia muscular espinal; ceramidasa asociada con lipogranulomatosis de Farber; b-hexosaminidasa asociada con gangliosidosis GM2 y enfermedades de Tay-Sachs y Sandhoff; aspartilglucosaminidasa asociada con aspartilglucosaminuria; α -fucosidasa asociada con fucosidosis; α -manosidasa asociada con alfa-manosidosis; porfobilinógeno deaminasa, asociada con porfiria aguda intermitente (AIP); alfa-1 antitripsina para el tratamiento de la deficiencia de alfa-1 antitripsina (enfisema); eritropoyetina para el tratamiento de la anemia debida a talasemia o insuficiencia renal; factor de crecimiento endotelial vascular, angiopoyetina-1 y factor de crecimiento de fibroblastos para el tratamiento de enfermedades isquémicas; inhibidor de la vía de la trombomodulina y del factor tisular para el tratamiento de vasos sanguíneos ocluidos como se observa, por ejemplo, en aterosclerosis, trombosis o embolias; aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) y tirosina hidroxilasa (TH) para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson; el receptor beta adrenérgico, antisentido o una forma mutante de fosfolambán, el retículo sarco(endo)plásmico adenosina trifosfatasa-2 (SERCA2) y la adenilil ciclase cardíaca para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva; un gen supresor de tumores tal como p53 para el tratamiento de diversos tipos de cáncer; una citocina tal como una de las diversas interleucinas para el tratamiento de tipos de cáncer y trastornos inflamatorios e inmunitarios; distrofina o minidistrofina y utrofina o miniutrofina para el tratamiento de distrofias musculares; e insulina o GLP-1 para el tratamiento de la diabetes. Genes y enfermedades adicionales de interés incluyen, por ejemplo, enfermedades relacionadas con el gen distonina, tales como la neuropatía hereditaria sensorial y autonómica tipo VI (el gen DST codifica distonina; se pueden requerir vectores duales de AAV debido al tamaño de la proteína (~7570 aa); enfermedades relacionadas con SCN9A, en las que los mutantes de pérdida de función causan una incapacidad para sentir dolor y los mutantes de ganancia de función causan afecciones de dolor, tales como eritromelalgia.

Otras afecciones son Charcot-Marie-Tooth tipo 1F y tipo 2E debido a mutaciones en el gen NEFL (cadena liviana de neurofilamentos), que se caracterizan por una neuropatía motora y sensorial periférica progresiva con expresión clínica y electrofisiológica variable. En ciertas formas de realización, los vectores descritos en la presente pueden usarse en el tratamiento de trastornos de mucopolisacaridosis (MPS). Tales vectores pueden contener una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la α -L-iduronidasa (IDUA) para el tratamiento de MPS I (síndromes de Hurler, Hurler-Scheie y Scheie); una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la iduronato-2-sulfatasa (IDS) para el tratamiento de MPS II (síndrome de Hunter); una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la sulfamidasa (SGSH) para el tratamiento de MPSIII A, B, C y D (síndrome de Sanfilippo); una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS) para el tratamiento de MPS IV A y B (síndrome de Morquio); una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la arilsulfatasa B (ARSB) para el tratamiento de MPS VI (síndrome de Maroteaux-Lamy); una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hialuronidasa para el tratamiento de MPSI IX (deficiencia de hialuronidasa) y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la beta-glucuronidasa para el tratamiento de MPS VII (síndrome de Sly). Ver, por ejemplo, www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_List.php; rarediseases.info.nih.gov/diseases.

Los ejemplos de otros genes adecuados pueden incluir, por ejemplo, hormonas y factores de crecimiento y diferenciación que incluyen, entre otros, insulina, glucagón, péptido similar al glucagón 1 (GLP1), hormona de crecimiento (GH), hormona paratiroidea (PTH), factor liberador de hormona de crecimiento (GRF), hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (hCG), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetinas, angiostatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), eritropoyetina (EPO) (que incluye, por ejemplo, epo humana, canina o felina), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factores neutróficos que incluyen, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de insulina I y II (IGF-I e IGF-II), cualquiera de la superfamilia del factor de crecimiento transformante α , que incluye TGF α , activinas, inhibinas o cualquiera de las proteínas morfogénicas óseas (BMP) BMP 1-15, cualquiera de la familia de factor de diferenciación (NDF) heregulina/neuregulina/ARIA/neu de factores de crecimiento, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de la línea celular

glial (GDNF), neurturina, agrina, cualquiera de la familia de semaforinas/colapsinas, netrina-1 y netrina-2, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), efrinas, nogina, sonic hedgehog y tirosina hidroxilasa.

Otros productos transgénicos útiles incluyen proteínas que regulan el sistema inmunitario que incluyen, entre otras, citocinas y linfocinas tales como trombopoyetina (TPO), interleucinas (IL) IL-1 a IL-36 (incluidas, por ejemplo, interleucinas humanas IL-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-11, IL-12, IL-13, IL-18, IL-31, IL-35), proteína quimioatrayente de monocitos, factor inhibidor de leucemia, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, ligando Fas, factores de necrosis tumoral α y β , interferones α , β y γ , factor de células madre, ligando flk-2/flt3. Los productos génicos producidos por el sistema inmunitario también son útiles en la invención. Estos incluyen, entre otros, inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, receptores de linfocitos T, receptores de linfocitos T quiméricos, receptores de linfocitos T monocatenarios, moléculas de MHC de clase I y clase II, así como inmunoglobulinas y moléculas de MHC diseñadas por ingeniería genética. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, los anticuerpos rAAV pueden diseñarse para administrar anticuerpos caninos o felinos, por ejemplo, tales como anti-IgE, anti-IL31, anti-CD20, anti-NGF, anti-GnRH. Los productos génicos útiles también incluyen proteínas reguladoras del complemento tales como proteínas reguladoras del complemento, proteína cofactor de membrana (MCP), factor acelerador de la degradación (DAF), CR1, CF2, CD59 e inhibidor de C1 esterasa (C1-INH). Aun otros productos génicos útiles incluyen cualquiera de los receptores para hormonas, factores de crecimiento, citocinas, linfocinas, proteínas reguladoras y proteínas del sistema inmunitario. La invención abarca receptores para la regulación del colesterol y/o la modulación de lípidos, que incluyen el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL), el receptor de lipoproteínas de alta densidad (HDL), el receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y los receptores captadores. La invención también abarca productos génicos tales como miembros de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas, incluidos receptores de glucocorticoides y receptores de estrógenos, receptores de vitamina D y otros receptores nucleares. Además, los productos génicos útiles incluyen factores de transcripción tales como jun, fos, max, mad, factor de respuesta sérica (SRF), AP-1, AP2, myb, MyoD y miogenina, proteínas que contienen caja ETS, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, proteínas de fijación a caja CCAAT, factor de regulación de interferón (IRF-1), proteína de tumor de Wilms, proteína de fijación a ETS, STAT, proteínas de fijación a

caja GATA, por ejemplo, GATA-3, y la familia forkhead de proteínas de hélice alada.

Las personas del oficio de nivel medio conocen métodos para secuenciar una proteína, un péptido o un polipéptido (por ejemplo, como una inmunoglobulina). Una vez conocida la secuencia de una proteína, hay programas informáticos basados en la web y disponibles en el comercio, así como empresas de servicios, que retrotraducen las secuencias de aminoácidos a secuencias codificantes de ácidos nucleicos. Ver, por ejemplo, backtranseq de EMBOSS, disponible en www.ebi.ac.uk/Tools/st/; Gene Infinity, disponible en geneinfinity.org/sms/sms_backtranslation.html; Expasy, disponible en expasy.org/tools/. En una forma de realización, las secuencias codificantes de ARN y/o cADN están diseñadas para la expresión óptima en células humanas.

En ciertas formas de realización, las composiciones proporcionadas en la presente son útiles para un método para modular la degeneración neuronal y/o disminuir la degeneración axonal de la médula espinal dorsal secundaria tras la administración intratecal o sistémica de tratamiento génico. Por lo tanto, si bien las composiciones proporcionadas en la presente son particularmente útiles para la administración de tratamiento génico al SNC, también pueden ser útiles para otras vías de administración, incluso, por ejemplo, administración IV sistémica, donde dosis altas del tratamiento génico pueden dar como resultado toxicidad y transducción de DRG. El método implica administrar a un paciente una composición que comprende un casete de expresión o genoma del vector que comprende el transgén y dianas de miARN.

En ciertas formas de realización, las composiciones proporcionadas en la presente son útiles en métodos para reprimir la expresión transgénica en los DRG. En ciertas formas de realización, el método comprende administrar un casete de expresión o genoma del vector que incluye una secuencia diana de miR-183 para reprimir los niveles de expresión transgénica en los DRG. En ciertas formas de realización, el método mejora la expresión en una o más células presentes en el SNC seleccionadas de uno o más de neuronas piramidales, neuronas de Purkinje, células granulosas, neuronas del huso, células interneuronales, astrocitos, oligodendrocitos, microglía y/o células endoteliales.

En ciertas formas de realización, se proporciona un método útil para administrar y/o mejorar la expresión del transgén en neuronas motoras inferiores, la retina, el oído interno y los receptores olfativos, que comprende administrar un casete de expresión o genoma del vector que incluye un transgén ligado operativamente a una o más secuencias diana de miR-183 y/o más secuencias diana de miR-183. En ciertas formas de realización, las células o tejidos pueden ser uno o más del hígado o el corazón.

En aun otra forma de realización, se proporciona un método que comprende administrar un casete de expresión o genoma del vector a células presentes en el SNC, en donde el casete de expresión o genoma del vector comprende una o más secuencias diana de miR-183 y carece de un transgén (es decir, una secuencia que codifica un producto génico heterólogo). En tales formas de realización, se logra la administración de miR-183 a células del SNC. En ciertas formas de realización, la administración de un casete de expresión o genoma del vector que comprende secuencias de miR-183 da como resultado la represión de la expresión en DRG y una expresión génica mejorada en ciertas otras células presentes en el SNC.

En ciertas formas de realización, las composiciones proporcionadas en la presente son útiles en métodos para mejorar la expresión de un transgén en una célula fuera del SNC. En ciertas formas de realización, los métodos para mejorar la expresión en una célula fuera del SNC comprenden administrar un casete de expresión o genoma del vector que incluye una secuencia diana de miR-182 a un paciente.

En una forma de realización, la suspensión tiene un pH de alrededor de 6,8 a alrededor de 7,32.

Una persona del oficio de nivel medio puede determinar volúmenes adecuados para la administración de estas dosis y concentraciones. Por ejemplo, se pueden seleccionar volúmenes de alrededor de 1 μ l a 150 ml, en donde los volúmenes más grandes se seleccionan para los adultos. Por lo general, para bebés recién nacidos, un volumen adecuado es de alrededor de 0,5 ml a alrededor de 10 ml, y, para bebés mayores, se pueden seleccionar de alrededor de 0,5 ml a alrededor de 15 ml. Para niños pequeños, se puede seleccionar un volumen de alrededor de 0,5 ml a alrededor de 20 ml. Para niños, se pueden seleccionar volúmenes de hasta alrededor de 30 ml. Para preadolescentes y adolescentes, se pueden seleccionar volúmenes de hasta alrededor de 50 ml. En aun otras formas de realización, un paciente puede recibir una administración intratecal en un volumen de alrededor de 5 ml a alrededor de 15 ml, o de alrededor de 7,5 ml a alrededor de 10 ml. Se pueden determinar otros volúmenes y dosis adecuadas. La dosis se ajustará para equilibrar el beneficio terapéutico con cualquier efecto secundario y tales dosis pueden variar en función de la aplicación terapéutica para la cual se emplea el vector recombinante.

En una forma de realización, la composición que comprende un rAAV descrito en la presente puede administrarse a una dosis de alrededor de 1×10^9 GC por gramo de masa cerebral a alrededor de 1×10^{14} GC por gramo de masa cerebral. En ciertas formas

de realización, el rAAV se coadministra de manera sistémica a una dosis de alrededor de 1×10^9 GC por kg de peso corporal a alrededor de 1×10^{13} GC por kg de peso corporal.

En una forma de realización, al sujeto se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de los casetes de expresión descritos en la presente. Como se usa en la presente, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del casete de expresión que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el producto génico y las secuencias diana de miARN que se administra y expresa en las células diana y que no tiene específicamente la expresión en DRG como diana.

Se ha descrito anteriormente el uso de rAAV para administrar el tratamiento de diversas afecciones. Los casetes de expresión para estos rAAV pueden modificarse para incluir secuencias diana de miARN descritas en la presente (incluso, por ejemplo, secuencias diana de miR-183, secuencias diana de miR-182 y secuencias diana de miR-96, o combinaciones de estas) a fin de, por ejemplo, reducir la expresión transgénica en DRG y/o reducir o eliminar la axonopatía y/o la toxicidad de DRG. Los ejemplos de genomas del vector de rAAV que pueden modificarse para incluir secuencias diana de miARN incluyen los genes descritos en WO 2017/136500 (MPSI), WO 2017/181113 (MPSII), WO 2019/108857 (MPSIIIA), WO 2019/108856 (MPSIIIB), WO 2017/106354 (SMN1), WO 2018/160585 (SMN1), WO 2018/209205 (enfermedad de Batten), WO 2015/164723 (administración mediada por AAV de anticuerpo anti-HER2), WO2015/138348 (OTC), WO 2015/164778 (variantes de LDLR para FH); WO2017/106345 (Crigler-Najjar), WO 2017/106326 (Ab anti-PCSK9), WO 2017/180857 (hemofilia A, Factor VIII), WO 2017/180861 (hemofilia B, Factor IX), así como vectores en ensayos para el tratamiento de la miopatía miotubular (tales como AT132, AAV8, Audentes).

En ciertas formas de realización, un vector de tratamiento génico de AAV.alfa-L-iduronidasa (AAV.IDUA) comprende un genoma del vector que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR del agrupamiento miRNA183 (que incluye las secuencias diana de miR-183, miR-182 y miR183, o combinaciones de estas) ligadas operativamente a la secuencia codificante para el gen IDUA (ver, por ejemplo, nt 1938-3908 de SEQ ID NO: 15). En ciertas formas de realización, el genoma del vector comprende múltiples copias de la misma secuencia diana de miR, cada una separada por un espaciador que puede ser igual o distinto a los otros. En otra forma de realización, el genoma del vector comprende de tres a seis copias de una secuencia diana del agrupamiento miR183, opcionalmente en donde una o más de las secuencias diana son al menos de alrededor de 80 % a alrededor de 99 % complementarias a un miembro del agrupamiento miR-183. En otra forma de realización,

el vector comprende una, dos, tres o cuatro copias de una secuencia diana de miR183. Un genoma del vector tal puede contener opcionalmente secuencias diana adicionales que corresponden a miembros del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene una sola secuencia diana de miR para un miembro del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos un espaciador. En ciertas formas de realización, el vector contiene tres secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos dos espaciadores. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos o más secuencias diana de miR para el agrupamiento miR183 que son secuencias diferentes entre sí. En ciertas formas de realización, los genomas del vector descritos en la presente son transportados por un vector no AAV.

En ciertas formas de realización, un vector de tratamiento génico de AAV.iduronato-2-sulfatasa (IDS) (AAV.IDS) comprende un genoma del vector que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR del agrupamiento miRNA183 (que incluye las secuencias diana de miR-183, miR-182 y miR183, o combinaciones de estas) ligadas operativamente a la secuencia codificante para el gen IDS. En ciertas formas de realización, el genoma del vector comprende múltiples copias de la misma secuencia diana de miR, cada una separada por un espaciador que puede ser igual o distinto a los otros. En otra forma de realización, el genoma del vector comprende de tres a seis copias de una secuencia diana del agrupamiento miR183, opcionalmente en donde una o más de las secuencias diana son al menos de alrededor de 80 % a alrededor de 99 % complementarias a un miembro del agrupamiento miR-183. En otra forma de realización, el vector comprende una, dos, tres o cuatro copias de una secuencia diana de miR183. Un genoma del vector tal puede contener opcionalmente secuencias diana adicionales que corresponden a miembros del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene una sola secuencia diana de miR para un miembro del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos un espaciador. En ciertas formas de realización, el vector contiene tres secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos dos espaciadores. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos o más secuencias diana de miR para el agrupamiento miR183 que son secuencias diferentes entre sí. En ciertas formas de realización, los genomas del vector descritos en la presente son transportados por un

vector no AAV.

En ciertas formas de realización, un vector de tratamiento génico de AAV.N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa (AAV.SGSH) comprende un genoma del vector que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR del agrupamiento miRNA183 (que incluye las secuencias diana de miR-183, miR-182 y miR183, o combinaciones de estas) ligadas operativamente a la secuencia codificante para el gen SGSH. En ciertas formas de realización, el genoma del vector comprende múltiples copias de la misma secuencia diana de miR, cada una separada por un espaciador que puede ser igual o distinto a los otros. En otra forma de realización, el genoma del vector comprende de tres a seis copias de una secuencia diana del agrupamiento miR183, opcionalmente en donde una o más de las secuencias diana son al menos de alrededor de 80 % a alrededor de 99 % complementarias a un miembro del agrupamiento miR-183. En otra forma de realización, el vector comprende una, dos, tres o cuatro copias de una secuencia diana de miR183. Un genoma del vector tal puede contener opcionalmente secuencias diana adicionales que corresponden a miembros del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene una sola secuencia diana de miR para un miembro del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos un espaciador. En ciertas formas de realización, el vector contiene tres secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos dos espaciadores. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos o más secuencias diana de miR para el agrupamiento miR183 que son secuencias diferentes entre sí. En ciertas formas de realización, los genomas del vector descritos en la presente son transportados por un vector no AAV.

En ciertas formas de realización, un vector de tratamiento génico de AAV.N-acetil-alfa-D-glucosaminidasa (AAV.NAGLU) comprende un genoma del vector que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR del agrupamiento miRNA183 (que incluye las secuencias diana de miR-183, miR-182 y miR183, o combinaciones de estas) ligadas operativamente a la secuencia codificante para el gen NAGLU. En ciertas formas de realización, el genoma del vector comprende múltiples copias de la misma secuencia diana de miR, cada una separada por un espaciador que puede ser igual o distinto a los otros. En otra forma de realización, el genoma del vector comprende de tres a seis copias de una secuencia diana del agrupamiento miR183, opcionalmente en donde una o más de las secuencias diana son

al menos de alrededor de 80 % a alrededor de 99 % complementarias a un miembro del agrupamiento miR-183. En otra forma de realización, el vector comprende una, dos, tres o cuatro copias de una secuencia diana de miR183. Un genoma del vector tal puede contener opcionalmente secuencias diana adicionales que corresponden a miembros del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene una sola secuencia diana de miR para un miembro del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos un espaciador. En ciertas formas de realización, el vector contiene tres secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos dos espaciadores. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos o más secuencias diana de miR para el agrupamiento miR183 que son secuencias diferentes entre sí. En ciertas formas de realización, los genomas del vector descritos en la presente son transportados por un vector no AAV.

En ciertas formas de realización, un vector de tratamiento génico de AAV.neurona motora de supervivencia 1 (AAV.SMN1) comprende un genoma del vector que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR del agrupamiento miRNA183 (que incluye las secuencias diana de miR-183, miR-182 y miR183, o combinaciones de estas) ligadas operativamente a la secuencia codificante para el gen SMN1. En ciertas formas de realización, el genoma del vector comprende múltiples copias de la misma secuencia diana de miR, cada una separada por un espaciador que puede ser igual o distinto a los otros. En otra forma de realización, el genoma del vector comprende de tres a seis copias de una secuencia diana del agrupamiento miR183, opcionalmente en donde una o más de las secuencias diana son al menos de alrededor de 80 % a alrededor de 99 % complementarias a un miembro del agrupamiento miR-183. En otra forma de realización, el vector comprende una, dos, tres o cuatro copias de una secuencia diana de miR183. Un genoma del vector tal puede contener opcionalmente secuencias diana adicionales que corresponden a miembros del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene una sola secuencia diana de miR para un miembro del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos un espaciador. En ciertas formas de realización, el vector contiene tres secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos dos espaciadores. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos o más secuencias diana de miR para el

agrupamiento miR183 que son secuencias diferentes entre sí. En ciertas formas de realización, los genomas del vector descritos en la presente son transportados por un vector no AAV.

En ciertas formas de realización, un vector de tratamiento génico de AAV.tripeptidil peptidasa 1 (AAV.TPP1) comprende un genoma del vector que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR del agrupamiento miRNA183 (que incluye las secuencias diana de miR-183, miR-182 y miR183, o combinaciones de estas) ligadas operativamente a la secuencia codificante para el gen TPP1. En ciertas formas de realización, el genoma del vector comprende múltiples copias de la misma secuencia diana de miR, cada una separada por un espaciador que puede ser igual o distinto a los otros. En otra forma de realización, el genoma del vector comprende de tres a seis copias de una secuencia diana del agrupamiento miR183, opcionalmente en donde una o más de las secuencias diana son al menos de alrededor de 80 % a alrededor de 99 % complementarias a un miembro del agrupamiento miR-183. En otra forma de realización, el vector comprende una, dos, tres o cuatro copias de una secuencia diana de miR183. Un genoma del vector tal puede contener opcionalmente secuencias diana adicionales que corresponden a miembros del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene una sola secuencia diana de miR para un miembro del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos un espaciador. En ciertas formas de realización, el vector contiene tres secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos dos espaciadores. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos o más secuencias diana de miR para el agrupamiento miR183 que son secuencias diferentes entre sí. En ciertas formas de realización, los genomas del vector descritos en la presente son transportados por un vector no AAV.

En ciertas formas de realización, un vector de tratamiento génico de anticuerpo AAV.anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (AAV.anti-HER2) comprende un genoma del vector que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR del agrupamiento miRNA183 (que incluye las secuencias diana de miR-183, miR-182 y miR183, o combinaciones de estas) ligadas operativamente a la secuencia codificante para el anticuerpo anti-HER2. En ciertas formas de realización, el genoma del vector comprende múltiples copias de la misma secuencia diana de miR, cada una separada por un espaciador que puede ser igual o

distinto a los otros. En otra forma de realización, el genoma del vector comprende de tres a seis copias de una secuencia diana del agrupamiento miR183, opcionalmente en donde una o más de las secuencias diana son al menos de alrededor de 80 % a alrededor de 99 % complementarias a un miembro del agrupamiento miR-183. En otra forma de realización, el vector comprende una, dos, tres o cuatro copias de una secuencia diana de miR183. Un genoma del vector tal puede contener opcionalmente secuencias diana adicionales que corresponden a miembros del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene una sola secuencia diana de miR para un miembro del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos un espaciador. En ciertas formas de realización, el vector contiene tres secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos dos espaciadores. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos o más secuencias diana de miR para el agrupamiento miR183 que son secuencias diferentes entre sí. En ciertas formas de realización, los genomas del vector descritos en la presente son transportados por un vector no AAV.

En ciertas formas de realización, un vector de tratamiento génico de AAV.ornitina transcarbamilasa (AAV.OTC) comprende un genoma del vector que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR del agrupamiento miRNA183 (que incluye las secuencias diana de miR-183, miR-182 y miR183, o combinaciones de estas) ligadas operativamente a la secuencia codificante para el gen OTC. En ciertas formas de realización, el genoma del vector comprende múltiples copias de la misma secuencia diana de miR, cada una separada por un espaciador que puede ser igual o distinto a los otros. En otra forma de realización, el genoma del vector comprende de tres a seis copias de una secuencia diana del agrupamiento miR183, opcionalmente en donde una o más de las secuencias diana son al menos de alrededor de 80 % a alrededor de 99 % complementarias a un miembro del agrupamiento miR-183. En otra forma de realización, el vector comprende una, dos, tres o cuatro copias de una secuencia diana de miR183. Un genoma del vector tal puede contener opcionalmente secuencias diana adicionales que corresponden a miembros del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene una sola secuencia diana de miR para un miembro del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos un espaciador. En ciertas formas de realización, el vector contiene tres secuencias diana de miR para miembros del

agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos dos espaciadores. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos o más secuencias diana de miR para el agrupamiento miR183 que son secuencias diferentes entre sí. En ciertas formas de realización, los genomas del vector descritos en la presente son transportados por un vector no AAV.

En ciertas formas de realización, un vector de tratamiento génico de AAV.receptor de lipoproteína de baja densidad (AAV.LDLR) comprende un genoma del vector que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR del agrupamiento miRNA183 (que incluye las secuencias diana de miR-183, miR-182 y miR183, o combinaciones de estas) ligadas operativamente a la secuencia codificante para el gen LDLR. En ciertas formas de realización, el genoma del vector comprende múltiples copias de la misma secuencia diana de miR, cada una separada por un espaciador que puede ser igual o distinto a los otros. En otra forma de realización, el genoma del vector comprende de tres a seis copias de una secuencia diana del agrupamiento miR183, opcionalmente en donde una o más de las secuencias diana son al menos de alrededor de 80 % a alrededor de 99 % complementarias a un miembro del agrupamiento miR-183. En otra forma de realización, el vector comprende una, dos, tres o cuatro copias de una secuencia diana de miR183. Un genoma del vector tal puede contener opcionalmente secuencias diana adicionales que corresponden a miembros del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene una sola secuencia diana de miR para un miembro del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos un espaciador. En ciertas formas de realización, el vector contiene tres secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos dos espaciadores. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos o más secuencias diana de miR para el agrupamiento miR183 que son secuencias diferentes entre sí. En ciertas formas de realización, los genomas del vector descritos en la presente son transportados por un vector no AAV.

En ciertas formas de realización, un vector de tratamiento génico de AAV.uridina difosfato glucuronosil transferasa 1A1 (AAV.UGT1A1) comprende un genoma del vector que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR del agrupamiento miRNA183 (que incluye las secuencias diana de miR-183, miR-182 y miR183, o combinaciones de estas) ligadas operativamente a la secuencia codificante para el gen UGT1A1. En ciertas formas de realización, el genoma del vector

comprende múltiples copias de la misma secuencia diana de miR, cada una separada por un espaciador que puede ser igual o distinto a los otros. En otra forma de realización, el genoma del vector comprende de tres a seis copias de una secuencia diana del agrupamiento miR183, opcionalmente en donde una o más de las secuencias diana son al menos de alrededor de 80 % a alrededor de 99 % complementarias a un miembro del agrupamiento miR-183. En otra forma de realización, el vector comprende una, dos, tres o cuatro copias de una secuencia diana de miR183. Un genoma del vector tal puede contener opcionalmente secuencias diana adicionales que corresponden a miembros del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene una sola secuencia diana de miR para un miembro del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos un espaciador. En ciertas formas de realización, el vector contiene tres secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos dos espaciadores. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos o más secuencias diana de miR para el agrupamiento miR183 que son secuencias diferentes entre sí. En ciertas formas de realización, los genomas del vector descritos en la presente son transportados por un vector no AAV.

En ciertas formas de realización, un vector de tratamiento génico de anticuerpo AAV.anti-proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (Ab AAV.anti-PCSK9) comprende un genoma del vector que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR del agrupamiento miRNA183 (que incluye las secuencias diana de miR-183, miR-182 y miR183, o combinaciones de estas) ligadas operativamente a la secuencia codificante para el Ab anti-PCSK9. En ciertas formas de realización, el genoma del vector comprende múltiples copias de la misma secuencia diana de miR, cada una separada por un espaciador que puede ser igual o distinto a los otros. En otra forma de realización, el genoma del vector comprende de tres a seis copias de una secuencia diana del agrupamiento miR183, opcionalmente en donde una o más de las secuencias diana son al menos de alrededor de 80 % a alrededor de 99 % complementarias a un miembro del agrupamiento miR-183. En otra forma de realización, el vector comprende una, dos, tres o cuatro copias de una secuencia diana de miR183. Un genoma del vector tal puede contener opcionalmente secuencias diana adicionales que corresponden a miembros del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene una sola secuencia diana de miR para un miembro del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del

vector contiene dos secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos un espaciador. En ciertas formas de realización, el vector contiene tres secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos dos espaciadores. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos o más secuencias diana de miR para el agrupamiento miR183 que son secuencias diferentes entre sí. En ciertas formas de realización, los genomas del vector descritos en la presente son transportados por un vector no AAV.

En ciertas formas de realización, un vector de tratamiento génico de AAV.Factor VIII (AAV.FVIII) comprende un genoma del vector que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR del agrupamiento miRNA183 (que incluye las secuencias diana de miR-183, miR-182 y miR183, o combinaciones de estas) ligadas operativamente a la secuencia codificante para el gen FVIII. En ciertas formas de realización, el genoma del vector comprende múltiples copias de la misma secuencia diana de miR, cada una separada por un espaciador que puede ser igual o distinto a los otros. En otra forma de realización, el genoma del vector comprende de tres a seis copias de una secuencia diana del agrupamiento miR183, opcionalmente en donde una o más de las secuencias diana son al menos de alrededor de 80 % a alrededor de 99 % complementarias a un miembro del agrupamiento miR-183. En otra forma de realización, el vector comprende una, dos, tres o cuatro copias de una secuencia diana de miR183. Un genoma del vector tal puede contener opcionalmente secuencias diana adicionales que corresponden a miembros del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene una sola secuencia diana de miR para un miembro del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos un espaciador. En ciertas formas de realización, el vector contiene tres secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos dos espaciadores. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos o más secuencias diana de miR para el agrupamiento miR183 que son secuencias diferentes entre sí. En ciertas formas de realización, los genomas del vector descritos en la presente son transportados por un vector no AAV.

En ciertas formas de realización, un vector de tratamiento génico de AAV.Factor IX (AAV.IX) comprende un genoma del vector que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR del agrupamiento miRNA183 (que incluye las secuencias diana de miR-183, miR-182 y miR183, o combinaciones de

estas) ligadas operativamente a la secuencia codificante para el gen FIX. En ciertas formas de realización, el genoma del vector comprende múltiples copias de la misma secuencia diana de miR, cada una separada por un espaciador que puede ser igual o distinto a los otros. En otra forma de realización, el genoma del vector comprende de tres a seis copias de una secuencia diana del agrupamiento miR183, opcionalmente en donde una o más de las secuencias diana son al menos de alrededor de 80 % a alrededor de 99 % complementarias a un miembro del agrupamiento miR-183. En otra forma de realización, el vector comprende una, dos, tres o cuatro copias de una secuencia diana de miR183. Un genoma del vector tal puede contener opcionalmente secuencias diana adicionales que corresponden a miembros del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene una sola secuencia diana de miR para un miembro del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos un espaciador. En ciertas formas de realización, el vector contiene tres secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos dos espaciadores. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos o más secuencias diana de miR para el agrupamiento miR183 que son secuencias diferentes entre sí. En ciertas formas de realización, los genomas del vector descritos en la presente son transportados por un vector no AAV.

En ciertas formas de realización, un vector de tratamiento génico de AAV.miotubularina 1 (AAV.MTM1) comprende un genoma del vector que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro secuencias diana de miR del agrupamiento miRNA183 (que incluye las secuencias diana de miR-183, miR-182 y miR183, o combinaciones de estas) ligadas operativamente a la secuencia codificante para el gen MTM1. En ciertas formas de realización, el genoma del vector comprende múltiples copias de la misma secuencia diana de miR, cada una separada por un espaciador que puede ser igual o distinto a los otros. En otra forma de realización, el genoma del vector comprende de tres a seis copias de una secuencia diana del agrupamiento miR183, opcionalmente en donde una o más de las secuencias diana son al menos de alrededor de 80 % a alrededor de 99 % complementarias a un miembro del agrupamiento miR-183. En otra forma de realización, el vector comprende una, dos, tres o cuatro copias de una secuencia diana de miR183. Un genoma del vector tal puede contener opcionalmente secuencias diana adicionales que corresponden a miembros del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene una sola secuencia diana de miR para un miembro del agrupamiento miR183. En ciertas formas de realización, el

genoma del vector contiene dos secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos un espaciador. En ciertas formas de realización, el vector contiene tres secuencias diana de miR para miembros del agrupamiento miR183 y opcionalmente al menos dos espaciadores. En ciertas formas de realización, el genoma del vector contiene dos o más secuencias diana de miR para el agrupamiento miR183 que son secuencias diferentes entre sí. En ciertas formas de realización, los genomas del vector descritos en la presente son transportados por un vector no AAV.

En una forma de realización, el casete de expresión está en una genoma del vector administrado en una cantidad de alrededor de 1×10^9 GC por gramo de masa cerebral a alrededor de 1×10^{13} copias del genoma (GC) por gramo (g) de masa cerebral, que incluye todos los números enteros o cantidades fraccionales dentro del rango y los valores límite. En otra forma de realización, la dosis es de 1×10^{10} GC por gramo de masa cerebral a alrededor de 1×10^{13} GC por gramo de masa cerebral. En formas de realización específicas, la dosis del vector administrada a un paciente es de al menos alrededor de $1,0 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $1,5 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $2,0 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $2,5 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $3,0 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $3,5 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $4,0 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $4,5 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $5,0 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $5,5 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $6,0 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $6,5 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $7,0 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $7,5 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $8,0 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $8,5 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $9,0 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $9,5 \times 10^9$ GC/g, alrededor de $1,0 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $1,5 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $2,0 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $2,5 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $3,0 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $3,5 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $4,0 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $4,5 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $5,0 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $5,5 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $6,0 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $6,5 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $7,0 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $7,5 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $8,0 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $8,5 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $9,0 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $9,5 \times 10^{10}$ GC/g, alrededor de $1,0 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $1,5 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $2,0 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $2,5 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $3,0 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $3,5 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $4,0 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $4,5 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $5,0 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $5,5 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $6,0 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $6,5 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $7,0 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $7,5 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $8,0 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $8,5 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $9,0 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $9,5 \times 10^{11}$ GC/g, alrededor de $1,0 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $1,5 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $2,0 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $2,5 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $3,0 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $3,5 \times 10^{12}$ GC/g,

alrededor de $4,0 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $4,5 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $5,0 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $5,5 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $6,0 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $6,5 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $7,0 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $7,5 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $8,0 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $8,5 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $9,0 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $9,5 \times 10^{12}$ GC/g, alrededor de $1,0 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $1,5 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $2,0 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $2,5 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $3,0 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $3,5 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $4,0 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $4,5 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $5,0 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $5,5 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $6,0 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $6,5 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $7,0 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $7,5 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $8,0 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $8,5 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $9,0 \times 10^{13}$ GC/g, alrededor de $9,5 \times 10^{13}$ GC/g, o alrededor de $1,0 \times 10^{14}$ GC/g de masa cerebral.

En ciertas formas de realización, las composiciones que contienen secuencia diana de miR proporcionadas en la presente minimizan la dosis, duración y/o cantidad de cotratamiento inmunosupresor que requiere el paciente. Actualmente, los inmunosupresores para tal cotratamiento incluyen, entre otros, un glucocorticoide, esteroides, antimetabolitos, inhibidores de linfocitos T, un macrólido (por ejemplo, rapamicina o rapalog) y agentes citostáticos que incluyen un agente alquilante, un antimetabolito, un antibiótico citotóxico, un anticuerpo o un agente activo sobre la inmunofilina. El inmunosupresor puede incluir una mostaza de nitrógeno, nitrosourea, compuesto de platino, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, fluorouracilo, dactinomicina, una antraciclina, mitomicina C, bleomicina, mitramicina, receptor de IL-2 (CD25) o anticuerpos dirigidos a CD3, anticuerpos anti-IL-2, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, IFN- β , IFN- γ , un opioide o agente de fijación a TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa). En ciertas formas de realización, el tratamiento inmunosupresor puede iniciarse 0, 1, 2, 7 o más días antes de la administración del tratamiento génico. Dicho tratamiento puede implicar la coadministración de dos o más fármacos, el (por ejemplo, prednelisona, micofenolato de mofetilo (MMF) y/o sirolimus (es decir, rapamicina)) el mismo día. Se puede continuar con uno o más de estos fármacos después de la administración del tratamiento génico, a la misma dosis o una dosis ajustada. Dicho tratamiento puede durar alrededor de 1 semana (7 días), alrededor de 60. En ciertas formas de realización, las composiciones que contienen secuencia diana de miR proporcionadas en la presente eliminan la necesidad de un tratamiento inmunosupresor antes, durante o después de la administración de un vector de tratamiento génico (por ejemplo, rAAV).

En una forma de realización, una composición que comprende el casete de expresión

como se describe en la presente se administra una vez al sujeto que lo necesite. En ciertas formas de realización, el casete de expresión se administra a través de un rAAV.

Debe entenderse que se pretende que las composiciones en el método descrito en la presente se apliquen a otras composiciones, regímenes, aspectos, formas de realización y métodos descritos a lo largo de la memoria descriptiva.

6. Kit

En ciertas formas de realización se proporciona un kit que incluye un casete de expresión concentrado (por ejemplo, en un vector viral o no viral) suspendido en una formulación (opcionalmente congelada), un amortiguador de dilución opcional y dispositivos y componentes requeridos para la administración intratecal, intracerebroventricular o intracisternal. En otra forma de realización, el kit puede incluir, de manera adicional o alternativa, componentes para administración intravenosa. En una forma de realización, el kit proporciona amortiguador suficiente para permitir la inyección. Tal amortiguador puede permitir una dilución de alrededor de 1:1 a 1:5 del vector concentrado, o más. En otras formas de realización, se incluyen cantidades menores o mayores de amortiguador o agua estéril para permitir la titulación de la dosis y otros ajustes por parte del médico clínico. En aun otras formas de realización, se incluyen en el kit uno o más componentes del dispositivo. Está disponible un amortiguador de dilución adecuado, tal como una solución salina, una solución salina amortiguada con fosfato (PBS) o una solución salina amortiguada con glicerol/fosfato.

Debe entenderse que se pretende que las composiciones en el kit descrito en la presente se apliquen a otras composiciones, regímenes, aspectos, formas de realización y métodos descritos a lo largo de la memoria descriptiva.

7. Dispositivo

En un aspecto, las composiciones proporcionadas en la presente pueden administrarse por vía intratecal mediante el método y/o el dispositivo descritos, por ejemplo, en WO 2017/136500, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. De manera alternativa, se pueden seleccionar otros dispositivos y métodos. En resumen, el método comprende las etapas de introducir una aguja espinal en la cisterna magna de un paciente, conectar una longitud de tubo flexible a un puerto proximal de la aguja espinal y un puerto de salida de una válvula a un extremo proximal del tubo flexible, y, después de

estas etapas de introducir y conectar, y después de permitir que el tubo se autocebe con el líquido cefalorraquídeo del paciente, conectar un primer recipiente que contiene una cantidad de solución isotónica a un puerto de entrada de descarga de la válvula y, a continuación, conectar un segundo recipiente que contiene una cantidad de una composición farmacéutica a un puerto de entrada de vector de la válvula. Después de conectar recipientes primero y segundo a la válvula, se abre una vía para el flujo de fluido entre el puerto de entrada de vector y el puerto de salida de la válvula y la composición farmacéutica se inyecta en el paciente a través de la aguja espinal, y, después de inyectar la composición farmacéutica, se abre una vía para el flujo de fluido a través del puerto de entrada de descarga y el puerto de salida de la válvula y se inyecta la solución isotónica en la aguja espinal para introducir la composición farmacéutica en el paciente. Cada uno de este método y este dispositivo puede usarse opcionalmente para la administración intratecal de las composiciones proporcionadas en la presente. De manera alternativa, se pueden usar otros métodos y dispositivos para tal administración intratecal. Debe entenderse que se pretende que las composiciones en el dispositivo descrito en la presente se apliquen a otras composiciones, regímenes, aspectos, formas de realización y métodos descritos a lo largo de la memoria descriptiva.

EJEMPLOS

La invención se describe a continuación con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos, y no se debe interpretar de ninguna forma que la invención está limitada a estos ejemplos, sino que se debe interpretar que abarca cualquiera y todas las variaciones evidentes como resultado de las enseñanzas en la presente.

Ejemplo 1: Métodos

Animales

Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales (*Institutional Animal Care and Use Committee*) de la Universidad de Pennsylvania. Los *Macaca Mulatta* se obtuvieron de Covance Research Products, Inc. (Alice, TX) y Primgen/Prelabs Primates (Hines, IL). Los animales se alojaron en instalaciones del Programa de Investigación de Primates no Humanos acreditadas por la Asociación para la Evaluación y Acreditación de Cuidado de Animales

de Laboratorio (AAALAC) Internacional en la Universidad de Pensilvania en jaulas de acero inoxidable de empuje trasero. Los animales recibieron enriquecimientos variados tales como alimentos, estímulos visuales y auditivos, elementos para manipular e interacciones sociales.

Se adquirieron ratones C56BL/6J (N.º de inventario 000664) del Laboratorio Jackson. Los animales se alojaron en un terrario de ratones acreditado por AAALAC Internacional en el Programa de Tratamiento Génico de la Universidad de Pensilvania, en jaulas estándar de 2 a 5 animales por jaula con enriquecimiento (material de anidación de Nestlets). Las jaulas, botellas de agua y sustratos de anidación se sometieron a autoclave en las instalaciones de barrera y las jaulas se cambiaron una vez por semana. Se mantuvo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas controlado automáticamente. Cada período de oscuridad comenzó a las 19:00 ($\pm$ 30 minutos). Se proporcionó alimento para roedores de laboratorio irradiado a demanda.

Vectores

El plásmido *trans* AAV9.PHP.B (pAAV2/PHP.B) se generó con un QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, N.º de cat. 210515) mediante el uso de pAAV2/9 (Penn Vector Core) como plantilla, de acuerdo con el manual del fabricante. pAAV2/9 y pAAV2/hu68 fueron proporcionados por Penn Vector Core. Los vectores de AAV fueron producidos y titulados por Penn Vector Core (como se describió anteriormente en Lock, M., *et al.* Hum Gene Ther 21:1259-1271, 2010). En resumen, las células HEK293 se transfectaron por triplicado y el sobrenadante de cultivo se cultivó, se concentró y se purificó con un gradiente de iodixanol. Los vectores purificados se titularon con PCR digital en gotas mediante el uso de cebadores dirigidos a la secuencia de poliA de betaglobina de conejo (como anteriormente en Lock, M., *et al.* Hum Gene Ther Methods 25:115-125, 2014). La secuencia de alfa-L-iduronidasa humana (hIDUA) se obtuvo mediante traducción inversa y optimización de codones de la isoforma de hIDUA, un precursor de la secuencia de proteína NP_000194.2, y se clonó en el promotor de CB7 (Penn Vector Core). Se seleccionaron secuencias de microARN enriquecidas con ganglio de la raíz dorsal (DRG) de la base de datos pública disponible en mirbase.org. Se clonaron cuatro repeticiones en tándem de la diana para la miR enriquecida con DGR en la región no traducida 3' (UTR) de proteína fluorescente verde (GFP) o de plásmidos *cis* de hIDUA.

Estudios *in vivo*

Los ratones recibieron 1×10^{12} copias del genoma (GC; 5×10^{13} GC/kg) de AAV-PHP.B, o

4×10^{12} GCs (2×10^{14} GC/kg) de vectores AAV9 que codifican GFP mejorado (Penn Vector Core) con o sin dianas de miR en 0,1 ml a través de la vena lateral de la cola y se sometieron a eutanasia mediante inhalación de CO₂ 21 días después de la inyección. Los tejidos se recolectaron rápidamente, del cerebro en primer lugar, y se fijaron por inmersión en 10 % de formalina amortiguada neutra durante alrededor de 24 h, se lavaron brevemente en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se equilibraron de manera secuencial en 15 % y 30 % de sacarosa en PBS a 4 °C. Los tejidos se congelaron en un medio de incrustación a temperatura de corte óptima y se criosectionaron para obtener una visualización directa de GFP (los tejidos de cerebro se seccionaron a 30 µm, y otros tejidos a 8 µm de espesor). Se obtuvieron imágenes con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-E. La expresión de GFP en DRG se analizó mediante inmunohistoquímica (IHC). Las columnas vertebrales con DRG se fijaron en formalina durante 24 h, se descalcificaron en 10 % de ácido etilendiamintetraacético (pH 7,5) hasta suavizarse, y se embebieron en parafina de acuerdo con los protocolos estándar. Las secciones se desparafinaron a través de una serie de etanol y xileno, se hirvieron durante 6 min en amortiguador de citrato 10 mM (pH 6,0) para llevar a cabo la recuperación de antígeno, se bloquearon de manera secuencial con 2 % de H₂O₂ (15 min), reactivos de bloqueo de adivina/biotina (15 minutos cada uno; Vector Laboratories, Burlingame, CA) y amortiguador de bloqueo (1 % de suero de burro en PBS + 0,2 % de Tritón durante 10 min) seguido de la incubación con anticuerpos primarios (1 h a 37 °C) y secundarios biotilados (diluidos 1:500, 45 min; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) diluidos en amortiguador de bloqueo. Se usó un anticuerpo de conejo contra GFP como el anticuerpo primario (NB600-308, Novus Biologicals, Centennial, CO; diluido 1:500) Un kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) con DAB como sustrato permitió la visualización de anticuerpos fijados como precipitado marrón.

Los primates no humanos (NHP) recibieron $3,5 \times 10^{13}$ GC de vectores AAVhu68.GFP o 1×10^{13} GC de vectores AAVhu68.hIDUA en un volumen total de 1 ml inyectado en la cisterna magna, bajo guía fluoroscópica (como describió anteriormente Katz, N., *et al.* Hum Gene Ther Methods 29:212-219, 2018). Se realizaron recolecciones de sangre menstrual y punciones de líquido cefalorraquídeo (CSF) para lecturas de seguridad. Las instalaciones contratadas Antech Diagnostics (Morrisville, NC) realizaron análisis de química sérica, hematología, coagulación y CSF. Los animales se sometieron a eutanasia con sobredosis de pentobarbital intravenoso y se sometieron a necropsia; luego se cultivaron los tejidos para una realizar una examinación histopatológica integral. Los

tejidos recolectados se fijaron inmediatamente en formalina y se embebieron en parafina. Para la histopatología, las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina y eosina de acuerdo con los protocolos estándar. La IHC para la expresión de GFP se llevó a cabo como se describe para los estudios en ratones pero con un anticuerpo diferente contra GFP (anticuerpo de cabra NB100-1770, Novus Biologicals; diluido 1:500, incubado durante la noche a 4 °C). La inmunotinción para hIDUA se realizó mediante el uso de anticuerpo de oveja contra hIDUA (AF4119, R&D Systems, Minneapolis, MN; diluido 1:200) de acuerdo con el protocolo mencionado anteriormente para IHC. Además, las secciones se tiñeron con hIDUA mediante inmunofluorescencia (IF) con el mismo anticuerpo primario. Para IF, las secciones se desparafinaron y se trataron para la recuperación de antígeno como se describió anteriormente, y luego se bloquearon con 1 % de suero de burro en PBS + 0,2 % de Tritón durante 15 min seguido de una incubación secuencial con anticuerpos primarios (2 h a temperatura ambiente, diluidos 1:50) y secundarios etiquetados con FITC (45 min; Jackson ImmunoResearch; diluidos 1:100) diluidos en amortiguador de bloqueo. Las secciones se montaron en Fluoromount G con DAPI como una contratinción nuclear.

La hibridación *in situ* (ISH) se realizó con sondas específicas para el ARN optimizado con codones que se transcribe a partir del genoma del vector que no se fija a ARN de IDUA de mono endógeno. Los pares de sondas en forma de Z fueron sintetizados por Life Technologies (Carlsbad, CA) y la ISH se realizó en secciones de parafina con el kit Life Technologies ViewRNA ISH Tissue Assay de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se obtuvieron imágenes de la deposición de precipitados de Fast Red que indican señales positivas mediante microscopía de fluorescencia al usar un conjunto de filtro de rodamin. Las secciones de tejido con IHC de IDUA se escanearon a fines de cuantificación mediante un escáner de deslizamiento Aperio Versa (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL).

Histopatología y morfometría

Un patólogo veterinario certificado por el comité a ciegas con respecto al grupo de vector estableció grados de gravedad definidos con 0 como ausencia de lesión, 1 como mínima (<10 %), 2 leve (10-25 %), 3 moderada (25-50 %), 4 marcada (50-95 %), y 5 grave (>95 %). Se establecieron calificaciones de axonopatía dorsal en cada animal a partir de al menos 3 secciones cervicales, 3 torácicas, y 3 lumbares; los grados de gravedad de DRG se establecieron a partir de al menos 3 segmentos cervicales, 3 torácicos y 3 lumbares; y la calificación de mediana de nervio fue la suma de los grados de gravedad de axonopatía y fibrosis con una calificación máxima posible de 10 y se estableció en la

porción distal y proximal en los nervios izquierdo y derecho. Para la cuantificación de la expresión transgénica, un patólogo veterinario certificado por el comité contó las células inmunoteñidas con anticuerpos anti-GFP o anti-hIDUA al compararlas con la señal de portaobjetos de control obtenidos de animales no tratados. La cantidad total de células positivas por campo de ampliación x20 se contó mediante la herramienta de recuento de células ImageJ en un mínimo de cinco campos por estructura y por animal.

Biodistribución del vector

El ADN de tejido de NHP se extrajo con un QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemania, N.º de cat. 51306) y los genomas del vector se cuantificaron mediante PCR en tiempo real con reactivos Taqman (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA) y cebadores/sondas dirigidas a la secuencia de poliadenilación de rBG de los vectores.

Inmunobiología

Las respuestas de los linfocitos T de sangre periférica contra hIDUA se midieron mediante ensayos de puntos por inmunoabsorbente ligado a enzimas de interferón gamma de acuerdo con métodos publicados anteriormente (Gao *et al.*, 2009), con colecciones de péptidos específicas para el transgén de hIDUA. Los criterios de respuesta positiva fueron >55 unidades formadoras de manchas por 10^6 linfocitos y tres veces el control negativo medio sin estimulación. Además, las respuestas de los linfocitos T se analizaron en linfocitos que se extrajeron del bazo, hígado y ganglios linfáticos cervicales profundos después de la necropsia en el día 90 del estudio. Los anticuerpos contra hIDUA se midieron en suero (dilución de muestra de 1:1,000) (como se describió anteriormente en Hinderer, C., *et al.* Mol Ther 23:1298-1307, 2015).

Análisis de citocina/quimiocina: Se recolectaron muestras de CSF y se las almacenó a -80 °C hasta el momento del análisis. Las muestras de CSF se analizaron mediante el uso de un kit Milliplex MAP que contenía los siguientes analitos: sCD137, Eotaxina, sFasL, FGF-2, Fractalquina, granzima A, granzima B, IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-16, IL-17A, IL-17E/IL-25, IL-21, IL-22, IL-23, IL-28A, IL-31, IL-33, IP-10, MIP-3 α , Perforina, TNF β . Las muestras de CSF se evaluaron en duplicado y se analizaron en un instrumento 3D de FLEXMAP mediante el uso de Luminex® xPONENT® 4.2; Bio-Plex Manager™ Software 6.1. En el análisis se incluyeron únicamente las muestras con un % de CV menor de 20 %.

Estudios in vitro

El plásmido de expresión de microARN humano de miR183 se modificó a partir del vector Origene MI0000273 al eliminar el fragmento KpnI-PstI que codifica GFP y sitios de entrada al ribosoma internos parciales. Se confirmó la falta de expresión de GFP del vector modificado mediante transfección transitoria e inmunotransferencia anti-GFP. Se realizó transfección transitoria mediada por polietilenimina en células HEK293 con plásmidos *cis* de GFP que albergan sitios de fijación a microARN ubicados en la UTR 3' del casete de expresión de GFP. 72 horas después de la transfección, se lisaron las células en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM y 0,5 % de tritón X-100 con inhibidores de proteasa. Se usó un total de 13 µg de lisados celulares para inmunotransferencia anti-GFP seguida de detección de señal y cuantificación basadas en electroquimioluminiscencia. Se realizaron experimentos por triplicado para un análisis estadístico.

Análisis estadístico

Se evaluaron las diferencias estadísticas entre grupos mediante el uso de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

Ejemplo 2: la inhibición mediada por micro ARN de la expresión transgénica reduce la toxicidad de ganglios de la raíz dorsal por parte de AAV

La administración de vectores de virus adenoasociado (AAV) en el SNC de primates no humanos (NHP) mediante la sangre o líquido cefalorraquídeo está asociada con la toxicidad de ganglios de la raíz dorsal (DRG). Esto puede suceder debido a altas tasas de transducción, que pueden causar estrés del retículo endoplásmico por la sobreproducción del producto transgénico. Se desarrolló un enfoque para eliminar la toxicidad asociada al tratamiento génico de AAV dirigido al SNC al introducir secuencias diana de miARN en el genoma del vector dentro de la región no traducida 3' del mRNA de transgén correspondiente. El casete de expresión de ITR.CB7.Cl.eGFP.miR145(cuatro copias).beta globina de conejo, 3'ITR se proporciona en SEQ ID NO: 10, el casete de expresión de ITR.CB7.Cl.GFP.miR182(cuatro copias).beta globina de conejo, 3'ITR se proporciona en SEQ ID NO: 11, el casete de expresión de ITR.CB7.Cl.GFP.miARN96(cuatro copias).beta globina de conejo, 3'ITR se proporciona en SEQ ID NO: 12, el casete de expresión de ITR.CB7.Cl.GFP.miR183(cuatro copias).beta globina de conejo, 3'ITR se proporciona en SEQ ID NO: 13.

Los vectores de AAV causan degeneración de DRG en NHP

Según nuestra experiencia en toxicidad de DRG en NHP, se desarrolló un sistema para cuantificar la gravedad de la toxicidad. Se evalúan los cuerpos celulares ubicados a través de la columna vertebral en los DRG, los axones dentro de los nervios periféricos y los axones que ascienden por los tractos dorsales de material blanca (Figura 1B). Se cree que la lesión principal es la degeneración del cuerpo celular de neuronas sensoriales ubicado en DRG. La lesión se caracteriza histológicamente por hipereosinofilia, formas celulares irregulares, alteración de sustancia de Nissl (cromatolisis central) y pérdida de límites nucleares junto con infiltración de células mononucleares (Figura 1B). Es más probable que las células que expresan altos niveles de proteína transgénica se sometan a degeneración como se evidencia mediante inmunotinción de producto transgénico en animales que recibieron una administración de ICM de un vector AAV que expresa proteína fluorescente verde (GFP; Figura 1B). La axonopatía, que es la degeneración de los axones distales y proximales, es secundaria a la muerte del cuerpo celular. La axonopatía se caracteriza por la falta de axones, vainas de mielina dilatada que rodean los residuos celulares, y macrófagos (Figura 1B). La Figura 1C ilustra ejemplos de diferentes niveles de toxicidad de DRG y axonopatía de la columna vertebral. Los grados se basan en la proporción de tejido afectado mediante prueba histopatológica de campo de alta potencia: 1 mínima (<10 %), 2 leve (10-25 %), 3 moderada (25-50 %), 4 marcada (50-95 %) y 5 grave (>95 %).

Nuestra experiencia total de NHP adolescentes/adultos a los que se administró vectores AAV en CSF mediante vía ICM o punción lumbar (LP) asciende a un total de 101 monos que incluyen 21 estudios que abarcan estudios de toxicología publicados anteriormente (Hordeaux, J., *et al.* Mol Ther Methods Clin Dev 10:68-78, 2018; Hordeaux, J., *et al.* Mol Ther Methods Clin Dev 10:79-88, 2018) y los dos experimentos con NHP descritos en los Ejemplos a continuación así como varios estudios no publicados. Esta experiencia incluye siete cápsides, 12 transgenes, tres promotores (CB7, UBC, hSyn), dosis de 1×10^{12} GC a $5,7 \times 10^{13}$ GC, un vector purificado mediante gradientes o columnas, tres formulaciones (solución salina amortiguada con fosfato y dos CSF artificiales diferentes), y *Macaca mulatta* y *Macaca fascicularis* en diversas etapas de desarrollo. En cada grupo experimental, observamos toxicidad y axonopatía de DRG. La patología alcanza su pico un mes después de la inyección y no progresa durante hasta seis meses, que es el período más extenso observado en macacos maduros. En la mayoría de los casos, la patología es de leve a moderada. Sin embargo, las dosis altas de vectores que expresan GFP inyectadas ICM pueden generar una patología grave asociada a la ataxia.

Los miARN expresados específicamente en neuronas de DRG pueden eliminar la expresión transgénica de AAV

Se evaluaron varios mecanismos al considerar maneras de mitigar la toxicidad de DRG. En estudios previos, se analizó la función de las respuestas inmunitarias adaptativas destructivas a DRG transducidos por NHP inmunosupresores a los que se administraron vectores de AAV9 ICM que expresaban IDUA humana o IDS humana. El tratamiento con micofenolato de mofetilo (MMF) y rapamicina mitigó la respuesta inmunitaria adaptativa al vector y el producto transgénico pero no tuvo un impacto significativo sobre la toxicidad y axonopatía de DRG (Hordeaux, J., *et al.* Mol Ther Methods Clin Dev 10:68-78, 2018; Hordeaux, J., *et al.* Mol Ther Methods Clin Dev 10:79-88, 2018).

No se ha investigado anteriormente la posibilidad de que la sobre expresión de productos transgénicos en DRG altamente transducidos sea la causa de lesión neuronal y degeneración del cuerpo celular y de axones asociados seguidas de una respuesta inflamatoria reactiva (Figura 2A). En consecuencia, para eliminar de manera específica la expresión transgénica en DRG, se clonaron dianas de miARN que se expresan únicamente en neuronas de DRG en las regiones no traducidas 3' del transgén (Figura 2B). Cualquier mRNA expresado a partir del vector sería destruido por el miARN expresado de manera endógena.

Se usó un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad y especificidad de la estrategia de miARN. Se construyeron plásmidos *cis* de AAV para incluir cuatro concatémeros repetidos de las secuencias de miARN dianas en la región no traducida 3' del casete de expresión (Figura 2B). Los plásmidos *cis* de AAV se cotransfectaron en células HEK293 con plásmidos que expresaban miR183. La expresión de GFP transgénica se redujo en presencia de miR183 solo cuando contenía la secuencia de reconocimiento de cognado (Figura 3A).

Se evaluaron la actividad y especificidad *in vivo* de dianas de miARN potenciales dentro de los vectores AAV en ratones C57Bl/6J. Se evaluaron los vectores que expresaban GFP con o sin dianas de miARN de dos miembros del complejo miRNA183 (miR182 y miR183), así como miR145. Inicialmente se analizó miR96, otro miembro del complejo 183, pero se eliminó debido a la disminución de la expresión transgénica en las cortezas de ratones (no mostrado). Los animales recibieron inyecciones intravenosas (IV) de dosis alta de AAV9 para dirigirse a DRG e inyecciones de AAV-PHP.B (AAV9-PHP.B.CB7.CI.GFP.rBG) de dosis alta para dirigirse al SNC. Los animales se sometieron a necropsia en el día 21 y se analizaron para detectar expresión de GFP en DRG

mediante inmunohistoquímica (IHC) y microscopía de fluorescencia directa en el cerebro y el hígado. La expresión de GFP en neuronas de DRG se redujo sustancialmente con vectores que contenían dianas de miR183 y miR182, pero las dianas de miR145 no tuvieron efecto (Figura 3B y Figura 3C). No hubo una reducción aparente de la expresión en el hígado o en otros compartimentos del SNC con vectores que contenían alguna de las dianas de miR. La expresión pareció ser levemente mejor en el SNC con el vector de miR183 (Figura 3D). En este experimento con ratón, no se pudo evaluar el impacto de la inhibición transgénica de miR183 sobre la patología dado que la toxicidad de DRG inducida por el vector solo se ha observado en NHP.

La expresión transgénica restringida por miR183 reduce la toxicidad de DRG en NHP

En función de los datos alentadores en ratones, se evaluó el casete de expresión de miR183 de GFP en NHP. Se inyectaron por vía ICM vectores AAVhu68 que expresaban GFP (AAV9.CB7.CI.GFP.rBG) (N=2) o miR183 de GFP (AAV9.CB7.CI.GFP.miR183.rBG) (N=4) de un promotor de CB7 en *Macaca mulatta* ($3,5 \times 10^{13}$). La mitad de los animales se sometió a necropsia en el día 14 para determinar la expresión de GFP (Figura 4B - IHC representativa de expresión de GFP; Figura 4B - cuantificación de la expresión). Los animales restantes se sometieron a necropsia en el día 60 para evaluar la expresión y toxicidad de DRG (Figura 4C - degeneración de DRG, axonopatía de espina dorsal y axonopatía del nervio periférico). Los animales toleraron el vector administrado por vía ICM sin secuelas clínicas. Hubo una reducción estadísticamente significativa de la expresión de GFP en DRG con el vector de miR183 y una mejora o expresión similar en otras partes, que incluyen las neuronas motores lumbares, el cerebelo, la corteza, el corazón y el hígado (Figura 4A y Figura 4B). Esto se asoció a una reducción notable de la patología en nueve regiones (axonopatía de DRG y espina dorsal en la espina cervical, posterior y lumbar y axonopatía de los nervios mediano, peroneo y radial; Figura 4C). Sin dianas de miR183 en el vector, la patología estaba presente en todas las regiones y distribuida de manera pareja entre grado 4, grado 2 y grado 1. Con el vector de miR183, la mayor patología fue de grado 2 y estaba presente únicamente en 11 % de las regiones; las regiones restantes eran de grado 1 (72 %) o no tenían patología (16 %).

Estos estudios demostraron que la expresión de GFP se reprime de manera selectiva en las neuronas sensoriales de DRG con vectores que contienen dianas de miR183. Otras neuronas del SNC y órganos periféricos no se vieron afectados. En consecuencia, la toxicidad y axonopatía secundaria de DRG se redujeron de niveles marcados/graves a mínimos en el contexto de un transgén altamente inmunogénico/tóxico (GFP).

Ejemplo 3: La represión específica de la expresión de proteína terapéutica en ganglios de la raíz dorsal después de la administración mediante AAV de un genoma del vector que tiene secuencias diana de miARN.

Se evaluaron adicionalmente las secuencias diana de miR183 en NPH mediante el uso de vectores que expresaban hDUA humana, una enzima deficiente en pacientes con mucopolisacaridosis tipo I. Los estudios con este transgén humano fueron los primeros en destacar la toxicidad de DRG en NPH (Hordeaux, J., *et al.* Mol Ther Methods Clin Dev 10:79-88, 2018). El experimento incluyó tres grupos (N=3/grupo): 1) grupo 1: vector de control solo sin dianas de miR183 (AAVhu68.CB7.Cl.hIDUAcoV1.rBG); 2) grupo 2: vector de control sin dianas de miR183 (AAVhu68.CB7.Cl.hIDUAcoV1.rBG) en animales tratados con esteroides (1 mg/kg/día de prednisolona desde el día menos 7 hasta el día 30 seguido de disminución progresiva); y 3) grupo 3: vector con dianas de miR183 (AAVhu68.CB7.Cl.hIDUAcoV1.miR183.rBG). Todos los genomas del vector incluyeron una secuencia codificante de hDUA bajo el control de un promotor de β -actina de pollo y elementos mejoradores de CMV (denominados promotores de CB7), un intrón quimérico (CI) que consiste en un donante de empalme de β -actina de pollo (973 bp, GenBank: X00182.1) y un elemento aceptor de empalme de β -globina de conejo, y una señal de poliadenilación de β -globina de conejo (rBG, 127 bp, GenBank: V00882.1). El genoma del vector de ITR.CB7.Cl.hIDUAcoV1.rBG.ITR se proporciona en SEQ ID NO: 14. El genoma del vector de ITR.CB7.Cl.hIDUAcoV1.miRNA183.rBG.ITR se proporciona en SEQ ID NO: 15. Todos los animales recibieron una inyección ICM de un vector AAVhu68 (1×10^{13} GC) que expresa hDUA del promotor de CB7 constitutivo. Se realizaron necropsias en el día 90 para evaluar la expresión transgénica y la toxicidad relacionada a DRG.

Los animales de todos los grupos toleraron el vector de ICM sin descubrimientos clínicos relacionados al vector ni anomalías en patología clínica (Tabla 1 y Tabla 2). La pleocitosis en CSF fue muy baja y limitada a un animal en el grupo 2 y un animal en el grupo 3 (Tabla 3). Tanto las respuestas de los linfocitos T (medidas mediante ELISPOT) como los anticuerpos contra hDUA se detectaron en los tres grupos (Figura 7A – Figura 7D). Las citocinas de CSF se redujeron en el grupo 3 en comparación con el grupo 1 en los días 21 y 35 posteriores a la inyección mientras que los niveles se redujeron en el grupo 2 (esteroides) a las 24 horas (Figura 8). El día 21-35 corresponde al pico de expresión del transgén cuando se esperaría estrés inducido por la sobreexpresión.

Al usar fluorescencia directa e hibridación *in situ* (ISH), se observó una alta expresión de hDUA en DRG en los grupos 1 y 2 que usaron el vector de control (sin diana de miR183; Figura 5 y Figura 6A). Se detectaron niveles moderados de expresión de hDUA en otros

compartimentos de SNC que incluyen las neuronas motores inferiores de la médula espinal y las neuronas del cerebelo y corticales (Figura 5 y Figura 6A). Incluir la diana de miR183 en el vector (grupo 3) mitigó la expresión de hIDUA en neuronas de DRG sin disminuir la expresión en el SNC (Figura 5 y Figura 6A). La reducción de la expresión de hIDUA en DRG mediante miR183 no fue debido a la menor transferencia génica ya que la biodistribución del vector a través del SNC y los DRG fue esencialmente igual en todos los grupos (Figura 9). Los esteroides disminuyeron moderadamente la expresión en DRG y la aumentaron en neuronas motoras inferiores en comparación con el grupo 1 (Figura 5 y Figura 6A). Como se esperaba, el grupo 1 exhibió la patología en DRG, columna dorsal y nervio periférico. Sin embargo, estos hallazgos estuvieron completamente ausentes al usar un vector con dianas de miR183 (grupo 3, Figura 6B). Curiosamente, el cotratamiento con esteroides (grupo 2) no redujo la toxicidad del vector parental (es decir, que no contenía miR183). De hecho, no se observó una tendencia de toxicidad empeorada (Figura 6B).

Tabla 1 Química de la sangre en NHP inyectados ICM con vectores de AAV.hIDUA

N.º de animal y grupo	Punto temporal	Proteína total	Albúmina	Globulina	Relación de A/G	AST	ALT	Fosfatasa de Alk	GGT	Bilirrubina total	BUN	Creatinina
		g/ dL	g/ dL	g/ dL	-	(UI /L)	(UI/L)	(UI/L)	(UI /L)	mg /dL	mg/ dL	mg/ dL
17C024 AAVhu68.h IDUA	Valor inicial	5,6	3,8	1,8	2,1	33	40	703	64	0,1	27	0,6
	D0	6,0	3,7	2,3	1,6	28	36	682	61	0,1	23	0,4
	D7	6,1	3,9	2,2	1,8	30	33	680	64	0,1	30	0,5
	D21	5,9	3,7	2,2	1,7	25	22	825	66	0,1	21	0,5
	D35	5,9	3,4	2,5	1,4	32	24	777	74	0,1	22	0,5
	D60	5,9	3,7	2,2	1,7	28	30	815	74	0,1	28	0,4
	D90	5,5	3,6	1,9	1,9	29	25	689	76	0,1	24	0,6

N.º de animal y grupo	Punto temporal	Proteína total	Albúmina	Globulina	Relación de A/G	AST	ALT	Fosfatasa de Alk	GGT	Bilirrubina total	BUN	Creatinina
		g/ dL	g/ dL	g/ dL	-	(UI /L)	(UI/L)	(UI/L)	(UI /L)	mg /dL	mg/ dL	mg/ dL
17C031 AAVhu68.h IDUA	Valor inicial	5,7	3,8	1,9	2,0	35	39	539	36	0,1	27	0,5
	D0	6,5	4,0	2,5	1,6	37	43	570	47	0,2	23	0,4
	D7	6,3	3,9	2,4	1,6	27	39	547	45	0,1	26	0,5
	D21	6,6	3,9	2,7	1,4	33	34	476	39	0,1	25	0,6
	D35	6,3	3,4	2,9	1,2	32	31	591	42	0,1	24	0,5
	D60	6,2	4,0	2,2	1,8	32	33	545	45	0,1	25	0,4
	D90	6,0	3,6	2,4	1,5	34	27	478	43	0,1	24	0,5
17C029 AAVhu68.h IDUA	Valor inicial	6,8	3,6	3,2	1,1	41	43	574	74	0,1	27	0,7
	D0	6,9	4,0	2,9	1,4	27	40	607	79	0,1	18	0,7
	D7	7,1	3,8	3,3	1,2	29	40	503	71	0,1	24	0,6
	D21	6,9	3,9	3,0	1,3	49	38	557	77	0,1	15	0,6
	D35	6,6	3,6	3,0	1,2	30	33	555	76	0,1	19	0,6
	D60	6,3	4,0	2,3	1,7	38	43	545	86	0,1	22	0,6
	D90	6,2	3,7	2,5	1,5	31	23	506	81	0,1	20	0,6
17C016 AAVhu68.h IDUA +	Valor inicial	6,0	3,9	2,1	1,9	42	35	623	59	0,2	16	0,5
	D0	6,8	4,1	2,7	1,5	33	58	588	59	0,2	16	0,4
	D7	6,3	3,9	2,4	1,6	26	28	444	51	0,1	20	0,5

N.º de animal y grupo	Punto temporal	Proteína total	Albúmina	Globulina	Relación de A/G	AST	ALT	Fosfatasa de Alk	GGT	Bilirrubina total	BUN	Creatinina
		g/ dL	g/ dL	g/ dL	-	(UI /L)	(UI/L)	(UI/L)	(UI /L)	mg /dL	mg/ dL	mg/ dL
esteroides	D21	6,4	3,7	2,7	1,4	29	23	393	44	0,2	16	0,6
	D35	6,9	3,9	3,0	1,3	32	29	364	41	0,1	21	0,5
	D60	6,5	3,8	2,7	1,4	41	29	525	63	0,2	23	0,5
	D90	5,7	3,6	2,1	1,7	32	29	752	79	0,1	12	0,5
17C019 AAVhu68.h IDUA + Esteroides	Valor inicial	5,5	3,4	2,1	1,6	35	42	338	49	0,1	31	0,6
	D0	6,3	3,7	2,6	1,4	32	39	383	49	0,1	19	0,6
	D7	6,1	3,6	2,5	1,4	26	34	322	47	0,1	30	0,7
	D21	6,0	3,3	2,7	1,2	28	32	332	53	0,1	19	0,7
	D35	5,9	3,5	2,4	1,5	42	38	378	49	0,1	27	0,6
	D60	5,6	3,6	2,0	1,8	35	36	437	61	0,2	23	0,5
	D90	5,6	3,6	2,0	1,8	41	34	650	73	0,2	21	0,6
17C020 AAVhu68.h IDUA + esteroides	Valor inicial	6,1	4,1	2,0	2,1	26	33	641	87	0,1	21	0,7
	D0	6,5	4,1	2,4	1,7	21	25	538	61	0,1	12	0,6
	D7	6,9	4,0	2,9	1,4	21	28	463	58	0,1	21	0,7
	D21	6,6	4,0	2,6	1,5	23	29	456	55	0,1	13	0,5
	D35	6,2	3,7	2,5	1,5	22	26	309	54	0,1	20	0,6
	D60	6,2	4,1	2,1	2,0	26	27	516	90	0,1	19	0,5
	D90	6,1	3,8	2,3	1,7	23	22	605	82	0,1	16	0,6

N.º de animal y grupo	Punto temporal	Proteína total	Albumina	Globulina	Relación de A/G	AST	ALT	Fosfatasa de Alk	GGT	Bilirrubina total	BUN	Creatinina
		g/ dL	g/ dL	g/ dL	-	(UI /L)	(UI/L)	(UI/L)	(UI /L)	mg /dL	mg/ dL	mg/ dL
17-167 AAVhu68.h IDUA- miR183	Valor inicial	6,6	3,9	2,7	1,4	24	21	764	11 2	0,1	18	0,5
	D0	6,7	4,1	2,6	1,6	27	21	606	88	0,1	20	0,4
	D7	6,6	3,9	2,7	1,4	31	27	606	87	0,1	24	0,6
	D21	6,8	4,2	2,6	1,6	29	27	584	10 2	0,1	22	0,5
	D35	6,6	4,0	2,6	1,5	35	34	642	93	0,1	16	0,5
	D60	6,0	3,7	2,3	1,6	37	25	689	79	0,1	15	0,6
	D90	6,6	3,9	2,7	1,4	24	21	764	11 2	0,1	18	0,5
17-215 AAVhu68.h IDUA- miR183	Valor inicial	6,1	3,4	2,7	1,3	24	34	536	51	0,1	22	0,5
	D0	6,5	3,6	2,9	1,2	29	50	568	54	0,2	21	0,5
	D7	6,3	3,7	2,6	1,4	24	35	499	46	0,1	27	0,6
	D21	6,2	3,5	2,7	1,3	31	37	526	58	0,1	21	0,5
	D35	6,0	3,4	2,6	1,3	33	47	619	57	0,1	18	0,4
	D60	6,1	3,7	2,4	1,5	40	50	628	45	0,2	18	0,5
	D90	6,3	3,9	2,4	1,6	27	42	856	55	0,1	17	0,6
17-102 AAVhu68.h	Valor inicial	6,7	3,8	2,9	1,3	24	31	613	57	0,1	20	6,7

N.º de animal y grupo	Punto temporal	Proteína total	Albúmina	Globulina	Relación de A/G	AST	ALT	Fosfatasa de Alk	GGT	Bilirrubina total	BUN	Creatinina
		g/ dL	g/ dL	g/ dL	-	(UI /L)	(UI/L)	(UI/L)	(UI /L)	mg /dL	mg/ dL	mg/ dL
IDUA- miR183	D0	7,0	3,6	3,4	1,1	32	35	632	57	0,1	13	7,0
	D7	6,9	3,9	3,0	1,3	31	25	601	57	0,1	16	6,9
	D21	7,0	3,8	3,2	1,2	31	30	611	65	0,1	20	7,0
	D35	6,8	3,8	3,0	1,3	28	29	684	59	0,1	20	6,8
	D60	6,4	3,8	2,6	1,5	34	36	588	44	0,1	20	6,4
	D90	7,0	4,0	3,0	1,3	27	28	576	41	0,1	18	7,0

Tabla 2. Recuento sanguíneo completo en NHP inyectados ICM con vectores de AAV.hIDUA

N.º de animal y grupo	Punto temporal	WBC	RBC	HGB	HCT	Plaquetas	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos
		x10 ³ / µl	x10 ⁶ / µl	g/d L	%	x10 ³ / µl	/µl	/µl	/µl	/µl	/µl
17C024 AAVhu68.hID UA	Valor inicial	8,6	6,1	13, 1	43	305	2838	524 6	344	172	0
	D0	6,1	5,5	12, 7	40	304	3294	256 2	183	61	0
	D7	5,3	5,1	11, 2	38	343	1060	386 9	265	106	0
	D21	6,7	5,7	12, 8	42	289	1742	442 2	335	201	0
	D35	5,6	5,6	12, 7	42	377	1792	358 4	168	56	0
	D60	6,6	5,8	13, 0	42	356	1716	448 8	198	198	0
	D90	5,4	5,7	13, 1	41	399	1674	345 6	162	108	0
17C031 AAVhu68.hID UA	Valor inicial	11,9	5,3	12, 6	41	386	4879	618 8	476	357	0
	D0	5,5	5,2	12, 5	41	366	2255	297 0	165	110	0
	D7	14,4	4,8	11, 2	39	357	8064	504 0	864	432	0

N.º de animal y grupo	Punto temporal	WBC	RBC	HGB	HCT	Plaquetas	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos
		x10 ³ / µl	x10 ⁶ / µl	g/d L	%	x10 ³ / µl	/µl	/µl	/µl	/µl	/µl
	D21	10,7	5,4	12, 8	43	410	5136	481 5	428	321	0
	D35	9,7	5,3	12, 8	43	267	4559	455 9	388	194	0
	D60	8,3	5,3	12, 7	42	390	2988	473 1	332	249	0
	D90	8,4	4,9	12, 1	39	414	4284	294 0	672	420	84
17C029 AAVhu68.hID UA	Valo r inici al	15,5	5,9	12, 7	43	561	4495	961 0	775	620	0
	D0	15,1	5,7	12, 6	41	493	9362	468 1	755	302	0
	D7	11,2	5,8	12, 7	43	576	2800	728 0	784	336	0
	D21	10,6	5,8	12, 6	42	496	4982	477 0	530	318	0
	D35	12,0	5,8	13, 1	44	511	2520	828 0	600	600	0
	D60	11,6	5,8	13, 6	43	497	3480	719 2	696	232	0
	D90	19,6	5,7	12, 9	42	283	1489 6	352 8	980	196	0
17C016	Valo	10,2	5,9	13, 13	44	235	1734	775	306	408	0

N.º de animal y grupo	Punto temporal	WBC	RBC	HGB	HCT	Plaquetas	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos
		x10 ³ / µl	x10 ⁶ / µl	g/d L	%	x10 ³ / µl	/µl	/µl	/µl	/µl	/µl
AAVhu68.hID UA + esteroides	r inici al			5				2			
	D0	8,9	5,6	12, 9	44	353	3382	507 3	356	89	0
	D7	9,6	5,5	12, 3	41	346	2976	595 2	576	96	0
	D21	11,9	5,4	12, 4	41	424	2856	833 0	595	119	0
	D35	7,9	5,4	12, 7	43	352	4977	252 8	316	79	0
	D60	8,7	5,6	12, 8	43	380	2610	565 5	348	87	0
	D90	8,4	5,4	12, 7	41	357	2940	495 6	420	84	0
17C019 AAVhu68.hID UA + Esteroides	Valo r inici al	10,7	5,5	13, 4	40	257	6099	406 6	214	321	0
	D0	10,6	6,4	13, 9	49	358	7208	265 0	318	424	0
	D7	10,8	5,9	13, 1	44	286	3564	604 8	108 0	108	0
	D21	12,3	5,7	12, 9	41	462	5658	590 4	492	246	0

N.º de animal y grupo	Punto temporal	WBC	RBC	HGB	HCT	Plaquetas	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos
		x10 ³ / µl	x10 ⁶ / µl	g/d L	%	x10 ³ / µl	/µl	/µl	/µl	/µl	/µl
	D35	12,4	5,9	13, 4	45	297	7812	372 0	620	248	0
	D60	8,6	5,8	13, 4	43	373	3612	438 6	430	172	0
	D90	11,1	5,5	13, 0	41	349	8214	244 2	333	111	0
17C020 AAVhu68.hID UA + esteroides	Valo r inici al	14,6	6,5	14, 1	47	357	4818	876 0	584	438	0
	D0	15,4	6,1	13, 7	44	339	8778	539 0	616	616	0
	D7	14,0	6,0	13, 4	43	378	4060	868 0	840	420	0
	D21	14,4	5,7	12, 9	42	327	6336	705 6	720	144	144
	D35	11,1	6,2	13, 9	45	369	2664	777 0	444	222	0
	D60	10,8	6,2	14, 0	45	380	4104	594 0	324	432	0
	D90	7,2	5,9	13, 5	44	296	2376	453 6	216	72	0
17-167 AAVhu68.hID	Valo r inici	10,6	5,4	13, 7	44	245	1802	816 2	530	106	0

N.º de animal y grupo	Punto temporal	WBC	RBC	HGB	HCT	Plaquetas	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos
		x10 ³ / µl	x10 ⁶ / µl	g/d L	%	x10 ³ / µl	/µl	/µl	/µl	/µl	/µl
UA-miR183	al										
	D0	7,2	5,1	12, 2	40	373	936	590 4	288	72	0
	D7	7,6	4,9	12, 2	39	258	1140	608 0	304	76	0
	D21	10,2	5,5	13, 4	45	270	3468	571 2	714	102	204
	D35	10,6	5,3	13, 2	42	275	5406	466 4	424	106	0
	D60	9,5	5,2	13, 4	42	115	3515	551 0	380	95	0
	D90	10,6	5,4	13, 7	44	245	1802	816 2	530	106	0
17-215 AAVhu68.hID UA-miR183	Valo r inici al	12,9	5,8	12, 7	44	380	2709	954 6	387	258	0
	D0	10,0	5,5	11, 9	40	374	3600	590 0	300	200	0
	D7	11,2	5,4	12, 0	40	423	2800	761 6	560	224	0
	D21	11,8	5,2	11, 3	39	375	2242	908 6	236	118	118
	D35	12,5	5,6	12, 4	42	337	5125	662 5	500	250	0

N.º de animal y grupo	Punto temporal	WBC	RBC	HGB	HCT	Plaquetas	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos
		x10 ³ / µl	x10 ⁶ / µl	g/d L	%	x10 ³ / µl	/µl	/µl	/µl	/µl	/µl
	D60	10,3	5,4	12, 1	39	315	3811	597 4	309	206	0
	D90	13,7	5,3	12, 1	38	415	8494	479 5	274	137	0
17-102 AAVhu68.hID UA-miR183	Valo r inici al	5,3	6,0	14, 0	46	518	530	381 6	371	530	53
	D0	12,4	5,9	13, 5	44	478	6944	458 8	496	372	0
	D7	9,2	5,8	13, 1	44	501	3312	496 8	368	552	0
	D21	9,0	5,9	14, 0	45	510	2250	594 0	540	270	0
	D35	9,4	6,4	14, 5	49	409	3760	488 8	564	188	0
	D60	9,1	6,2	14, 6	46	410	3276	500 5	455	364	0
	D90	7,8	5,9	14, 4	44	528	3042	421 2	312	234	0

Tabla 3. Recuento de glóbulos blancos de CSF (células por μ l) en NHP inyectados ICM con vectores de AAV.hIDUA

Grupo	N.º de animal	Día 0	Día 21	Día 35	Día 60	Día 90
AAVhu68.h IDUA	17C024	0	1	2	1	2
	17C031	0	1	2	1	1
	17C029	0	0	0	0	0
AAVhu68.h IDUA + esteroides	17C016	0	0	0	0	3
	17C019	0	1	2	1	0
	17C020	0	0	5	1	Contaminación sanguínea
AAVhu68.h IDUA-miR183	17-167	0	2	3	1	1
	17-215	0	1	2	1	1
	17-102	0	3	7	2	0

Es posible que la toxicidad de DRG ocurra en cualquier tratamiento que depende de dosis de vector sistémicas altas o administración directa de vector en el CSF. Esta preocupación de seguridad se limita a primates y ha sido en general asintomática. Sin embargo, la toxicidad de DRG puede causar morbilidad sustancial tal como ataxia debido a defectos propioceptivos (Hinderer, C., *et al.* Hum Gene Ther. 29(3):285-298, 2018) o dolor neuropático resistente al tratamiento. La Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos pausó recientemente un ensayo clínico de AAV9 intratecal para SMA de aparición tardía debido a la toxicidad de DRG en NHP, lo que destaca cómo este riesgo puede limitar el desarrollo de tratamientos de AAV (Novartis. Novartis anuncia una actualización del estudio intratecal de AVXS-101, 2019).

Se formuló originalmente la hipótesis de que esta toxicidad era causada por la inmunidad de linfocitos T destructivos a neuronas transducidas en DRG dirigidos hacia cápside extraña o epítopos transgénicos. Sin embargo, los regímenes de fuerte inhibición inmunitaria tales como MMF y rapamicina no previnieron la toxicidad en estudios de toxicología (Hordeaux, J., *et al.* Mol Ther Methods Clin Dev 10:68-78, 2018; Hordeaux, J., *et al.* Mol Ther Methods Clin Dev 10:79-88, 2018), y tampoco lo hicieron los esteroides en

este estudio. La evolución en el tiempo de la degeneración de DRG retardada pero no progresiva no respaldó la noción de que la inmunidad adaptativa cumplía una función. De haber estado involucrados los linfocitos T citotóxicos, se habría observado la degeneración de DRG e infiltrados celulares mononucleares que comenzaron temprano y progresaron con el tiempo.

Puede que los altos niveles de transducción de DRG creen estrés celular, que causa degeneración en las neuronas de DRG altamente transducidas. Dado que la toxicidad se puede prevenir inhibiendo el mRNA transgénico y la expresión proteica, ADN de cápside o vector no puede ser el estresante celular. El análisis histológico demostró que la degeneración se limitó a neuronas de DRG que expresaban los mayores niveles de proteína transgénica. La evolución en el tiempo de la degeneración neuronal de DRG retardada pero autolimitada es consistente con la noción de que la toxicidad no inmunitaria está restringida a un subconjunto de células altamente transducidas. No queda claro si la toxicidad y axonopatía de DRG son reversibles. Después del seguimiento de animales adultos durante seis meses, no se han observado reducciones consistentes en la patología. El único experimento en donde se observó toxicidad de DRG en NHP después de la inyección ICM fue cuando el vector se administró a macacos de un mes de edad que se sometieron a necropsia cuatro años más tarde (Hordeaux *et al.*, 2019). Es posible que los primates bebés sean resistentes a la toxicidad de DRG, o que sus neuronas de DRG tengan capacidad regenerativa, o que las lesiones se reduzcan durante este período extendido de tiempo.

Los hallazgos presentados respaldan que la toxicidad de DRG es causada por la sobreexpresión transgénica. Por lo tanto, la gravedad de la toxicidad de DRG debería verse influenciada por la dosis, la concentración del promotor y la naturaleza del transgén. Todavía no se comprende la razón por la cual las neuronas sensoriales son una de las células más eficazmente transducidas en primates. Los DRG se acceden fácilmente mediante vectores administrados de manera sistémica porque residen fuera del SNC y tienen capilares fenestrados y porosos. El vector sistémico también puede acceder a las neuronas de DRG mediante transporte retrógrado después de la absorción de axones periféricos. La anatomía de los compartimentos neuronales sensoriales que residen dentro del espacio intratecal puede promover una alta transducción de vectores administrados en el CSF. Los axones de neuronas de DRG en las raíces dorsales están expuestas a CSF que proporcionan un fácil acceso al vector después de la administración ICM/LP. El acceso abierto del espacio subaracnoideo al fluido extracelular de los DRG debería permitir el contacto directo del vector DRGICM/LP con los cuerpos celulares

neuronales y otras células de los DRG. La inhibición de la expresión transgénica dentro de las neuronas de DRG con miR183 facilitó un análisis de expresión transgénica en otras células de DRG que miR no debería influenciar. ISH reveló mRNA transgénico en células satélite gliales circundantes, lo que podría sugerir transducción directa (Figura 6C). Se desconoce la consecuencia funcional de mRNA transgénico en células gliales.

Inhibir de manera selectiva la expresión transgénica del vector debería reducir y potencialmente eliminar la toxicidad de DRG. La clave para alcanzar esto es una estrategia para extinguir específicamente la expresión en neuronas de DRG sin afectar la expresión en otros lugares. En la actualidad no existen maneras de lograr esta especificidad a través de modificaciones de la cápside o promotores específicos de tejido. Incluir dianas de miR183 en el vector alcanzó el resultado deseado de reducir/eliminar la toxicidad de DRG sin afectar la fabricación, potencia o biodistribución del vector. En el estudio con NHP de hDUA mencionado anteriormente se incluyó un grupo que recibió un vector no miR183 con esteroides concomitantes, un enfoque estándar para mitigar la toxicidad mediada por el sistema inmunitario en ensayos de AAV. La toxicidad de DRG no se redujo en el grupo tratado con esteroides; de hecho, la tendencia fue hacia una toxicidad empeorada. Este experimento demuestra las limitaciones de los esteroides profilácticos en ensayos de tratamientos génicos de AAV.

La modularidad de este enfoque para disminuir la toxicidad de DRG sugiere su uso en cualquier vector de AAV considerado para el tratamiento génico del SNC en donde es deseable mitigar la toxicidad de DRG inducida por AAV. Este enfoque se puede usar a través de una amplia variedad de vectores de AAV para aplicaciones terapéuticas.

Ejemplo 4: Evaluación *in vitro* de los constructos de expresión con secuencias diana de agrupamiento miR183

Se usó un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad y especificidad de los constructos que albergan secuencias diana de miARN. Como se describió en el ejemplo 2 anterior, las células HEK293 (u otra línea celular adecuada) se cotransfectan con un plásmido *cis* que tiene el transgén de GFP y plásmidos que expresan uno o más miARN, tales como miR-182 y miR-183. Los plásmidos *cis* están diseñados con una cantidad variable de secuencias de miARN diana correspondientes en la 3'UTR de los casetes de expresión y se introducen secuencias espaciadoras alternativas. 72 horas después de la transfección, se cuantifica la expresión de GFP para determinar los niveles relativos de expresión.

Por ejemplo, se evalúan los constructos que albergan una, dos, tres o cuatro copias de

secuencias de miR183 diana. Las secuencias diana individuales están vinculadas directamente o separadas por secuencias espaciadoras, tales como las proporcionadas en SEQ ID NO: 5-7. En función de los resultados del estudio *in vitro*, se identifica la combinación adecuada de secuencias (incluso cantidad de repeticiones) y espaciadores que reducen o eliminan la expresión de GFP. Luego, los candidatos de este estudio se evalúan *in vivo* mediante la administración de vectores de AAV (por ejemplo AAV9 o AAV-PHP.B) que tienen constructos de expresión con la misma disposición o una similar de secuencias de miARN y secuencias espaciadoras. En el Ejemplo 2 se proporciona un estudio en ratones *in vivo* de ejemplo para evaluar los niveles de expresión en el SNC, que incluye, por ejemplo, el no direccionamiento de DRG (es decir, la reducción de expresión de GFP).

También se realizan estudios similares mediante el uso de constructos que tienen combinaciones de una, dos, tres o cuatro copias de secuencias diana de miR182 con y sin diversas secuencias espaciadoras. Además, se generan constructos que tienen combinaciones y diferentes disposiciones de secuencias de reconocimiento de miR182 y miR183. Los constructos que solo tienen secuencias diana de miR182 y combinaciones de secuencias diana de miR182 y miR183 que muestran niveles reducidos favorables de expresión *in vitro* se evalúan luego *in vivo*, por ejemplo, después de la administración de vectores de AAV para determinar la toxicidad y los niveles de expresión transgénica (grado de no direccionamiento) en células de SNC y DRG.

De manera alternativa, se generan constructos con una, dos, tres o cuatro copias de una combinación de secuencia diana de miR182 y/u otras secuencias diana de agrupamiento mir183 (es decir, secuencias diana que corresponden a miR-183, -96 o -182). Los constructos que albergan la secuencia diana del agrupamiento combinado miR182-mir183 se analizan *in vitro* mediante un ensayo de expresión de GFP tal como el descrito en el Ejemplo 2 anterior. Como se mostró anteriormente, los casetes de expresión evaluados tienen diversas cantidades de secuencias diana de miARN separadas o no separadas por secuencias espaciadoras. La actividad de ciertos constructos que tienen combinaciones de secuencias diana de miR182 y otras secuencias diana del agrupamiento mir183 se evalúa *in vivo* al generar vectores de AAV que luego se administran por vía IV con dosis alta. Como se mostró anteriormente, la expresión del transgén del vector de AAV se evalúa en diversas células y tejidos, que incluyen DRG y, en particular, en tejido hepático.

Además, se evalúa el efecto de una, dos, tres o cuatro copias de secuencias diana de miR182 de expresión transgénica. Como se mostró anteriormente, se generan

constructos experimentales para pruebas *in vitro* al introducir secuencias diana de miR182 en la 3'UTR de un casete de expresión. Donde se introducen múltiples secuencias de miR182, las secuencias pueden ser consecutivas o, de manera alternativa, estar separadas por cualquiera de diversas secuencias espaciadoras intermedias. Se generan vectores de AAV con casetes de expresión con cualquier combinación de secuencias diana de miR182 y, cuando corresponda, secuencias espaciadoras, y se los evalúa *in vivo*. En particular, en el caso de casetes de expresión que tienen secuencias diana de miR182, la expresión transgénica se evalúa en el tejido muscular después de una administración IV de dosis alta del vector de AAV.

Ejemplo 5: No direccionamiento de un transgén de iduronato-2-sulfatasa humana (hIDS) para el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo II (MPS II).

Una estrategia para el tratamiento de MPS II (síndrome de Hunter) es reemplazar de manera funcional la iduronato-2-sulfatasa defectuosa de un paciente mediante un tratamiento génico dirigido al SNC basado en rAAV (ver, por ejemplo, la solicitud de patente internacional N.º PCT/US2017/027770, que se incorpora en la presente por referencia). Para reducir la toxicidad de DRG, se modifican los genomas del vector de AAV para el tratamiento de MPSII al introducir secuencias diana de miR. En consecuencia, los genomas del vector de AAV que contienen secuencia codificante de hIDS se diseñan con una, dos, tres o cuatro secuencias diana de miR183. La eficacia del no direccionamiento de DRG *in vivo* se mide, por ejemplo, después de la administración intratecal del vector de AAV que codifica hIDS a NHP.

Ejemplo 6: No direccionamiento de un transgén de SMN1 para el tratamiento de atrofia muscular espinal (SMA)

SMA es un trastorno recesivo autosómico causado por las mutaciones o eliminación del gen hSMN1. La administración de proteína de SMN funcional a través de vectores de rAAV ha sido eficaz para el tratamiento de SMA pero se ha observado toxicidad de DRG. Los vectores adecuados incluyen los descritos en la solicitud de patente internacional N.º PCT/US2018/019996, que se incorpora en la presente por referencia, y Zolgensma®, un tratamiento génico basado en AAV9. La reducción o eliminación de toxicidad de DRG después de la administración de vectores de AAV que codifican SMN1 humana se alcanza mediante la incorporación de secuencias diana de miARN, tales como aquellas reconocidas por miR182 y miR183, en el genoma del vector. En consecuencia, se

generan vectores de AAV, incluso aquellos con cápsides de AAV9 o AAVhu68, con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un transcripto de hSMN1 en combinación con una, dos, tres o cuatro secuencias diana de miARN. Las secuencias diana se seleccionan, por ejemplo, de secuencias diana de miR182 y miR183, o una combinación de estas. La toxicidad de DRG después de la administración intratecal o IV de vectores de AAV que expresan hSMN1 se evalúa en un modelo de NHP.

Ejemplo 7: Vectores de tratamiento génico dirigidos al hígado que tienen secuencias diana de miARN

Donde es deseable una expresión mejorada de un transgén en el tejido hepático para un tratamiento génico, los genomas del vector de AAV se pueden modificar para incluir secuencias diana de miARN. Por ejemplo, un rAAV diseñado para expresar un gen receptor funcional de lipoproteína de baja densidad (hLDLR) y portar una cápside de AAV8 es adecuado para el tratamiento de hipercolesterolemia familiar (HF) (ver, por ejemplo, la solicitud de patente internacional N.º PCT/US2016/065984, que se incorpora en la presente por referencia). La expresión mejorada del transgén de hLDLR en tejido hepático se alcanza mediante el uso de un rAAV con un genoma del vector que tiene una secuencia codificante de hLDLR en combinación con una, dos, tres o cuatro secuencias diana de miR182. Del mismo modo, los tratamientos génicos para hemofilia A (Factor VIII) y hemofilia B (Factor IX) incluyen vectores con tropismo para el hígado (ver, por ejemplo, la solicitud de patente internacional N.º PCT/US2017/027396 y la solicitud de patente internacional N.º PCT/US2017/027400, que se incorporan en la presente por referencia). La expresión y administración más eficaz de los factores VIII y IX humanos en el hígado se logra al administrar rAAV con genomas del vector que tienen una, dos, tres o cuatro secuencias diana de miR182 en combinación con el transgén.

(Texto libre de listado de secuencias)

La siguiente información se proporciona para secuencias que contienen texto libre con identificador numérico <223>.

SEQ ID NO: (que contiene texto libre)	Texto libre bajo <223>
1	<223> diana de miR-183

SEQ ID NO: (que contiene texto libre)	Texto libre bajo <223>
2	<223> diana de mirR-96
3	<223> diana de miR-182
4	<223> diana de miR-145
5	<223> Espaciador (i)
6	<223> Espaciador (ii)
7	<223> espaciador iii
10	<223> ITR.CB7.Cl.eGFP.miR145.rBG.ITR <220> <221> repeat_region <222> (1)..(130) <223> 5' - AAV2 - ITR <220> <221> misc_feature <222> (1)..(130) <223> 5' - AAV2 - ITR <220> <221> promotor <222> (198)..(579) <223> Promotor de CMV IE <220> <221> promotor <222> (582)..(863) <223> Promotor de CB <220> <221> misc_feature <222> (1979)..(2698) <223> gen eGFP

SEQ ID NO: (que contiene texto libre)	Texto libre bajo <223>
	<220> <221> misc_feature <222> (2705)..(2727) <223> miR145 <220> <221> misc_feature <222> (2728)..(2731) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (2732)..(2754) <223> miR145 <220> <221> misc_feature <222> (2755)..(2760) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (2761)..(2783) <223> miR145 <220> <221> misc_feature <222> (2784)..(2789) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (2790)..(2812)

SEQ ID NO: (que contiene texto libre)	Texto libre bajo <223>
	<223> miR145 <220> <221> misc_feature <222> (2981)..(3198) <223> ITR 3'
11	<223> ITR.CB7.Cl.eGFP.miR182.rGB.ITR <220> <221> misc_feature <222> (1)..(130) <223> ITR 5' (AAV2) <220> <221> misc_feature <222> (198)..(579) <223> Promotor de CMV IE <220> <221> misc_feature <222> (582)..(863) <223> Promotor de CB <220> <221> misc_feature <222> (958)..(1930) <223> intrón de beta-actina de pollo <220> <221> misc_feature <222> (1979)..(2698) <223> secuencia codificante de eGFP

SEQ ID NO: (que contiene texto libre)	Texto libre bajo <223>
	<220> <221> misc_feature <222> (2705)..(2728) <223> miR182 <220> <221> misc_feature <222> (2729)..(2732) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (2733)..(2756) <223> miR182 <220> <221> misc_feature <222> (2757)..(2760) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (2763)..(2786) <223> miR182 <220> <221> misc_feature <222> (2787)..(2792) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (2793)..(2816)

SEQ ID NO: (que contiene texto libre)	Texto libre bajo <223>
	<223> miR182 <220> <221> polyA_signal <222> (2858)..(2984) <220> <221> misc_feature <222> (3073)..(3202) <223> ITR 3'
12	<223> ITR.CB7.eGFP.miRNA96.rBG.ITR <220> <221> misc_feature <222> (1979)..(2699) <223> secuencia codificante de eGFP <220> <221> misc_feature <222> (2705)..(2727) <223> miR96 <220> <221> misc_feature <222> (2728)..(2731) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (2732)..(2754) <223> miR96 <220>

SEQ ID NO: (que contiene texto libre)	Texto libre bajo <223>
	<221> misc_feature <222> (2755)..(2760) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (2761)..(2783) <223> miR96 <220> <221> misc_feature <222> (2784)..(2789) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (2790)..(2812) <223> miR96
13	<223> ITR.CB7.Cl.eGFP.miRNA183.rBG.ITR <220> <221> misc_feature <222> (1979)..(2698) <223> secuencia codificante de eGFP <220> <221> misc_feature <222> (2705)..(2726) <223> miARN183 <220> <221> misc_feature

SEQ ID NO: (que contiene texto libre)	Texto libre bajo <223>
	<222> (2727)..(2730) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (2731)..(2752) <223> miARN183 <220> <221> misc_feature <222> (2753)..(2758) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (2781)..(2786) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (2787)..(2808) <223> miARN183
14	<223> ITR.CB7.Cl.hIDUAcoV1.rBG.ITR
15	<223> ITR.CB7.Cl.hIDUAcoV1.miR183.ITR <220> <221> misc_feature <222> (1938)..(3908) <223> hIDUAcoV1 <220> <221> misc_feature <222> (3915)..(3936)

SEQ ID NO: (que contiene texto libre)	Texto libre bajo <223>
	<223> miARN183 <220> <221> misc_feature <222> (3937)..(3940) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (3941)..(3962) <223> miARN183 <220> <221> misc_feature <222> (3963)..(3968) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (3969)..(3990) <223> miARN183 <220> <221> misc_feature <222> (3991)..(3996) <223> espaciador <220> <221> misc_feature <222> (3997)..(4018) <223> miARN183

Todas las publicaciones citadas en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. La solicitud de patente provisional estadounidense N.º

62/783,956, presentada el 21 de diciembre de 2018, la solicitud de patente provisional estadounidense N.º 62/924,970, presentada el 23 de octubre de 2019, y la solicitud de patente provisional estadounidense N.º 62/934,915, presentada el 13 de noviembre de 2019, se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. De manera similar, las SEQ ID NO a las que se hace referencia en la presente y que aparecen en el Listado de secuencias adjunto se incorporan por referencia. Si bien la invención se ha descrito con referencia a formas de realización particulares, se deberá tener en cuenta que se pueden realizar modificaciones sin que esto signifique apartarse del espíritu de la invención. Se pretende que tales modificaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.