

VECTORES AAV CON EL PROMOTOR DE LA PROTEÍNA CERO DE MIELINA Y USOS DE LOS MISMOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ASOCIADAS A LAS CÉLULAS DE SCHWANN COMO LA ENFERMEDAD DE CHARCOT-MARIE-TOOTH

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a vectores virales que se dirigen a enfermedades asociadas con las células de Schwann.

ANTECEDENTES

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) abarca numerosos tipos de neuropatías hereditarias no sindrómicas, que en conjunto se consideran uno de los trastornos neurogenéticos más comunes, con una frecuencia de individuos afectados que alcanza 1:2500 de la población general (1, 2). Las neuropatías CMT se caracterizan por la participación de un número cada vez mayor de genes causantes y fenotipos de solapamiento causados por diferentes genes. Además, varios genes diferentes pueden causar fenotipos idénticos. A pesar de la comprensión cada vez mayor de la base genética compleja y los diversos mecanismos patológicos que sustentan las neuropatías de CMT, actualmente no existe un tratamiento eficaz para ninguna de las formas de CMT y solo puede ofrecerse a los pacientes un tratamiento sintomático y de apoyo. Por tanto, existe una gran necesidad de nuevas estrategias de tratamiento para la CMT. En las últimas dos décadas se ha realizado un esfuerzo por desarrollar terapias génicas para el tratamiento de la CMT. Si bien los diferentes enfoques de terapia génica son prometedores para el futuro para tratar enfermedades del sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico (SNP), aún permanecen múltiples desafíos por superar (3).

Por ejemplo, (49) muestra cómo es posible lograr un efecto terapéutico en el tratamiento de CMT4C mediante el uso de un vector lentiviral. Sin embargo, este efecto fue parcial y el vector lentiviral tiene limitaciones de seguridad para terapias humanas *in vivo*. Anteriormente, otros vectores como los vectores virales adenoasociados (AAV) no se consideraban útiles, ya que a pesar de ser más estables y no integrarse en el genoma del huésped, debido a su máxima capacidad de empaquetamiento de insertos de aproximadamente 4.4 kb de longitud, la utilidad de AAV en las estrategias de terapia génica fue limitada, especialmente en los casos donde el gen a reemplazar es relativamente largo.

Las técnicas de terapia génica que se dirigen a las células de Schwann pueden aplicarse a muchas otras enfermedades asociadas con las células de Schwann además de la CMT, por ejemplo, la enfermedad de las neuronas motoras (MND), e incluyen aquellas que no son causadas exclusivamente por factores genéticos. Muchas de estas enfermedades tienen múltiples causas y no se comprenden bien y, por lo tanto, dirigirse a estas enfermedades mediante el uso de vectores virales puede ser particularmente ventajoso.

En general, sigue existiendo la necesidad de métodos mejorados para dirigirse a enfermedades asociadas con las células de Schwann, incluidas las neuropatías desmielinizantes como la CMT, para lograr mejores efectos terapéuticos.

SUMARIO DE LA INVENCION

Los inventores han desarrollado por primera vez un medio útil para suministrar polinucleótidos, por ejemplo polinucleótidos terapéuticos a las células de Schwann del sistema nervioso periférico (SNP) y dirigir la expresión de dichos polinucleótidos específicamente en células de Schwann. La presente invención puede aplicarse al tratamiento de enfermedades asociadas con las células de Schwann y se considera particularmente beneficiosa cuando se aplica al tratamiento de neuropatías desmielinizantes como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT). Sin embargo, se considera que el mecanismo subyacente de la invención es aplicable a muchas otras enfermedades que afectan a las células de Schwann y también se considera que tiene utilidad general en cualquier situación donde se considere ventajoso el suministro de un polinucleótido a una célula de Schwann, por ejemplo en imagenología de las células de Schwann.

Una característica de un aspecto de la presente invención es el uso de un vector AAV para lograr la transcripción de un primer ácido nucleico que da como resultado la producción del primer polinucleótido de interés específicamente en las células de Schwann del SNP. En algunas modalidades, esta expresión específica de tipo celular se logra mediante el uso de un promotor específico de mielina, y en algunas modalidades esto se logra mediante el uso de una versión mínima de un promotor específico de mielina.

Otra característica de la presente invención es la provisión de un promotor mínimo específico de mielina, que en algunas modalidades se basa en la secuencia del promotor de la proteína cero de mielina de longitud completa (Mpz). En algunas modalidades, los vectores virales que comprenden un promotor mínimo más corto

permiten que secuencias de ácidos nucleicos más grandes, por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos terapéuticos, se incluyan en el vector y se suministren a las células de Schwann. Se considera que esto tiene la propiedad ventajosa de proporcionar un vector universal para el suministro de ácidos nucleicos a las células de Schwann y puede usarse para tratar una amplia gama de enfermedades, ya que los enfoques actuales están limitados, por ejemplo, en los genes que pueden expresarse a partir del vector viral debido a su tamaño.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención está definida por las reivindicaciones.

La invención generalmente proporciona un vector viral como se describe en la presente descripción para el uso en medicina y también proporciona un método de tratamiento que comprende administrar un vector de acuerdo con la invención, por ejemplo, administrar por cualquiera de los medios descritos en la presente descripción.

Un primer aspecto de la invención proporciona un vector viral para el uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con las células de Schwann. En algunas modalidades, el vector viral comprende una primera secuencia de ácido nucleico que puede transcribirse en un primer polinucleótido.

El vector viral puede ser cualquier vector viral.

Los vectores virales se conocen bien en la técnica y los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: vectores virales adenoasociados (vectores AAV); vectores lentivirales (por ejemplo, los derivados del virus de inmunodeficiencia humana (VIH)); vectores retrovirales (por ejemplo, MMLV).

En algunas modalidades, el vector viral es un vector viral adenoasociado (vector AAV). En una modalidad preferida, la invención proporciona un vector AAV para el uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con las células de Schwann, en donde el vector AAV comprende una primera secuencia de ácido nucleico que puede transcribirse en un primer polinucleótido.

Se prefiere si la primera secuencia de ácido nucleico se transcribe, por ejemplo, se transcribe en una célula diana o en un organismo diana. En consecuencia, una modalidad adicional proporciona un vector viral para el uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con la célula de Schwann en donde el vector viral comprende una primera secuencia de ácido nucleico que se transcribe en un primer polinucleótido.

Una modalidad adicional proporciona un AAV para el uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con las células de Schwann en donde el vector viral comprende una primera secuencia de ácido nucleico que se transcribe en un primer polinucleótido.

La primera secuencia de ácido nucleico puede transcribirse en un primer polinucleótido en una célula diana o en un organismo diana, por ejemplo, se transcribe en una célula de Schwann. La célula de Schwann puede estar *in vivo*, por ejemplo, puede estar en un organismo mamífero, que por ejemplo puede ser un ser humano, gato, perro, ratón, conejo, caballo, por ejemplo.

Las células de Schwann son células gliales del sistema nervioso periférico (SNP) que envuelven los axones de las neuronas sensoriales y motoras y producen la vaina de mielina circundante. La vaina de mielina está formada por varios componentes proteicos (por ejemplo, proteína cero de mielina) y es un componente aislante esencial de las neuronas que permite la conducción rápida de los impulsos nerviosos (potenciales de acción) a lo largo de los nervios.

Algunas estrategias terapéuticas actuales basadas en vectores virales usan vectores que tienen características indeseables. Por ejemplo, algunos vectores virales se integran en el genoma del huésped con claras consecuencias potenciales deletéreas. En consecuencia, en una modalidad, el vector viral no es un vector viral que se integre en el genoma de la célula huésped, por ejemplo, no se integrará en el ácido nucleico de una célula de Schwann. Los vectores virales que no se considera que se integren en el genoma del huésped, en algunas modalidades, son particularmente preferidos e incluyen AAV y vectores adenovirales. Los vectores de AAV infectan las células diana y el material genético suministrado no se integra en el genoma de la célula huésped. En cambio, el material genético suministrado permanece episomal.

Los vectores virales que se considera que se integran en el genoma del huésped incluyen los vectores retrovirales, por ejemplo, los vectores lentivirales. Por consiguiente, en una modalidad, el vector viral no es un vector que se integre en el genoma del huésped, por ejemplo, no es un vector retroviral, por ejemplo, no es un vector lentiviral.

Algunos vectores tampoco pueden transducir las células de Schwann. El experto en la técnica comprenderá los tipos de vectores que pueden y no pueden transducir células de Schwann. En consecuencia, en una modalidad, el vector viral de la invención no es un vector viral que sea incapaz de transducir células de Schwann. En

algunas modalidades, el vector viral tiene la capacidad de transducir células de Schwann. Por "transducir" queremos decir que el vector viral es capaz de infectar las células diana y suministrar la construcción polinucleotídica que se encuentra dentro de ella en la célula diana. Los ejemplos de dichos vectores incluyen AAV y vectores lentivirales.

En una modalidad, el vector es un vector en el que solo puede incorporarse un inserto de tamaño limitado antes de volverse inestable. Por ejemplo, dichos vectores incluyen vectores AAV.

Preferentemente, el vector viral es un vector AAV y, en algunas modalidades, el vector AAV se selecciona del grupo que comprende o consiste en: AAV9 y AAVrh10. En una modalidad particularmente preferida, el AAV es un AAV9.

Se prefiere que la transcripción del primer ácido nucleico solo se produzca, o solo se produzca sustancialmente en células de Schwann. En consecuencia, en algunas modalidades, el vector viral también contiene un promotor específico de las células de Schwann unido operativamente al primer ácido nucleico.

Por "promotor específico de las células de Schwann" incluimos el significado de un promotor que da como resultado una expresión significativa en las células de Schwann y una expresión nula o baja en las células distintas de las células de Schwann. Por ejemplo, un promotor específico de las células de Schwann puede conducir a niveles altos de transcripción del primer ácido nucleico en las células de Schwann (por ejemplo, el 95 % o más de la expresión total se produce en las células de Schwann) mientras que la expresión del primer polinucleótido es baja en otros tipos de células, por ejemplo las del sistema nervioso central (por ejemplo, menos del 5 % de la expresión total se produce en células distintas de las células de Schwann). Por ejemplo, en una modalidad, la relación de transcripción en células de Schwann a células distintas de las células de Schwann es al menos 100:0; 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30; 65:35; 60:40; o 55:45.

En una modalidad, el nivel de transcripción en una célula de Schwann es de al menos 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000, 7500, 10 000 veces mayor que en cualquier otra célula distinta de las células de Schwann.

En una modalidad, un promotor específico de las células de Schwann da como resultado que la mayor parte de la expresión se produzca en células de Schwann en lugar de en células distintas de las células de Schwann.

El experto en la técnica comprenderá que incluso promotores muy específicos pueden dar como resultado alguna expresión en otras células o tejidos. El experto en la técnica conoce bien el nivel de expresión diferencial entre una célula o tejido diana y una célula o tejido no diana que se requiere para clasificar un promotor como específico de célula o tejido, por ejemplo, específico de célula de Schwann. Por ejemplo, (66) y (67) demuestran la identificación de promotores específicos de células en el sistema nervioso central (SNC). El experto en la técnica conocerá que para que un promotor sea específico de célula, debe contener elementos reguladores que activen el promotor solo en ciertos tipos de células (por ejemplo, sitios de unión para factores de transcripción) y el promotor debe ser capaz de conducir a la expresión demostrable del gen indicador u otros genes *in vitro* e *in vivo*.

Preferentemente, el promotor específico de las células de Schwann da como resultado la transcripción del primer ácido nucleico a un nivel detectable solo en las células de Schwann. El experto en la técnica conoce bien los métodos de rutina para detectar la transcripción, por ejemplo, transferencia Northern, técnicas basadas en PCR y marcaje por inmunofluorescencia. En una modalidad, el promotor específico de las células de Schwann da como resultado la transcripción detectable del primer ácido nucleico en las células de Schwann pero no da como resultado niveles detectables de transcripción del primer ácido nucleico en células distintas de las células de Schwann, por ejemplo, en otras células del sistema nervioso periférico o cerebro cuando la detección se realiza mediante un análisis de transferencia Northern. En otra modalidad, el promotor específico de las células de Schwann da como resultado la transcripción detectable del primer ácido nucleico en las células de Schwann pero no da como resultado niveles detectables de transcripción del primer ácido nucleico en células distintas de las células de Schwann, por ejemplo, en otras células del sistema nervioso periférico o cerebro cuando la detección se realiza mediante el uso de un análisis de marcaje por inmunofluorescencia con marcadores celulares.

Por ejemplo (32) y (33) demuestran que la expresión específica de las células de Schwann puede lograrse tanto *in vitro* como *in vivo* mediante el uso de construcciones conducidas por el promotor de Mpz de longitud completa mediante el uso de vectores lentivirales.

Los promotores específicos de las células de Schwann incluyen, en algunas modalidades, promotores específicos de mielina. Por "promotor específico de mielina" nos referimos a un promotor que típicamente conduce a la expresión de genes que codifican proteínas que forman la vaina de mielina. Los ejemplos de promotores

específicos de mielina incluyen, pero no se limitan a: el promotor de la proteína cero de mielina (Mpz); el promotor de la proteína 22 de mielina periférica (PMP22); promotor de glicoproteína (Mag) asociada con mielina.

En algunas modalidades, la expresión del primer polinucleótido está bajo el control de un promotor de la proteína cero de mielina de longitud completa (Mpz), tal como el promotor de la proteína cero de mielina de rata de longitud completa (Mpz), cuya secuencia se define en la SEQ. ID NO. 4. En algunas modalidades, la secuencia del promotor de Mpz tiene una secuencia con al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 4, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 4.

En algunas modalidades, será evidente para el experto en la técnica que se prefiere que la secuencia promotora se derive de una secuencia promotora humana o humanizada. En algunas modalidades, la expresión del primer polinucleótido está bajo el control del promotor de la proteína cero de mielina humana de longitud completa (hP0), cuya secuencia se define en la SEQ ID NO. 18. En algunas modalidades, la secuencia del promotor hP0 tiene una secuencia con al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 18, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 18.

Como se discutió anteriormente, se considera ventajoso si el promotor es lo más corto posible, en particular cuando el vector es un vector que solo puede manejar un tamaño de inserto limitado antes de volverse inestable. Por lo tanto, en algunas modalidades, la expresión del primer polinucleótido está bajo el control de un promotor que tiene una longitud de entre 100 pb y 1100 pb, en donde opcionalmente el promotor varía de 200 pb a 900 pb de longitud, de 300 pb a 800 pb de longitud, de 400 pb a 700 pb de longitud, en donde opcionalmente el promotor tiene una longitud de entre 500 pb y 600 pb, por ejemplo, tiene una longitud de 410 pb. En la misma o en otras modalidades, el promotor tiene menos de 1100 pb de longitud, por ejemplo, menos de 1000 pb, 900 pb, 800 pb, 700 pb, 600 pb, 500 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb o menos de 100 pb de longitud.

En algunas modalidades, el promotor es un promotor de Mpz de origen natural de una longitud como se define en la presente descripción. En una modalidad

alternativa, el promotor es un promotor de Mpz modificado genéticamente de una longitud como se define en la presente descripción. Por "promotor de origen natural" nos referimos a un promotor que no se ha modificado, acortado o alargado en comparación con la secuencia del promotor correspondiente que se encuentra en las células de Schwann de tipo salvaje. Por "promotor modificado genéticamente", nos referimos a un promotor de tipo salvaje que ha sido alterado de alguna manera. Por ejemplo, la secuencia puede haber sido modificada para tener, por ejemplo, al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la secuencia promotora de origen natural, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia promotora de origen natural. En otra o la misma modalidad, el promotor también puede haber sido modificado en longitud, por ejemplo, la longitud del promotor de tipo salvaje puede haberse reducido de una secuencia más larga a, por ejemplo, entre 100 pb y 1100 pb de longitud, opcionalmente de 200 pb a 900 pb de longitud, de 300 pb a 800 pb de longitud, de 400 pb a 700 pb de longitud, opcionalmente entre 500 pb y 600 pb de longitud, por ejemplo, tiene 410 pb de longitud, o tiene menos de 1100 pb de longitud, por ejemplo, tiene menos de 1000 pb, 900 pb, 800 pb, 700 pb, 600 pb, 500 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb o menos de 100 pb de longitud.

En otra modalidad, la longitud del promotor puede aumentarse en relación con un promotor de tipo salvaje.

El experto en la técnica comprenderá que es posible que solo se requieran realmente porciones de una región de ácido nucleico particular considerada promotora para la actividad promotora. En otro ejemplo, el promotor modificado genéticamente incluye parte de la secuencia del promotor de tipo salvaje, o incluye la secuencia completa del promotor de tipo salvaje como parte de una secuencia de promotor más larga. Como se discutió, preferentemente el promotor es específicamente activo en células de Schwann. El experto en la técnica podrá analizar si un fragmento particular de un promotor de longitud completa da como resultado la expresión específica de las células de Schwann de una proteína bajo el control de dicho fragmento de promotor, por ejemplo, mediante el cribado de la expresión de un gen indicador en las células de Schwann. En algunos ejemplos, el gen indicador es EGFP.

En otra modalidad, el promotor modificado genéticamente es una versión truncada del promotor de tipo salvaje y puede tener, por ejemplo, al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la secuencia del promotor de

origen natural, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia del promotor de origen natural.

Además de ser una versión truncada de un promotor nativo, el promotor modificado genéticamente puede comprender adicional o alternativamente mutaciones, sustituciones, deleciones e inserciones relativas a las secuencias del promotor nativo. Por ejemplo, un promotor modificado genéticamente puede comprender varias regiones diferentes del promotor nativo en una secuencia consecutiva.

Un promotor modificado genéticamente que tiene una longitud más corta que el promotor nativo o de tipo salvaje correspondiente puede denominarse promotor mínimo.

En algunas modalidades, un promotor modificado genéticamente conserva la misma función que el promotor de origen natural correspondiente del que se deriva, es decir, todavía puede conducir eficazmente la transcripción de secuencias de polinucleótidos a partir de secuencias de ácido nucleico a las que el promotor está unido operativamente y, en casos preferidos, puede dirigir eficazmente la transcripción de una manera específica de la célula, es decir, de una manera específica de la célula de Schwann.

En algunas modalidades, la expresión del primer polinucleótido puede estar bajo el control de, por ejemplo, un promotor específico de mielina de origen natural acortado, que se denomina en la presente descripción un promotor mínimo específico de mielina, opcionalmente este es un promotor mínimo de la proteína cero de mielina (Mpz). En algunas modalidades, la secuencia del promotor mínimo específico de mielina comprende o consiste en la secuencia de 410 pb como se define en la SEQ ID NO. 5, que se deriva de la secuencia promotora de Mpz de rata de longitud completa. En algunas modalidades, el promotor mínimo específico de mielina comprende o consiste en una secuencia con al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 5, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 5.

En algunas modalidades, se prefiere que el promotor mínimo se derive de una secuencia promotora humana o humanizada. En algunas modalidades, la secuencia del promotor mínimo específico de mielina comprende o consiste en la secuencia de 429 pb como se define en la SEQ ID NO. 22, que se deriva de la secuencia promotora

de hP0 humana de longitud completa. En algunas modalidades, el promotor mínimo específico de mielina comprende o consiste en una secuencia con al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 22, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 22. Los promotores mínimos específicos de mielina derivados de Mpz de rata o hP0 humana se denominan en la presente descripción miniMpz.

Por "identidad de secuencia" u "homología de secuencia" nos referimos a la secuencia idéntica de pares de bases en la región de ADN específica. Por ejemplo, en una secuencia que tiene 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con una secuencia de referencia, el 75 % de los pares de bases son idénticos.

El por ciento de identidad de secuencia entre dos polipéptidos puede determinarse mediante el uso de los programas informáticos adecuados, por ejemplo, el programa GAP del Grupo de computación genética de la Universidad de Wisconsin, y se apreciará que el por ciento de identidad se calcula en relación con los polipéptidos cuyas secuencias se han alineado de manera óptima.

La alineación puede llevarse a cabo alternativamente mediante el uso del programa Clustal W (Thompson y otros, (1994) *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-80). Los parámetros usados pueden ser los siguientes:

Parámetros de alineación por pares rápida: tamaño de K-tuple (palabra); 1, tamaño de la ventana; 5, penalización de espacio; 3, número de diagonales superiores; 5. Método de puntuación: x por ciento.

Parámetros de alineación múltiple: penalización de apertura de espacio; 10, penalización de extensión de espacio; 0.05.

Matriz de puntuación: BLOSUM.

En una modalidad, el promotor mínimo de Mpz descrito en la presente descripción puede producirse como se describe en el Ejemplo 9, por ejemplo, tras tomar la región de 410 pares de bases aguas arriba del codón de inicio del promotor de longitud completa, por ejemplo, el promotor de la proteína cero de mielina de longitud completa (Mpz). En otra modalidad, puede producirse un promotor mínimo de Mpz descrito en la presente descripción como se describe en el Ejemplo 13. Los vectores AAV tienen una capacidad máxima para transportar polinucleótidos de aproximadamente 4.4 kb, por lo tanto, el uso de un promotor de Mpz más corto como se describe en la presente descripción, en lugar del promotor de Mpz de longitud

completa que tiene aproximadamente 1.1 kb de longitud, tiene la ventaja de permitir secuencias con un primer ácido nucleico más largo que se unirán operativamente a la región promotora para empaquetarse en el AAV. En algunas modalidades donde el promotor es un promotor más corto, por ejemplo con una longitud de entre 100 pb y 1100 pb de longitud, 200 pb a 900 pb, 300 pb a 800 pb, 400 pb a 700 pb, 500 pb a 600 pb, o 410 pb de longitud, o con un longitud de menos de 1100 pb de longitud, por ejemplo es menor de 1000 pb, 900 pb, 800 pb, 700 pb, 600 pb, 500 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb o menos de 100 pb, por ejemplo, un promotor modificado genéticamente o un promotor mínimo, esto permite que la presente invención se aplique a una gama más amplia de genes de mayor longitud que los vectores AAV que usan el promotor de longitud completa. Por ejemplo, actualmente existen algunas situaciones donde no es posible insertar una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, un gen, de una longitud particular en un AAV, ya que la longitud del ácido nucleico puede exceder la capacidad máxima del AAV cuando se usan promotores más largos, por ejemplo, el promotor de Mpz de longitud completa. Por ejemplo, si el primer ácido nucleico, por ejemplo el gen terapéutico, tiene una longitud superior a 3.0-3.3 kb ($4.4 \text{ kb} - 1.1 \text{ kb} = 3.3 \text{ kb}$). En este caso, el uso de los promotores más cortos ventajosos descritos en la presente descripción, por ejemplo, el promotor mínimo específico de mielina, permite que la presente invención se aplique, por ejemplo, a la sustitución de genes más grandes, como el gen SH3TC2 que causa CMT tipo 4C (CMT4C), que tiene aproximadamente 3.9 kb de longitud. Otros genes relacionados con las células de Schwann que pueden estar cerca del límite de estabilidad del AAV y, por lo tanto, se suministrarán de manera óptima bajo un promotor mínimo de Mpz, incluyen EGR2 (2.98 kb) que está asociado con CMT4E y FGD4 (2.3 kb) que está asociado con CMT4H.

En otras modalidades adicionales, los vectores descritos en la presente descripción pueden modificarse en el segmento de repetición terminal invertido para reducir aún más su tamaño. Por ejemplo, el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE), como se describe en el Ejemplo 1, puede eliminarse y/o la secuencia de poliA puede reemplazarse con un poliA sintético mínimo (68, 69). Dichas modificaciones pueden reducir aún más el tamaño del vector para permitir que se reenvíe dentro de la capacidad máxima del AAV y para permitir un empaquetamiento eficiente al suministrar genes más grandes. En otras modalidades adicionales, el tamaño del vector puede reducirse aún más, por ejemplo, mediante el uso también de versiones mínimas del gen que codifica la proteína que se va a

suministrar, en donde la versión mínima del gen que codifica la proteína todavía es capaz de producir una proteína funcional.

En algunas modalidades, el vector viral descrito en la presente descripción puede producirse como se describe en el Ejemplo 12. En algunas modalidades, el vector viral tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 20, que tiene el WPRE eliminado y tiene una secuencia poliA sintética. En algunas modalidades, la secuencia poliA sintética comprende o consiste en una secuencia mínima requerida para la poliadenilación eficaz de construcciones de ARNm (68, 69). En algunas modalidades, la secuencia de poliA sintética comprende o consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 24, que está incluida en las secuencias de las SEQ ID NO: 20 y 21. En otras modalidades, la secuencia sintética de poliA tiene al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 24.

En algunas modalidades, el vector viral también contiene sitios de unión para factores de transcripción Egr2 y Sox10. Por ejemplo, el vector viral también puede contener elementos potenciadores a los que se pueden unir factores de transcripción tales como Egr2 y Sox10.

En algunas modalidades, el primer ácido nucleico del vector viral se transcribe en un primer polinucleótido que en algunas modalidades codifica y se traduce en un primer polipéptido o proteína. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico es el marco de lectura abierto (ORF) de una secuencia génica o el ADNc correspondiente a una secuencia génica. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico es el ORF o el ADNc de una secuencia génica de tipo salvaje o beneficiosa terapéuticamente. En una modalidad preferida, el primer ácido nucleico es el ORF o ADNc de una secuencia de tipo salvaje o beneficiosa terapéuticamente de un gen asociado con neuropatía, en donde opcionalmente la neuropatía es una neuropatía desmielinizante.

Por "tipo salvaje o forma beneficiosa terapéuticamente" incluimos cualquier forma de la secuencia génica que codifique un polipéptido o proteína que pueda usarse para tratar eficazmente la enfermedad asociada con las células de Schwann. El experto en la técnica entendería que esta sería típicamente la forma de tipo salvaje de la proteína (es decir, la que es de origen natural en las células de Schwann) en situaciones donde la enfermedad surge a través de la subproducción de la forma de tipo salvaje del polipéptido por las células de Schwann, pero puede también incluir formas de la proteína que tienen mutaciones o inserciones o están truncadas en comparación con la secuencia de tipo salvaje para proporcionar una ventaja

terapéutica, por ejemplo, aumento de los niveles de expresión, resistencia a la degradación, aumento de la estabilidad, aumento de la actividad o una ganancia de función ventajosa, o para suprimir una ganancia de función tóxica. Por ejemplo, en el último caso, el polipéptido puede ser un anticuerpo capaz de unirse a la ganancia tóxica de la función mutante y suprimir la toxicidad.

El experto en la técnica conocerá que la expresión de proteínas se lleva a cabo de forma rutinaria tras introducir el ORF del gen relevante o el ADNc en el vector viral. En una modalidad, el primer ácido nucleico es una secuencia de ADNc que cuando se transcribe produce un primer polinucleótido que se traduce en un primer polipéptido o proteína. Por ejemplo, el ADNc puede ser una secuencia de ADNc que se transcribe en ARNm de GJB1 que posteriormente se traduce en proteína Cx32.

El experto en la técnica comprenderá que el uso de secuencias ORF en lugar de secuencias de ADNc puede ser preferible en algunos casos, ya que la secuencia ORF carece de elementos no codificantes adicionales que se encuentran en el ADNc y es de tamaño más pequeño, lo cual es particularmente ventajoso en la presente invención cuando el vector viral es un vector que se vuelve inestable cuando el tamaño aumenta por encima de un umbral particular.

En algunas modalidades adicionales, la primera secuencia de ácido nucleico como se describe en la presente descripción también contiene opcionalmente otros elementos reguladores además del ADNc u ORF del gen. Estos elementos adicionales pueden estar aguas abajo del ORF.

Como se discutió anteriormente, la invención tiene utilidad en la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con las células de Schwann. Por "enfermedad asociada con las células de Schwann" incluimos el significado de todas las enfermedades que están asociadas con el funcionamiento anormal de las células de Schwann. Esto incluye enfermedades asociadas con la destrucción de la vaina de mielina formada por las células de Schwann y/o enfermedades asociadas con la expresión reducida de la vaina de mielina formada por las células de Schwann. En algunas modalidades, las enfermedades asociadas con las células de Schwann son neuropatías desmielinizantes. Los ejemplos de neuropatías desmielinizantes incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT).

Una "enfermedad asociada con las células de Schwann" también incluye en su significado enfermedades que están asociadas con las células de Schwann, pero que también están asociadas con otros tipos de células o tejidos, por ejemplo. Se considera que la invención es útil en dichas situaciones ya que una mejora en la

función de las células de Schwann puede aliviar algunos síntomas, incluso si la invención no se dirige a ningún otro tipo de células que estén asociadas con la enfermedad.

Por lo tanto, en una modalidad, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse en el tratamiento o la prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT); neuropatía hereditaria con riesgo de parálisis por presión (HNPP); neuropatías periféricas diabéticas y otras tóxicas; enfermedad de la neurona motora (MND).

En algunas modalidades específicas, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse en el tratamiento o la prevención de Charcot-Marie-Tooth tipo 1X (CMT1X); Charcot-Marie-Tooth tipos 1A-1F (es decir, CMT1A, CMT1B, CMT1C, CMT1D, CMT1E y CMT1F); Charcot-Marie-Tooth tipos 4A-4H (es decir, CMT4A, CMT4B, CMT4C, CMT4D, CMT4E, CMT4F, CMT4G y CMT4H). En una modalidad más específica, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar o evitar la Charcot-Marie-Tooth tipo 1X. En una modalidad alternativa más específica, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar o prevenir la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4C.

La enfermedad de Charcot-Marie Tooth (CMT) es un grupo de neuropatías desmielinizantes causadas por mutaciones en numerosos genes diferentes que dan como resultado fenotipos solapados. La neuropatía de Charcot-Marie-Tooth tipo 1X (CMT1X) es la segunda forma de CMT más común (4, 5) y se presenta con síntomas característicos de CMT1, que incluyen debilidad progresiva y atrofia que comienza en los músculos distales de las piernas, dificultad para correr y esguinces frecuentes de tobillos, con aparición a los 10 años de edad o antes en la mayoría de los varones afectados (6-8). La enfermedad progresa lentamente y causa debilidad de los músculos de las piernas delanteras, pie caído, deformidades del pie, debilidad de los músculos de la mano y pérdida sensorial distal con parestesias a veces dolorosas al final de la adolescencia o al principio de la edad adulta y progresión lenta a lo largo de la vida. Las mujeres heterocigotas con CMT1X pueden ser asintomáticas o desarrollar manifestaciones clínicas más leves a una edad más avanzada, pero se ha informado de neuropatía grave excepcionalmente (9, 10). Las manifestaciones transitorias del SNC pueden producirse en algunos pacientes CMT1X, en su mayoría más jóvenes (11). La desaceleración intermedia (30-40 m/s) de las velocidades de conducción nerviosa motora (MNCV) y la pérdida progresiva de unidades motoras debido a la degeneración axonal dependiente de la longitud son características electrofisiológicas

típicas (6, 7). Las biopsias de nervios muestran anomalías axonales y desmielinizantes mixtas (12, 13) con vainas de mielina delgadas y pérdida de fibras mielinizadas grandes reemplazadas por agrupaciones de axones en regeneración (6, 14).

Cx32 es una proteína transmembrana que forma canales de unión gap (GJ) a través de las capas de mielina no compacta expresadas específicamente por células de Schwann mielinizantes en el sistema nervioso periférico (SNP), así como también por un subconjunto de oligodendrocitos en el SNC. Los canales GJ formados por Cx32 cumplen importantes funciones homeostáticas y de señalización que son esenciales para la función y supervivencia de la mielina y los axones (4, 5). El gen correspondiente que codifica Cx32 es GJB1.

Hasta la fecha, se han informado más de 400 mutaciones de GJB1 que se producen en todo el marco de lectura abierto (ORF) y muchas en más de una familia, que incluyen: 498 sin sentido (71 %); 3 de pérdida de la terminación; 49 INDEL en marco (7 %); 25 de ganancia de la terminación (4 %); y 122 INDEL de cambio de marco (17 %) (http://hihg.med.miami.edu/code/http/cmt/public_html/index.html#). También se han informado varias mutaciones en regiones no codificantes de GJB1. Es probable que las mutaciones de cambio de marco, parada prematura y no codificantes causen una pérdida completa de la síntesis de proteínas o una degradación rápida, y no se espera que den como resultado efectos negativos dominantes. Varias mutaciones sin sentido y en marco expresadas *in vitro* mostraron retención intracelular (15-17) en el RE y/o Golgi (17-21) con falla para formar canales funcionales. Algunos también ejercieron efectos dominantes-negativos en Cx32 WT expresados conjuntamente (15). Otros mutantes formaron canales funcionales con características biofísicas alteradas (19). Los ratones con Cx32 inactivada (KO) con delección completa del gen *Gjb1/Cx32* desarrollan una neuropatía periférica desmielinizante predominantemente motora, progresiva que comienza aproximadamente a los tres meses de edad con la MNCV del ciático y la amplitud motora reducidas (24, 25). La expresión de la proteína Cx32 humana WT conducida por el promotor de *Mpz/P0* de rata evitó la desmielinización en ratones Cx32 KO (26), lo que confirma que la pérdida de la expresión autónoma de Cx32 en las células de Schwann es suficiente para causar patología CMT1X.

Por tanto, varios *estudios in vitro* e *in vivo* de mutantes CMT1X apoyan la conclusión general de que la pérdida de la función de Cx32 conduce principalmente a la neuropatía en la CMT1X (8, 17-19, 21-23). En consecuencia, en una modalidad, la terapia de reemplazo génico que usa el vector viral y los métodos terapéuticos como

se describen en la presente descripción se usan para tratar o evitar la CMT1X, por ejemplo cuando el vector viral comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína Cx32 de tipo salvaje o beneficiosa terapéuticamente.

Los ratones transgénicos con mutaciones que causan CMT1X sobre un fondo KO no mostraron la proteína Cx32 detectable en la línea mutante 175fs (27), mientras que los ratones transgénicos R142W, T55I, R75W y N175D mostraron retención de la proteína mutante en la región perinuclear, similar al patrón in vitro (arriba) y desarrollaron una neuropatía desmielinizante similar a la de los ratones Cx32 KO (22, 28, 29). En presencia de los mutantes R142W, R75W y N175D retenidos en Golgi (pero no del mutante T55I retenido en el ER), se redujo la expresión del ratón Cx32 WT endógeno, lo que indica que los mutantes retenidos por Golgi pueden tener efectos negativos dominantes en Cx32 WT. Esto no es clínicamente relevante para los pacientes con CMT1X que expresan solo un alelo GJB1 en cada célula, pero debe tenerse en cuenta al planificar una terapia de adición de genes. Ninguno de los mutantes expresados in vivo tuvo otros efectos tóxicos o dominantes sobre otras conexinas expresadas conjuntamente (22, 28). Los mutantes en el extremo C C280G y S281X se localizaron adecuadamente y evitaron la desmielinización en ratones Cx32 KO, sin quedar claro cómo causan neuropatía en humanos (30).

En consecuencia, la CMT1X también puede estar causado por mutaciones negativas dominantes en la proteína Cx32. En este caso, el experto en la técnica comprenderá que es beneficioso si el vector viral de la invención comprende un primer ácido nucleico que se transcribe en un ARN no codificante que se dirige hacia el ARNm de Cx32 mutante para evitar la traducción de la proteína mutante. El experto en la técnica comprenderá cómo llegar a secuencias de ácido nucleico adecuadas que, por ejemplo, se dirijan al ARNm de Cx32 mutante pero no a un ARNm de Cx32 de tipo salvaje o ventajoso terapéuticamente. De esta manera, en una modalidad, el sujeto puede tratarse con un vector viral que comprende un primer ácido nucleico que se transcribe en un ARN no codificante que se dirige al Cx32 mutante, y el sujeto también puede tratarse con un segundo vector viral de acuerdo con la invención, en donde el segundo vector viral comprende un segundo ácido nucleico que codifica la proteína Cx32 de tipo salvaje o ventajosa terapéuticamente. En algunas modalidades, el primer y segundo ácido nucleico pueden estar en el mismo vector viral de acuerdo con la invención. Puede adoptarse un enfoque similar en el tratamiento o la prevención de cualquier enfermedad asociada con las células de Schwann como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, el primer ácido nucleico puede ser el ORF o el ADNc de una secuencia génica de tipo salvaje de un gen asociado con neuropatía. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico puede ser el ADNc de una secuencia de tipo salvaje del gen de unión en hendidura beta 1 (GJB1), que se considera que tiene una secuencia como se define en la SEQ ID NO. 6. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico tiene al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 6, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO.6. En otras modalidades, el primer ácido nucleico tiene al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la secuencia ORF de GJB1, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia ORF de GJB1.

La CMT1X es causada por mutaciones en el gen GJB1, que causan una expresión insuficiente de la proteína Cx32 funcional de tipo salvaje. De ello se deduce que, en algunas modalidades, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse en el tratamiento o la prevención de la CMT1X mediante el suministro de una copia de tipo salvaje u otra copia beneficiosa terapéuticamente del marco de lectura abierto o ADNc del gen GJB1.

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4C (CMT4C) es una neuropatía hereditaria autosómica recesiva que parece ser la más prevalente entre las formas raras de neuropatías CMT4 desmielinizantes recesivas generales, y es responsable de casi la mitad de todos los casos de CMT4 (35). Los pacientes con CMT4C habitualmente presentan en la primera década de la vida deformidades del pie y escoliosis, debilidad, arreflexia y pérdida sensorial (36-38). La afectación de pares craneales con deficiencia auditiva, reflejos pupilares lentos a la luz y fasciculación lingual son comunes y se han descrito variaciones fenotípicas en pacientes con mutaciones idénticas (39-41). Los estudios electrofisiológicos en pacientes con CMT4C confirman el proceso desmielinizante con una velocidad de conducción nerviosa motora media (NCV) media de 22.6 m/s. Los hallazgos de la biopsia nerviosa se caracterizan por un aumento de las membranas basales alrededor de los axones mielinizados, desmielinizados y amielínicos, relativamente pocos bulbos de cebolla y, más típicamente, grandes extensiones citoplasmáticas de las células de Schwann (36, 37, 42).

Genética molecular de la CMT4C: Los estudios de análisis de ligamiento y el mapeo de homocigosis (43) llevaron al descubrimiento del locus de la enfermedad en el cromosoma 5q32 y, posteriormente, al descubrimiento inicial de 11 mutaciones diferentes en el gen SH3TC2, en su mayoría truncadas pero también sin sentido (42). Hasta la fecha se han descrito al menos 28 mutaciones diferentes de SH3TC2, y pueden ser más comunes entre ciertos grupos étnicos (44) con probables efectos fundadores (39). La longitud del transcrito completo de ADNc mide 3864 pb. SH3TC2 codifica una proteína de 1288 aa que contiene dos dominios de homología de Src 3 (SH3) y 10 repeticiones tetratricopeptídicas (TPR) que no comparten ninguna similitud significativa global con ninguna otra proteína humana con función conocida. La presencia de dominios SH3 y TPR sugiere que SH3TC2 podría actuar como una proteína de andamio (42). SH3TC2 está bien conservado entre las especies de vertebrados, mientras que no se identificaron ortólogos no vertebrados. SH3TC2 está presente en varios componentes de la vía endocítica, que incluye los endosomas tempranos y tardíos y las vesículas recubiertas de clatrina cerca de la red trans-Golgi y en la membrana plasmática. Esta localización está alterada en la CMT4C (45).

El modelo de ratón *Sh3tc2* ^{-/-} KO de la CMT4C desarrolla una neuropatía periférica de aparición temprana pero progresiva con enlentecimiento de las velocidades de conducción nerviosa motora y sensorial e hipomielinización de aparición temprana (46, 47). Este fenotipo es progresivo con aumento de la patología de la mielina a los 2 y 12 meses de edad. La *Sh3tc2* murina se expresa específicamente en las células de Schwann y se localiza en la membrana plasmática y en el compartimento de reciclaje endocítico perinuclear, lo que sugiere una posible función en la mielinización y/o en regiones de interacciones axogliales (48). El análisis ultraestructural de la mielina en el nervio periférico de ratones mutantes mostró una organización anormal del nodo de Ranvier, un fenotipo que se confirmó en biopsias nerviosas de pacientes con CMT4C. Estos hallazgos sugirieron un papel del producto del gen SH3TC2 en la mielinización y en la integridad del nodo de Ranvier (46). Por lo tanto, el ratón *Sh3tc2* ^{-/-} recapitula todas las características principales de la enfermedad CMT4C y proporciona un modelo relevante para analizar tratamientos.

Por lo tanto, en algunas modalidades, el primer ácido nucleico puede ser el ORF o el ADNc de la secuencia de tipo salvaje del gen del dominio SH3 y el gen de repeticiones tetratricopeptídicas 2 (SH3TC2). Se considera que el ORF de SH3TC2 tiene una secuencia como se define en la SEQ ID NO. 7. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico tiene al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de

secuencia con la SEQ ID NO. 7, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 7. En otras modalidades, el primer ácido nucleico tiene al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la secuencia de ADNc de SH3TC2, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia de ADNc de SH3TC2.

Como se discutió anteriormente, la CMT4C es causada por mutaciones en el gen SH3TC2, lo que causa una expresión insuficiente de la proteína SH3TC2 funcional de tipo salvaje. De ello se deduce que, en algunas modalidades, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse en el tratamiento o la prevención de CMT4C mediante el suministro de una copia de tipo salvaje u otra copia beneficiosa terapéuticamente del marco de lectura abierto o ADNc de SH3TC2, para, por ejemplo, aumentar la expresión del SH3TC2 de tipo salvaje.

En otra modalidad, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse en métodos de tratamiento o la prevención de otros tipos de CMT desmielinizante autosómica dominante.

La CMT1B es causada por mutaciones en el gen de la proteína cero de mielina (Mpz), lo que causa una expresión insuficiente de la proteína Mpz funcional de tipo salvaje.

Por tanto, en algunas modalidades, el primer ácido nucleico puede ser el ORF o el ADNc de la secuencia de tipo salvaje del gen de la proteína cero de mielina (MPZ). Se considera que el ORF de MPZ tiene una secuencia como se define en la SEQ ID NO. 9. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico tiene al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 9, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 9. En otras modalidades, el primer ácido nucleico tiene al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la secuencia de ADNc de MPZ, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia de ADNc de MPZ.

Se deduce que, en algunas modalidades, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse en el tratamiento o la prevención de CMT1B

mediante el suministro de ARN no codificantes, como se describe en la presente descripción, tras dirigir y anular los alelos mutantes tóxicos del gen MPZ además de suministrar una copia de tipo salvaje u otra copia beneficiosa terapéuticamente del marco de lectura abierto o ADNc del gen MPZ.

La CMT1D es causada por mutaciones en el gen EGR2, que causan una expresión insuficiente de la proteína EGR2 funcional de tipo salvaje.

Por tanto, en algunas modalidades, el primer ácido nucleico puede ser el ORF o el ADNc de la secuencia de tipo salvaje del gen de la respuesta de crecimiento temprano 2 (EGR2). Se considera que el ORF de EGR2 tiene una secuencia como se define en la SEQ ID NO. 10. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico tiene al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 10, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 10. En otras modalidades, el primer ácido nucleico tiene al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la secuencia de ADNc de EGR2, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia de ADNc de EGR2.

De ello se deduce que, en algunas modalidades, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse en el tratamiento o la prevención de CMT1D mediante el suministro de una copia de tipo salvaje u otra copia beneficiosa terapéuticamente del marco de lectura abierto o ADNc del gen EGR2.

En otra modalidad, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse en métodos de tratamiento o la prevención de otros tipos de CMT desmielinizante autosómica recesiva. La CMT4A es causada por mutaciones en el gen GDAP1, que causan una expresión insuficiente de la proteína GDAP1 funcional de tipo salvaje.

Por lo tanto, en algunas modalidades, el primer ácido nucleico puede ser el ORF de la secuencia de tipo salvaje del gen de la proteína 1 asociada con diferenciación inducida por gangliósidos (GDAP1). Se considera que el ORF de GDAP1 tiene una secuencia como se define en la SEQ ID NO. 11. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico tiene al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 11, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de

identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 11. En otras modalidades, el primer ácido nucleico tiene al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la secuencia de ADNc de GDAP1, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia de ADNc de GDAP1.

De ello se deduce que, en algunas modalidades, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse en el tratamiento o la prevención de CMT4A mediante el suministro de una copia de tipo salvaje u otra copia beneficiosa terapéuticamente del marco de lectura abierto o ADNc del gen GDAP1.

La CMT4D es causada por mutaciones en el gen NDRG1, que causan una expresión insuficiente de la proteína NDRG1 funcional de tipo salvaje.

Por lo tanto, en algunas modalidades, el primer ácido nucleico puede ser el ORF o el ADNc de la secuencia de tipo salvaje del gen de regulado aguas abajo de N-Myc 1 (NDRG1). Se considera que el ORF de NDRG1 tiene una secuencia como se define en la SEQ ID NO. 12. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico tiene al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 12, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 12. En otras modalidades, el primer ácido nucleico tiene al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la secuencia de ADNc de NDRG1, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia de ADNc de NDRG1.

De ello se deduce que, en algunas modalidades, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse en el tratamiento o la prevención de CMT4D mediante el suministro de una copia de tipo salvaje u otra copia beneficiosa terapéuticamente del marco de lectura abierto o ADNc del gen NDRG1.

La CMT4E es causada por mutaciones en el gen EGR2, que causan una expresión insuficiente de la proteína EGR2 funcional de tipo salvaje.

Por tanto, en algunas modalidades, el primer ácido nucleico puede ser el ORF o el ADNc de la secuencia de tipo salvaje del gen de la respuesta de crecimiento temprano 2 (EGR2). Se considera que el ORF de EGR2 tiene una secuencia como se define en la SEQ ID NO. 10. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico tiene al

menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 10, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 10. En otras modalidades, el primer ácido nucleico tiene al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la secuencia de ADNc de EGR2, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia de ADNc de EGR2.

De ello se deduce que, en algunas modalidades, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse en el tratamiento o la prevención de CMT4E mediante el suministro de una copia de tipo salvaje u otra copia beneficiosa terapéuticamente del marco de lectura abierto o ADNc del gen EGR2.

La neuropatía hereditaria con tendencia a la parálisis por presión (HNPP) se asocia con una mutación en el gen PMP22, que causa una expresión insuficiente de la proteína PMP22 funcional de tipo salvaje.

Por lo tanto, en algunas modalidades, el primer ácido nucleico puede ser el ORF o el ADNc de la secuencia de tipo salvaje del gen de la proteína 22 de mielina periférica (PMP22). Se considera que el ORF de PMP22 tiene una secuencia como se define en la SEQ ID NO. 8. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico tiene al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 8, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 8. En otras modalidades, el primer ácido nucleico tiene al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la secuencia de ADNc de PMP22, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia de ADNc de PMP22.

De ello se deduce que en algunas modalidades, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse en el tratamiento o la prevención de HNPP mediante el suministro de una copia de tipo salvaje u otra copia beneficiosa terapéuticamente del marco de lectura abierto o ADNc del gen PMP22.

En otra modalidad, el primer ácido nucleico puede ser el ORF o el ADNc de otro gen asociado con una neuropatía desmielinizante y/o disfunción de las células de

Schwann. De ello se deduce que, en algunas modalidades, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse en el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con una neuropatía desmielinizante y/o disfunción de las células de Schwann mediante el suministro de una copia de tipo salvaje u otra copia beneficiosa terapéuticamente del marco de lectura abierto o ADNc de un gen asociado con dicha enfermedad.

La enfermedad de la neurona motora (MND) (también llamada esclerosis lateral amiotrófica) es un trastorno neurodegenerativo con causas complejas que no se han determinado por completo. En algunas modalidades, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse para suministrar polinucleótidos que codifican factores tróficos (por ejemplo, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), neurotrofina-3 (NT-3), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)). Se considera que la expresión de dichos factores tróficos en las células diana es útil para regenerar y salvar las neuronas motoras estresadas.

De ello se deduce que, en algunas modalidades, los vectores virales descritos en la presente descripción se usan en métodos de tratamiento o la prevención de la MND.

Para el experto en la técnica estaría claro que la forma de tipo salvaje o beneficiosa terapéuticamente de las proteínas descritas en la presente descripción podría expresarse a partir de la secuencia de nucleótidos del gen completo, solo de la secuencia de marco de lectura abierto (ORF), o solo de la secuencia de ADNc. El experto en la técnica accedería fácilmente a todos estos tipos de secuencias desde una base de datos de secuencias, por ejemplo, GenBank (accesible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

En algunas modalidades, el primer polinucleótido codifica y se traduce en un primer polipéptido o proteína. En algunas modalidades, el primer polinucleótido codifica una forma de tipo salvaje de una proteína. En algunas modalidades, la forma de tipo salvaje de la proteína se usa para reemplazar o complementar la expresión de una forma mutante de la misma proteína que se expresa en un sujeto que la necesita.

En algunas modalidades, el primer polinucleótido puede codificar una forma de tipo salvaje o beneficiosa terapéuticamente de una o más de las siguientes proteínas: conexina-32 (Cx32); el dominio SH3 y repeticiones tetratricopeptídicas 2 (SH3TC2); la proteína 22 de mielina periférica (PMP22); la proteína cero de mielina (MPZ); la respuesta de crecimiento temprano 2 (EGR2); la proteína asociada con la diferenciación inducida por gangliósidos 1 (GDAP1); regulado aguas abajo de N-Myc 1

(NDRG1). El experto en la técnica comprenderá que se puede acceder fácilmente a las secuencias de aminoácidos de las proteínas descritas en la presente descripción desde una base de datos de secuencias, por ejemplo, la Base de datos de proteínas NCBI (accesible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>).

Por lo tanto, en algunas modalidades, la invención puede aplicarse a métodos de reemplazo de genes tras proporcionar un vector AAV que contiene una forma de tipo salvaje u otra forma beneficiosa terapéuticamente de un gen a reemplazar. En algunos ejemplos no limitantes, el gen que se va a reemplazar puede estar mutado de tal manera que no codifica una proteína, sino que codifica una versión truncada de la proteína de tipo salvaje (por ejemplo, existe un codón de parada prematuro), codifica una cantidad reducida de proteína funcional o codifica una forma mutante no funcional de la proteína.

En una modalidad adicional o alternativa, el primer ácido nucleico codifica y se traduce en un factor trófico (por ejemplo, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), neurotrofina-3 (NT-3), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)). Por factor trófico incluimos biomoléculas (por ejemplo, proteínas o péptidos) que apoyan el crecimiento, diferenciación y/o desarrollo de neuronas maduras y en desarrollo. En otra modalidad adicional o alternativa, el primer polinucleótido codifica un factor regenerativo (por ejemplo, Angiogenina, Oct-6, Egr2, Sox-10). En otra modalidad adicional o alternativa, el primer polinucleótido codifica un factor de crecimiento (por ejemplo, IGF).

El uso de los vectores descritos en la presente descripción para suministrar ácidos nucleicos que codifican los factores tróficos, los factores regenerativos y/o los factores de crecimiento descritos anteriormente pueden usarse en algunas modalidades para tratar o evitar trastornos de nervios periféricos adquiridos. En un ejemplo, las neuropatías periféricas diabéticas y otras tóxicas podrían tratarse tras suministrar vectores como se describe en la presente descripción que codifican factores tróficos y/o factores de crecimiento a células de Schwann y axones. En otro ejemplo, la enfermedad de la motoneurona (MND) (también conocida como esclerosis lateral amiotrófica) puede tratarse tras suministrar vectores como se describe en la presente descripción que codifican factores tróficos que pueden administrarse a los axones de las motoneuronas estresadas para salvar retroactivamente dichas motoneuronas.

En otra modalidad, la administración de un vector viral que comprende un primer ácido nucleico que codifica una primera proteína o polipéptido conduce a un

funcionamiento mejorado de las células de Schwann y/o un aumento de la formación de la vaina de mielina. En algunas modalidades, esta mejora en la función se logra mediante un aumento de la formación de la vaina de mielina por las células de Schwann en comparación con la formación de la vaina de mielina por las células de Schwann en el sujeto antes del tratamiento y la mejora en la función puede detectarse a través de la detección de un aumento de la producción de vaina de mielina. En algunas modalidades, la mejora en la función puede medirse mediante una mejora en la fuerza muscular y/o una mejora en la velocidad de conducción del nervio ciático y/o cambios en la respuesta potencial de los biomarcadores sanguíneos en comparación con estas medidas en el sujeto antes del tratamiento. El experto en la técnica conoce técnicas para determinar una mejora en la función de las células de Schwann y/o un aumento en la formación de la vaina de mielina. Algunas de estas técnicas se proporcionan en los Ejemplos.

En algunas modalidades específicas, el aumento en la formación de la vaina de mielina por las células de Schwann conduce a una mielinización mejorada de los nervios periféricos. Por mielinización mejorada de los nervios periféricos queremos decir que hay un aumento de la mielinización de los nervios periféricos en comparación con el sujeto antes del tratamiento. Esto incluye una disminución de las fibras desmielinizadas y remielinizadas y/o una reducción de las fibras mielinizadas de manera anormal. La mielinización mejorada también puede estar asociada con una reducción en el número de macrófagos espumosos, que es un marcador de inflamación, en algunas modalidades. La mielinización mejorada también puede estar asociada con un aumento del grosor de la mielina y una reducción de las relaciones g (diámetro axonal dividido por el diámetro de las fibras mielinizadas).

Como se describió anteriormente, el primer ácido nucleico puede codificar un polipéptido o proteína que tiene beneficios terapéuticos, por ejemplo, cuando la proteína nativa se muta o se expresa a un nivel que es demasiado bajo para dar como resultado una funcionalidad normal.

Se apreciará que en una modalidad alternativa, el primer ácido nucleico puede transcribirse en un ARN que no es un ARNm, es decir, no es un ARN que se traduce en una proteína. En consecuencia, el primer ácido nucleico puede transcribirse en un ARN no codificante.

Por "ARN no codificante" nos referimos a cualquier molécula de ARN que no se traduzca en un polipéptido o proteína. El experto en la técnica conocerá dichos polímeros de ARN y cómo pueden usarse para afectar la expresión de polipéptidos. En

una modalidad, el primer ácido nucleico se transcribe en un microARN no codificante (miR). En una modalidad alternativa adicional, el primer ácido nucleico se transcribe en un ARN de horquilla corta (ARNhc). En una modalidad adicional, el primer ácido nucleico se transcribe en un ARN guía (ARNg), por ejemplo, como parte de un sistema basado en CRISPR.

La expresión del ARN no codificante descrito anteriormente cuando el vector viral está en un organismo diana puede conducir a una reducción en la expresión de un polinucleótido diana, en donde opcionalmente el polinucleótido diana es un gen ubicado en un organismo diana, en donde opcionalmente este está ubicado en una célula en un organismo diana. En algunas modalidades, el polinucleótido diana es una secuencia genética. Por lo tanto, en algunas modalidades, la invención descrita en la presente descripción puede usarse para reducir la expresión de un gen diana. Por "reducir" queremos decir que la expresión del gen diana se reduce en comparación con los niveles de expresión antes del tratamiento con el vector viral.

Por ejemplo, la invención puede aplicarse a situaciones en las que se sobreexpresa un ácido nucleico diana, por ejemplo, un gen diana. El vector viral puede usarse para suministrar un primer ácido nucleico que se transcribe en un ARN no codificante para, por ejemplo, dirigirse al ARNm producido por el gen que se sobreexpresa para la degradación (por ejemplo, por el complejo RISC, que es bien conocido en la técnica) o para bloquear directamente la traducción de dicho ARNm en proteína. Esta modalidad de la invención también se aplica a situaciones en las que el ácido nucleico diana se transcribe a sí mismo en un ARN no codificante, y es beneficioso reducir los niveles del ARN no codificante del huésped en la célula.

Esta modalidad de la invención también puede usarse para dirigirse a mutantes de ganancia de función deletéreos y reducir sus niveles de expresión de proteína o ARNm.

Por lo tanto, en algunas modalidades, la expresión de ARN no codificante da como resultado la reducción de la expresión de un ácido nucleico, un polinucleótido o un gen diana. En una modalidad, se considera que la expresión o sobreexpresión del polinucleótido diana en un organismo diana se asocia con una enfermedad asociada con las células de Schwann, en donde opcionalmente la enfermedad es una neuropatía desmielinizante dominante (CMT1), en donde opcionalmente el polinucleótido diana es un alelo mutado de proteína cero de mielina (Mpz/P0) y la enfermedad asociada con las células de Schwann es CMT1B, o en donde el polinucleótido diana es otro gen dominante asociado con CMT1.

En algunas modalidades, la administración de un vector viral que codifica un primer ácido nucleico da como resultado la expresión de un ARN no codificante que conduce a una mejora del funcionamiento de las células de Schwann. Como se discutió anteriormente, en algunas modalidades esta mejora en la función se logra mediante un aumento de la formación de la vaina de mielina por las células de Schwann en comparación con la formación de la vaina de mielina por las células de Schwann en el sujeto antes del tratamiento. En algunas modalidades, esta mejora en la función puede medirse mediante una mejora en la fuerza muscular y/o una mejora en la velocidad de conducción del nervio ciático y/o cambios en la respuesta potencial de los biomarcadores sanguíneos en comparación con estas medidas en el sujeto antes del tratamiento.

En algunas modalidades, los vectores virales descritos en la presente descripción comprenden una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido o proteína, y el vector también puede comprender un segundo ácido nucleico que se transcribe en un ARN no codificante. Por lo tanto, la invención puede usarse en algunas modalidades para reducir la expresión de un gen mutante mediante el uso de un ARN no codificante y también para reemplazar el gen mutante con una copia de tipo salvaje de dicho gen, lo que da como resultado un reemplazo completo del gen. Este enfoque se considera particularmente útil cuando el sujeto que necesita tratamiento tiene una mutación de ganancia de función en una proteína particular.

En algunas modalidades, el vector viral también contiene una segunda o tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un factor de transcripción capaz de conducir la expresión o aumentar la expresión del promotor específico de las células de Schwann, opcionalmente el promotor específico de la mielina o los promotores específicos de la mielina mínimos como se define en la presente descripción. Los ejemplos de dichos factores de transcripción que pueden conducir a la expresión de polinucleótidos bajo el control de promotores específicos de las células de Schwann incluyen Egr2 y Sox10.

El vector viral también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido Cas9 o similar que se usa habitualmente en técnicas CRISPR y variaciones de estas, tales como dead-Cas9.

Se entenderá que los vectores virales descritos en la presente descripción pueden administrarse al sujeto de diversas formas. En una modalidad preferida, los vectores virales descritos en la presente descripción se administran mediante inyección intratecal. Por "inyección intratecal" incluimos la inyección en el canal espinal

que da como resultado que el material inyectado llegue al líquido cefalorraquídeo (LCR). En una modalidad particularmente preferida, los vectores virales descritos en la presente descripción se administran mediante inyección intratecal lumbar. Los vectores virales descritos en la presente descripción también son adecuados para la administración mediante inyección intratecal torácica o inyección intratecal cervical. Alternativamente, los vectores virales descritos en la presente descripción podrían administrarse mediante inyección directa en nervios periféricos. Alternativamente, los vectores virales descritos en la presente descripción podrían administrarse mediante inyección intravenosa directa.

La inyección intratecal proporciona ventajas sobre otros métodos de administración tales como la inyección intraneural e intravenosa. En comparación con la inyección intraneural, la inyección intratecal proporciona una distribución más extendida a múltiples raíces y nervios espinales. Por el contrario, la inyección intraneural proporciona distribución solo dentro del nervio inyectado. Además, la inyección intratecal puede realizarse de forma rutinaria en la clínica, no requiere un procedimiento quirúrgico y se considera segura, mientras que las inyecciones intraneurales requerirán un procedimiento quirúrgico y múltiples nervios para estar expuestos, mayor riesgo, mucho más difícil de traducir en la clínica.

Si bien la inyección intravenosa es más fácil de administrar en la clínica, tiene la desventaja de requerir dosis mucho más altas del vector para llegar al sistema nervioso en comparación con el suministro intratecal. El suministro intravenoso también puede conducir a una mayor toxicidad, debido a las dosis más altas del virus y al riesgo de toxicidad hepática. Además, es probable que la inyección intravenosa cause más reacciones inmunitarias, mientras que el suministro intratecal ofrece la posibilidad de evadir el sistema inmunológico con una respuesta inmunitaria más baja.

Una vez que los vectores AAV descritos en la presente descripción han transducido la célula diana, el material genético que se suministra permanece estable y episómico, siempre que la célula diana se haya diferenciado y no se esté dividiendo, como es el caso de las células de Schwann maduras. Por lo tanto, una sola administración de un vector AAV debería ser suficiente para lograr efectos terapéuticos y, en algunas modalidades, los vectores virales descritos en la presente descripción se administran mediante una única inyección intratecal. Sin embargo, en algunos casos, puede ser necesario administrar dosis múltiples de diferentes vectores de AAV al sujeto en diferentes momentos. Estos diferentes vectores pueden expresar diferentes primeros polinucleótidos, o pueden expresar el mismo primer polinucleótido

y diferir en el tipo de AAV que se usa. Por lo tanto, en algunas modalidades, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden ser útiles para tratar o evitar enfermedades asociadas con las células de Schwann que están asociadas con múltiples genes diferentes.

Se apreciará que los vectores virales descritos en la presente descripción son adecuados para el uso en sujetos humanos. Los vectores virales también son adecuados para el uso en mamíferos en general, tales como: gato, perro, ratón, conejo, caballo. Los sujetos pueden tratarse con los vectores virales descritos en la presente descripción antes de la aparición de los síntomas de la enfermedad asociada con las células de Schwann o después de la aparición de los síntomas de dicha enfermedad. Los sujetos a tratar pueden tener cualquier edad al inicio del tratamiento. Por ejemplo, los sujetos pueden tratarse con el(los) vector(es) de la invención tan pronto como se confirme que el sujeto tiene una mutación u otro defecto que comprometa el rendimiento de las células de Schwann. Esto puede ser antes de que se presenten síntomas.

Se apreciará que la dosis de vector viral usada se ajustará de acuerdo con los requisitos del sujeto que lo necesite, por ejemplo, puede ajustarse debido a la edad, peso o altura del sujeto. Como ejemplo general, puede usarse una dosis de (para suministro intratecal) dosis crecientes a $3,5 \times 10^{13}$ genomas de vector (vg), $3,3 \times$ dosis más alta de $1,2 \times 10^{14}$ vg y la dosis 5 veces mayor de $1,8 \times 10^{14}$ vg. Dosis como estas se han usado previamente en ensayos clínicos con AAV (por ejemplo, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02362438>), y el experto en la técnica conocerá que podrían aplicarse a la presente invención.

Para el experto en la técnica estará claro que además de los métodos terapéuticos para evitar o tratar una enfermedad asociada con las células de Schwann, la invención también proporciona el vector viral per se. En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona un vector viral como se describe en la presente descripción que comprende una secuencia de ácido nucleico como se define en la presente descripción. En una modalidad preferida, el vector viral es un AAV. En una modalidad particularmente preferida, el AAV es un AAV9. Las preferencias por las características de este aspecto son como se describen en otra parte de esta descripción, por ejemplo, las preferencias por el vector, ácido nucleico, promotor, enfermedad asociada con las células de Schwann son como se definen en la presente descripción.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un promotor mínimo específico de mielina que comprende o consiste en la secuencia definida en la SEQ ID NO. 5 o una secuencia con al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 5, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 5. Las preferencias por las características de este aspecto son como se describen en esta descripción, por ejemplo, las preferencias por el vector, ácido nucleico, promotor, enfermedad asociada con las células de Schwann son como se definen en la presente descripción.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un promotor mínimo específico de mielina que comprende o consiste en la secuencia definida en la SEQ ID NO. 22 o una secuencia con al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 22, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 22. Las preferencias por las características de este aspecto son como se describen en esta descripción, por ejemplo, las preferencias por el vector, ácido nucleico, promotor, enfermedad asociada con las células de Schwann son como se definen en la presente descripción. En algunas modalidades, la invención proporciona un promotor mínimo específico de mielina humano, en donde el promotor mínimo específico de mielina humano tiene una homología de secuencia con al menos 75 %, 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 22.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una construcción polinucleotídica que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que es un promotor específico de las células de Schwann, opcionalmente un promotor específico de mielina, que comprende opcionalmente el promotor de la proteína cero de mielina (Mpz) o un promotor mínimo específico de mielina como se define en la presente descripción, unido operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico que se transcribe en un primer polinucleótido, en donde el segundo ácido nucleico:

a) es el marco de lectura abierto o ADNc u otros elementos de un gen; o b) se transcribe en un ARN no codificante.

La invención también proporciona un vector viral que comprende dicha construcción polinucleotídica, por ejemplo, proporciona un vector AAV que comprende

la construcción. Las preferencias por las características de este aspecto son como se describen en esta descripción, por ejemplo, las preferencias por el vector, ácido nucleico, promotor, enfermedad asociada con las células de Schwann son como se definen en la presente descripción. Por ejemplo, en una modalidad, la construcción polinucleotídica de la invención comprende un promotor específico de las células de Schwann, en donde el promotor es a) un promotor mínimo específico de las células de Schwann, opcionalmente un promotor mínimo de Mpz como se describe en la presente descripción, por ejemplo, cuando el promotor tiene una secuencia con al menos 75 %, 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 5 o la SEQ ID NO. 22; o b) un promotor de Mpz de longitud completa en donde opcionalmente el promotor tiene una secuencia con al menos 75 %, 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 4 o la SEQ ID NO. 18.

Preferentemente, la construcción polinucleotídica de la invención comprende un promotor mínimo de Mpz humano o Mpz de longitud completa humano como se describe en la presente descripción.

En un aspecto adicional, la invención proporciona los siguientes vectores virales:

a) Un vector AAV-Mpz.Egfp que comprende un vector AAV9, el promotor de la proteína cero de mielina (Mpz) y el gen indicador de EGFP (SEQ ID NO. 1), en donde opcionalmente el promotor tiene una secuencia con al menos 75 %, 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 4 o la SEQ ID NO. 18;

b) Un vector AAV9-Mpz-GJB1 que comprende un vector AAV9, el promotor de la proteína cero de mielina (Mpz) y el marco de lectura abierto (ORF) del gen de unión en hendidura beta 1 (GJB1) (SEQ ID NO. 2), en donde opcionalmente el promotor tiene una secuencia con al menos 75 %, 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 4 o la SEQ ID NO. 18;

c) Un vector AAV9-miniMpz.Egfp que comprende un vector AAV9, el promotor mínimo de la proteína cero de mielina (miniMpz) y el gen indicador de EGFP (SEQ ID NO. 3), en donde opcionalmente el promotor miniMPZ tiene una homología de secuencia con al menos 75 %, 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 4 o la SEQ ID NO. 18;

o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 5 o la SEQ ID NO. 22;

d) Un vector AAV9-Mpz-GJB1 humano que comprende un vector AAV9, el promotor de la proteína cero de mielina humana (hP0) y el marco de lectura abierto (ORF) del gen de unión en hendidura beta 1 (GJB1) (SEQ ID NO. 17);

e) Un vector AAV9-Mpz-Egfp humano que comprende un vector AAV9, el promotor de la proteína cero de mielina humana (hP0) y el gen indicador de EGFP (SEQ ID NO. 19);

f) Un vector AAV9-miniMpz-SH3TC2.myc.ITR que comprende un vector AAV9, un promotor mínimo de la proteína cero de mielina (Mpz) y el marco de lectura abierto (ORF) del gen SH3TC2 (SEQ ID NO. 20);

g) Un vector AAV9-miniMpz-SH3TC2 humano que comprende un vector AAV9, un promotor mínimo de la proteína cero de mielina humano (hP0) y el marco de lectura abierto (ORF) del gen SH3TC2 (SEQ ID NO. 21);

h) Un vector AAV9-miniMpz-Egfp humano que comprende un vector AAV9, un promotor mínimo de la proteína cero de mielina humano (hP0) y el gen indicador de EGFP (SEQ ID NO. 23);

o i) un AAV, en donde opcionalmente el vector AAV es un AAV9; Las preferencias por las características de este aspecto son como se describen en esta descripción, por ejemplo, las preferencias por el vector, ácido nucleico, promotor, enfermedad asociada con las células de Schwann son como se definen en la presente descripción.

En una modalidad específica, la invención también proporciona un vector viral para el uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con las células de Schwann en un sujeto que lo necesite, en donde el vector viral comprende una primera secuencia de ácido nucleico que se transcribe en un primer polinucleótido, y en donde la transcripción de dicho primer ácido nucleico está bajo el control de un promotor mínimo específico de mielina, que opcionalmente comprende o consiste en la secuencia definida en la SEQ ID NO. 5 o la SEQ ID NO. 22 o que tiene al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 5 o 22, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 5 o 22. En una modalidad, el vector viral puede ser un vector AAV. En otra modalidad alternativa, el vector viral puede ser un vector lentiviral. Las preferencias por las características de este aspecto son como se

describen en esta descripción, por ejemplo, las preferencias por el vector, ácido nucleico, promotor, enfermedad asociada con las células de Schwann son como se definen en la presente descripción.

En otro aspecto, la invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los vectores virales como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende una cantidad apropiada del vector viral y además comprende un excipiente, diluyente, portador, tampón o adyuvante aceptable farmacéuticamente. Las preferencias por las características de este aspecto son como se describen en esta descripción, por ejemplo, las preferencias por el vector, ácido nucleico, promotor, enfermedad asociada con las células de Schwann son como se definen en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, "composición farmacéutica" significa una formulación eficaz terapéuticamente para el uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con las células de Schwann.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse de una manera conocida en la técnica que sea lo suficientemente estable para el almacenamiento y adecuada para su administración a seres humanos.

Por "aceptable farmacéuticamente" nos referimos a un material no tóxico que no disminuye la efectividad de la actividad biológica de los ingredientes activos, es decir, el vector viral. Dichos portadores o excipientes aceptables farmacéuticamente se conocen bien en la técnica (ver Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a edición, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) y el manual de Pharmaceutical Excipients, 3a edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000), que se incorporan en la presente descripción como referencia).

El término "tampón" pretende significar una solución acuosa que contiene una mezcla ácido-base con el propósito de estabilizar el pH. Los ejemplos de tampones son Trizma, Bicine, Tricine, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, fosfato, carbonato, acetato, citrato, glicolato, lactato, borato, ACES, ADA, tartrato, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, cacodilato, CHES, DIPSO, EPPS, etanolamina, glicina, HEPPSO, imidazol, ácido imidazol láctico, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO y TES.

El término "diluyente" pretende significar una solución acuosa o no acuosa con el fin de diluir el vector viral en la preparación farmacéutica. El diluyente puede ser uno o más de solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales

como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de maní, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo).

El término "adyuvante" pretende significar cualquier compuesto adicionado a la formulación para aumentar el efecto biológico del vector viral. El adyuvante puede ser una o más plata coloidal, sales de zinc, cobre o plata con diferentes aniones, por ejemplo, pero sin limitarse a fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato, sulfito, hidróxido, fosfato, carbonato, lactato, glicolato, citrato, borato, tartrato, y acetatos de diferente composición de acilo. Los adyuvantes pueden ser, además, polímeros catiónicos tales como PHMB, éteres de celulosa catiónicos, ésteres de celulosa catiónicos, ácido hialurónico desacetilado, quitosano, dendrímeros catiónicos, polímeros sintéticos catiónicos tales como, poli(vinil imidazol) y polipéptidos catiónicos tales como polihistidina, polilisina, poliarginina y péptidos que contienen estos aminoácidos.

El excipiente puede ser uno o más de carbohidratos, polímeros, lípidos y minerales. Los ejemplos de carbohidratos incluyen lactosa, sacarosa, manitol y ciclodextrinas, que se adicionan a la composición, por ejemplo, para facilitar la liofilización. Los ejemplos de polímeros son almidón, éteres de celulosa, celulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, propilcelulosa, alginatos, carragenanos, ácido hialurónico y sus derivados, ácido poliacrílico, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, alcohol polivinílico/acetato de polivinilo de diferentes grados de hidrólisis, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) or sus copolymers con diversas composiciones y polivinilpirrolidona, todos de diferente peso molecular, que se adicionan a la composición, por ejemplo, para el control de la viscosidad, para lograr la bioadhesión, o para proteger al ingrediente activo de la degradación química y proteolítica. Los ejemplos de lípidos son ácidos grasos, fosfolípidos, mono, di, y triglicéridos, ceramidas, esfingolípidos y glicolípidos, todos de diferente longitud y saturación de la cadena de acilo, lecitina de huevo, lecitina de soja, lecitina de soja y huevo hidrogenados, que se adicionan a la composición por razones similares a las de los polímeros. Los ejemplos de minerales son talco, óxido de magnesio, óxido de zinc y óxido de titanio, que se adicionan a la composición para obtener beneficios tales como la reducción de la acumulación de líquido o propiedades ventajosas de pigmentos.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un vector viral como se describe en la presente descripción en un método de fabricación de un medicamento

para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con las células de Schwann. En algunas modalidades, la enfermedad causa destrucción y/o formación reducida de la vaina de mielina por las células de Schwann. En una modalidad preferida, la enfermedad es la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. Las preferencias por las características de este aspecto son como se describen en esta descripción, por ejemplo, las preferencias por el vector, ácido nucleico, promotor, enfermedad asociada con las células de Schwann son como se definen en la presente descripción.

En aún otro aspecto, la invención proporciona métodos de tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con las células de Schwann mediante el uso de cualquiera de los vectores virales descritos en la presente descripción. En una modalidad específica, la invención proporciona métodos de tratamiento o la prevención de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. En una modalidad preferida, la enfermedad es la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1X o tipo 4C. Las preferencias por las características de este aspecto son como se describen en esta descripción, por ejemplo, las preferencias por el vector, ácido nucleico, promotor, enfermedad asociada con las células de Schwann son como se definen en la presente descripción.

El experto en la técnica apreciará que los vectores virales descritos en la presente descripción podrían usarse en un sistema CRISPR/Cas para el uso en la edición o silenciamiento de genes, por ejemplo, mediante el uso de un polipéptido dead-Cas9. En consecuencia, en otro aspecto, la invención incluye un vector viral o una construcción polinucleotídica como se describe en la presente descripción para el uso en un sistema CRISPR/Cas9 que comprende uno cualquiera o más de:

- a) un polinucleótido que codifica un ARN guía único (ARNgu) que se dirige a un gen de interés;
- b) un polinucleótido que codifica un polipéptido Cas9;
- c) un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés.

Las preferencias por las características de este aspecto son como se describen en esta descripción, por ejemplo, las preferencias por el vector, ácido nucleico, promotor, enfermedad asociada con las células de Schwann son como se definen en la presente descripción.

Para el experto en la técnica estará claro que los vectores virales descritos en la presente descripción podrían tener una variedad de usos distintos del tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con las células de Schwann. Por ejemplo, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse en un método de marcaje de las células de Schwann, por ejemplo con proteína fluorescente, por

ejemplo, la proteína fluorescente verde (GFP) o la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP), o con otros indicadores no fluorescentes. En algunos ejemplos, el marcaje de las células de Schwann puede usarse en un método de diagnóstico de una enfermedad asociada con las células de Schwann.

Las preferencias por las características de este aspecto son como se describen en esta descripción, por ejemplo, las preferencias por el vector, ácido nucleico, promotor, enfermedad asociada con las células de Schwann son como se definen en la presente descripción.

En otro ejemplo, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse en métodos para inducir a las células de Schwann a diferenciarse en tipos celulares alternativos, por ejemplo, neuronas, oligodendrocitos o astrocitos.

En aún otro ejemplo, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden usarse en métodos para estimular a las células de Schwann para apoyar la regeneración en un sujeto que lo necesite, por ejemplo, después de una lesión o trauma. Las preferencias por las características de este aspecto son como se describen en esta descripción, por ejemplo, las preferencias por el vector, ácido nucleico, promotor, enfermedad asociada con las células de Schwann son como se definen en la presente descripción.

En aún otro ejemplo, los vectores virales descritos en la presente descripción pueden ser adecuados para el uso en métodos *ex vivo* para tratar enfermedades asociadas con las células de Schwann. Por ejemplo, las células diana podrían eliminarse del sujeto que necesita tratamiento y transducirse con un vector viral como se describe en la presente descripción antes de volver a introducirse en el sujeto.

Las preferencias por las características de este aspecto son como se describen en esta descripción, por ejemplo, las preferencias por el vector, ácido nucleico, promotor, enfermedad asociada con las células de Schwann son como se definen en la presente descripción.

La invención también proporciona una célula que ha sido transducida por el vector viral de la invención, por ejemplo, una célula de Schwann.

La invención también proporciona una célula que comprende la construcción de ácido nucleico de la invención que comprende el promotor relevante y el primer ácido nucleico. El experto en la técnica conocerá que los vectores virales de la presente invención pueden producirse en células cultivadas, preferentemente células HEK293, por ejemplo, como se describió en (58).

Se apreciará que los vectores y métodos descritos en la presente descripción pueden realizarse *in vivo*, pero también pueden usarse *ex vivo* o *in vitro*, por ejemplo, células tales como las células de Schwann pueden transducirse *in vitro* o *ex vivo* para fines terapéuticos o de investigación posteriores.

La invención también proporciona kits que pueden usarse para implementar cualquiera de los vectores virales descritos en la presente descripción. Por ejemplo, la invención proporciona un kit para el uso con el vector viral o polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el kit comprende uno o más de:

- a) un vector viral como se define en la presente descripción;
- b) una construcción polinucleotídica como se define en la presente descripción;
- c) un vector viral;
- d) un vector viral que comprende la construcción polinucleotídica como se define en la presente descripción;
- e) un portador y/o excipiente aceptable farmacéuticamente;
- f) una jeringa de un solo uso, por ejemplo una jeringa de un solo uso adecuada para inyección lumbar intratecal;
- g) instrucciones de uso.

En una modalidad, el kit comprende más que un vector viral de acuerdo con la invención, por ejemplo, el kit puede comprender dos vectores virales diferentes como se define en la presente descripción.

Para el experto en la técnica estará claro que en cualquiera de los usos terapéuticos de la invención, puede administrarse al sujeto más de un vector viral de acuerdo con la invención. Será evidente para el experto en la técnica que en algunas situaciones esto es ventajoso, por ejemplo, si se conoce que más de un gen está asociado con la enfermedad asociada con las células de Schwann, pueden administrarse múltiples vectores virales, cada vector dirigido a expresar una proteína terapéutica diferente. Alternativamente, un solo vector puede expresar más de una proteína terapéutica o ARN no codificante. En otras situaciones, como las descritas anteriormente, puede usarse un vector viral para expresar, por ejemplo, una proteína Cas9 en las células de Schwann y puede usarse un vector viral diferente para expresar el ARNg relevante para dirigir Cas9 al ácido nucleico requerido.

El listado o discusión de un documento publicado aparentemente antes en esta descripción no deben tomarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es de conocimiento general común.

Las preferencias y opciones para un aspecto, característica o parámetro dado de la invención, a menos que el contexto indique de cualquier otra manera, deben considerarse como que se describieron en combinación con todas y cada una de las preferencias y opciones para todos los demás aspectos, características, y parámetros de la invención.

En consecuencia, y para ejemplificar cómo la descripción de un aspecto de la invención se relaciona con otros aspectos de la invención, y para demostrar cómo pueden combinarse estos aspectos, la invención, en algunas modalidades, proporciona:

Un vector viral para el uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con las células de Schwann en donde el vector viral es un AAV y en donde el vector viral comprende un primer ácido nucleico que puede transcribirse en un primer polinucleótido, en donde la expresión del primer polinucleótido es bajo el control de un promotor mínimo específico de mielina (Mpz);

Un vector viral para el uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con las células de Schwann en donde el vector viral es un AAV y en donde el vector viral comprende un primer ácido nucleico que puede transcribirse en un primer polinucleótido, en donde la expresión del primer polinucleótido es bajo el control de a) un promotor de la proteína cero de mielina (Mpz), en donde opcionalmente el promotor tiene una secuencia con al menos 75 %, 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 4 o la SEQ ID NO. 1; o

b) un promotor mínimo específico de mielina (miniMpz), que opcionalmente comprende o consiste en la secuencia definida en la SEQ ID NO. 5 o la SEQ ID NO. 22, en donde opcionalmente el promotor miniMPZ tiene una homología de secuencia con al menos 75 %, 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 5 o la SEQ ID NO. 22;

Una construcción polinucleotídica que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que es un promotor mínimo específico de mielina (Mpz) que está operativamente unido a una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la

segunda secuencia de ácido nucleico es el marco de lectura abierto de una secuencia génica o codifica un ARN no codificante;

Un promotor mínimo específico de mielina (Mpz) que conduce a niveles altos de expresión en células de Schwann y es adecuado para el uso en los vectores virales descritos en la presente descripción.

La invención también proporciona:

un vector viral para el uso en el tratamiento o la prevención de CMT1X, en donde el vector comprende un promotor de Mpz humano (de acuerdo con la SEQ ID NO: 18) unido operativamente al gen GJB1, en donde el vector viral es AAV9;

uso de un vector viral en un método de fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de CMT1X, en donde el vector comprende un promotor de Mpz humano (de acuerdo con la SEQ ID NO: 18) unido operativamente al gen GJB1, donde el vector viral es AAV9; y

un método para tratar o evitar la CMT1X en donde el método comprende administrar un vector viral a un paciente que lo necesita, en donde el vector viral comprende un promotor de Mpz humano (de acuerdo con la SEQ ID NO: 18) unido operativamente al gen GJB1, y donde el vector viral es AAV9.

La invención también proporciona:

un vector viral para el uso en el tratamiento o la prevención de CMT4C, en donde el vector comprende el promotor mínimo de Mpz humano (de acuerdo con la SEQ ID NO: 22) unido operativamente al gen SH3TC2, donde el vector viral es AAV9;

uso de un vector viral en un método de fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de CMT4C, en donde el vector comprende un promotor de Mpz humano (de acuerdo con la SEQ ID NO: 22) unido operativamente al gen SH3TC2, donde el vector viral es AAV9; y

un método para tratar o evitar CMT4C en donde el método comprende administrar un vector viral a un paciente que lo necesita, en donde el vector viral comprende un promotor de Mpz humano (de acuerdo con la SEQ ID NO: 22) unido operativamente al gen SH3TC2, y donde el vector viral es AAV9.

Un paciente que lo necesita incluye un paciente que ha mostrado síntomas o ha recibido un diagnóstico de una de las enfermedades descritas en la presente descripción, y también incluye un paciente que se sospecha que tiene, o desarrollará, una de las enfermedades descritas en la presente descripción.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Plásmidos de transferencia del vector AAV generados para la expresión génica dirigida a células de Schwann: vector pAAV-Mbz.GJB1 que contiene el marco de lectura abierto GJB1 humano que expresa Cx32 (Completo) y pAAV-Mpz.Egfp que expresa el gen indicador EGFP (Simulado).

Figura 2: Expresión génica dirigida a células de Schwann mediada por AAV9. A-D: Cuatro semanas después de la inyección intratecal lumbar (i.th.) del vector AAV9-Mpz-Egfp en ratones de tipo salvaje (WT) de 2 meses, la inmunotinción de secciones de la raíz lumbar (A-B) con anticuerpo anti EGFP (A2, B) muestra expresión perinuclear (asteriscos) en un subconjunto de las células de Schwann con un aumento bajo (izquierda) y mayor (derecha). La expresión de EGFP también se observa en la sección del nervio ciático a un aumento bajo sin tinción de anticuerpos (C2) y a un aumento mayor de las fibras del nervio ciático separadas inmunoteñidas con el anticuerpo anti EGFP (D2). A1, C1 y D1 muestran solo tinción nuclear con DAPI de las mismas áreas que se muestran en A2, C2, D2. E: Cuantificación de relaciones de las células de Schwann positivas a EGFP en raíces lumbares y nervios ciáticos. F: Los números de copias de vectores (VCN) en las raíces lumbares, las secciones proximales y distales de los nervios ciáticos demuestran un gradiente de biodistribución del vector hacia los nervios periféricos después de la inyección intratecal. G: El análisis de inmunotransferencia de lisados de raíz lumbar (LR), nervios femorales (FN) y nervios ciáticos (SN) de diferentes ratones (1-4) muestra la banda específica de EGFP específica en la mayor parte del tejido de los ratones inyectados correspondiente al control positivo (+) de una muestra transgénica, mientras que está ausente en el control negativo (-) (Kagiava y otros, no publicado).

Figura 3: Expresión del vector AAV9-Mpz.GJB1 suministrado intratecalmente en ratones Cx32KO y R75W KO de 2 meses. A. Números de copias de vectores (VCN) en tejidos relevantes. La inmunotinción de las fibras separadas del ciático WT (B) y Cx32 KO (C) demuestra la localización específica de Cx32 en las áreas de mielina paranodal en la fibra WT (flechas) que está ausente en Cx32 KO. La inyección de AAV9-Mpz.GJB1 i.th. da como resultado la expresión paranodal de Cx32 no solo en las fibras ciáticas de Cx32 KO (D), sino también en las fibras de R75W KO (E), a pesar de la presencia del mutante R75W en las áreas perinucleares (asterisco y puntas de flecha abiertas). F: Análisis de transferencia Western de la expresión de Cx32 en muestras de raíz lumbar y nervio ciático (TG+: transgénico positivo; KO: controles negativos de Cx32 KO no tratados) (Kagiava y otros, no publicado).

Figura 4: Análisis del comportamiento de ratones Cx32 KO inyectados terapéuticamente con AAV9-Mpz.GJB1 (completo) a los 6 meses de edad en comparación con crías de la misma camada tratadas con AAV9-Mpz.Egfp (simulado). Los resultados de las pruebas de rendimiento motor con varilla giratoria (izquierda) y agarre del pie (derecha) en ratones tratados con AAV9-Mpz.GJB1 (GJB1) en comparación con ratones Cx32 KO tratados de forma simulada, como se indica. El análisis del curso temporal de cada grupo mostró una mejora en el rendimiento motor de los ratones Cx32 KO completamente tratados en el análisis de la varilla giratoria y del agarre del pie 2 meses después de la inyección (8 meses de edad) y después, el rendimiento motor se mantuvo estable hasta los 10 meses de edad. Por el contrario, los ratones tratados de forma simulada no mejoraron con el tiempo como lo indican ambas pruebas de comportamiento.

Figura 5: Resultados de los estudios de conducción motora del nervio ciático. Las velocidades de conducción nerviosa motora (MNCV) mejoraron en los ratones Cx32 KO completamente tratados de 10 meses de edad en comparación con las crías de la misma camada inyectadas con vector simulado que se aproximan a los valores de WT.

Figura 6: Análisis morfológico de las raíces espinales anteriores de ratones Cx32 KO después del suministro terapéutico intratecal de AAV9-Mpz.GJB1 en comparación con el vector de ratones tratados de forma simulada. Imágenes representativas de secciones semifinas de raíces espinales lumbares anteriores unidas a la médula espinal con un aumento bajo (A-B) y mayor (C-D), así como también resultados de análisis morfométricos (E-F) de ratones tratados con vector simulado o completo (GJB1) como se indica, a los 10 meses de edad (4 meses después del tratamiento). Las raíces de ratones inyectados con AAV9-Mpz.GJB1 (B, D) muestran una mielinización mejorada en comparación con las raíces de una cría de la misma camada tratada de forma simulada (A, C) con menos fibras desmielinizadas (*) y remielinizadas (r). La cuantificación de las relaciones de fibras mielinizadas de manera anormal en múltiples raíces confirma una mejora significativa en el número de fibras mielinizadas de manera anormal (E), así como también una reducción significativa en el número de macrófagos espumosos (F) en los tratados completamente en comparación con las crías de la misma camada tratadas con un vector simulado.

Figura 7: Análisis morfológico de los nervios ciáticos de ratones Cx32 KO después del suministro terapéutico intratecal del vector AAV9-Mpz.GJB1.

Imágenes representativas de secciones semifinas de los nervios ciáticos con aumento bajo (A-B) y mayor (C-D), así como también los resultados del análisis morfométrico (E-F) de ratones tratados con vector simulado o completo (GJB1) como se indica, a los 10 meses de edad (4 meses) después del tratamiento). Los nervios de ratones inyectados con AAV9-Mpz.GJB1 (B, D) muestran una mielinización mejorada en comparación con los nervios de una cría de la misma camada tratada de forma simulada (A, C) con menos fibras desmielinizadas (*) y remielinizadas (r). La cuantificación de las relaciones de fibras mielinizadas de manera anormal en múltiples nervios confirma una mejora significativa en el número de fibras mielinizadas de manera anormal (E), así como también una reducción significativa en el número de macrófagos espumosos (F) en los tratados completamente en comparación con las crías de la misma camada tratadas con un vector simulado.

Figura 8: Análisis morfológico de los nervios femorales de ratones Cx32 KO después del suministro terapéutico intratecal del vector AAV9-Mpz.GJB1.

Imágenes representativas de secciones semifinas de los nervios femorales con un aumento bajo (A-B) y mayor (C-D), así como también los resultados del análisis morfométrico (E-F) de ratones tratados con vector simulado o completo (GJB1) como se indica, a los 10 meses de edad (4 meses) después del tratamiento). Los nervios de ratones inyectados con AAV9-Mpz.GJB1 (B, D) muestran una mielinización mejorada en comparación con los nervios de una cría de la misma camada tratada de forma simulada (A, C) con menos fibras desmielinizadas (*) y remielinizadas (r). La cuantificación de las relaciones de fibras mielinizadas de manera anormal en múltiples nervios confirma una mejora significativa en el número de fibras mielinizadas de manera anormal (E), así como también una reducción significativa en el número de macrófagos espumosos (F) en los tratados completamente en comparación con las crías de la misma camada tratadas con un vector simulado.

Figura 9: La construcción miniMpz-Egfp clonada en el plásmido de transferencia de AAV después de la amplificación por PCR de una secuencia de 410 pb del promotor de Mpz de rata de longitud completa de 1127 pb.

Figura 10: Inmunotinción de secciones longitudinales de la raíz lumbar y el nervio ciático 4 semanas después de la inyección intratecal lumbar del vector AAV9-miniMpz-Egfp en ratones WT de 2 meses con anticuerpo anti EGFP muestra expresión perinuclear en un subconjunto de las células de Schwann (A, C). B y C son controles negativos que muestran solo la tinción nuclear con DAPI. E: Porcentaje de las células de Schwann positivas a EGFP (n = 5-6 ratones). F: Los números de copias de

vectores en las raíces lumbares y los nervios ciáticos demuestra una biodistribución del vector después de la inyección intratecal (n = 6 ratones).

Figura 11: Expresión mínima del SNC del vector AAV9-miniMpz-Egfp. Inmunotinción de secciones longitudinales de la médula espinal lumbar 4 semanas después de la inyección intratecal lumbar del vector AAV9-miniMpz-Egfp en ratones WT de 2 meses con anticuerpo anti EGFP en combinación con marcadores celulares NeuN (A, neuronas marcadas), GFAP (B, astrocitos marcados), CC-1 (C-D, oligodendrocitos marcados) muestra que solo unas pocas células de cada tipo celular expresan EGFP (los ejemplos se indican con flechas) mientras que la mayoría son negativos a EGFP (los ejemplos se indican con puntas de flecha abiertas). E. La cuantificación en n = 3-5 ratones por tinción de marcador celular muestra tasas de expresión bajas en los tres tipos de células del SNC de aproximadamente 2-3 %.

Figura 12: Prueba de comportamiento motor en grupos de ratones Cx32 KO (modelo de CMT1X) a la edad de 2 meses tratados preventivamente con el vector terapéutico completo (AAV9-Mpz-GJB1) o el vector simulado (AAV9-Mpz-Egfp). La prueba de fuerza de agarre del pie se llevó a cabo antes del tratamiento (2 meses de edad) y a los 4 (Figura 12A) y 6 (Figura 12B) meses de edad. Existe una mejora funcional significativa en los grupos tratados a los 4 y 6 meses. La Figura 12C muestra una mejora significativa a lo largo del tiempo después del tratamiento, mientras que los ratones tratados de forma simulada no mostraron ninguna mejora.

Figura 13: Estudios electrofisiológicos de ratones Cx32 KO de 6 meses de edad tratados preventivamente (completos) y tratados de forma simulada. Los estudios de conducción del nervio ciático motor se llevaron a cabo a los 6 meses de edad y mostraron una mejora significativa de las velocidades de conducción del nervio ciático después del tratamiento de terapia génica a la edad de 2 meses, en comparación con el tratamiento simulado.

Figura 14: Análisis morfológico de las raíces lumbares anteriores (motoras) de ratones Cx32 KO de 6 meses de edad después del tratamiento preventivo con el vector terapéutico completo (AAV9-Mpz-GJB1) o el vector simulado (AAV9-Mpz-Egfp) a los 2 meses de edad. Imágenes representativas de secciones semifinas de raíces lumbares anteriores (motoras). Los ratones tratados con AAV9-Mpz-GJB1 (B, D) muestran una mielinización mejorada en comparación con los ratones tratados de forma simulada (A, C) con menos fibras desmielinizadas (*) y remielinizadas (r). Según lo confirmado por el análisis cuantitativo (E, F), se encontraron menos fibras

desmielinizadas (*) o remielinizadas (r) (E) y menos macrófagos espumosos (F) en los ratones tratados en comparación con los tratados de forma simulada.

Figura 15: Análisis morfológico de los nervios ciáticos medios de ratones Cx32 KO de 6 meses de edad después del tratamiento preventivo con el vector terapéutico completo (AAV9-Mpz-GJB1) o el vector simulado (AAV9-Mpz-Egfp) a los 2 meses de edad. Imágenes representativas de secciones semifinas de los nervios ciáticos medios. Los ratones tratados con AAV9-Mpz-GJB1 (B, D) muestran una mielinización mejorada en comparación con los ratones tratados de forma simulada (A, C) con menos fibras desmielinizadas (*) y remielinizadas (r). Según lo confirmado por el análisis cuantitativo (E, F), se encontraron menos fibras desmielinizadas (*) o remielinizadas (r) (E) y menos macrófagos espumosos (F) en los ratones tratados en comparación con los tratados de forma simulada.

Figura 16: Análisis morfológico de los nervios motores femorales de ratones Cx32 KO de 6 meses de edad después del tratamiento preventivo con el vector terapéutico completo (AAV9-Mpz-GJB1) o el vector simulado (AAV9-Mpz-Egfp) a los 2 meses de edad. Imágenes representativas de secciones semifinas de nervios motores femorales. Los ratones tratados con AAV9-Mpz-GJB1 (B, D) muestran una mielinización mejorada en comparación con los ratones tratados de forma simulada (A, C) con menos fibras desmielinizadas (*) y remielinizadas (r). Según lo confirmado por el análisis cuantitativo (E, F), se encontraron menos fibras desmielinizadas (*) o remielinizadas (r) (E) y menos macrófagos espumosos (F) en los ratones tratados en comparación con los tratados de forma simulada.

Figura 17: Análisis de expresión de SH3TC2 en el sistema nervioso periférico de ratones Sh3tc2 -/- después del suministro intratecal del vector terapéutico AAV9-mini-Mpz-SH3TC2.myc novedoso. Expresión de la proteína SH3TC2 humana normal (rojo) principalmente en el citoplasma perinuclear de las células de Schwann mielinizantes en las raíces lumbares (A) y los nervios ciáticos (sección en D y fibras separadas en F) 4 semanas después de la inyección intratecal del vector AAV9-miniMpz-SH3TC2myc en ratones Sh3tc2 -/-. Los tejidos de ratones sin inyectar se muestran en A, C, E como control negativo. Los núcleos celulares se tiñen de azul. La cuantificación de las tasas de expresión (% de células positivas para SH3TC2) en raíces lumbares y nervios ciáticos en n = 5 ratones se muestra en la Figura 17G.

SECUENCIAS

SEQ ID NO. 1: Construcción AAV-Mpz.Egfp

tagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgctgggcgacctttggtcgccc
ggcctcagttagcgagcgagcgcgagagaggagtgccaactccatcactaggggttccttgtagttaat
gattaacccgccatgctacttatctacgtagccatgctctaggtaccgggccccccctcgaggctgacggtatcgata
agcttcctgttcagactcgttcctgtgtaccctttcaatggccccacatcaaatcaaacacagatggcacatatctactcta
aatatatgcagagcttcacaaacgtcatacacgtacgtgtgtcacacacgcacacacacacccctccacctctgcccttac
ctttgctgtcccatctagacattatccctccatcccttatttcccttatcaaaatggctgctcctcaaggttccaaataacact
gcttcttgacctgactcctcttctctgaacttctgtgtaagtgtattcctagtgcactgtgccttggtagttgtgagattgc
cctctgcttctcccttctgcctcctcatctagtgatcttgagctttagaagaactgaattaccattctaatacgagcattctcg
aactctccaaatagccaccaagcaggacaataggcagctcttgatcatttaaactgctgcatggcaaaaggaatcgaag
gatttctaacagaagtgggggggggggagatctgggcttctctggaagtttctgatatagagaaaatcttctgcctgggt
agaatctcccaggatgcaggagatggaaaaagtgttcccaaggactttgtagtctacaggtgtggagccatcgga
caacgagacaccctaatttgggagtgctctgaaagaaacttgctctaggccctagggtctcaggcaaggaggctaag
aaggaatccttggctgtagccttttggatttaggttctcagcttatctatccctcagagaagtgtgtctatgtcccttttctgcct
ctgcctcaccaccacccaacattccaacctagggtagggggaggtcagtatacacaagccctctgtgtaaggggtgt
atgtgtcccccacccccctaccagagtatacaatgcccttctgtccatgccctgccaccctccaccacctctcaat
tgcacatgccagggtgcaattggctcactggctcaggacagccccctcatgtggggatccaggggatttaagcaggttc
cagaaaacaccactcagttccttgccttctcctccacccacagacgctctgccaagcttgatatgaattgatcca
ccggtgcaccatggtgagcaagggcgaggagctgttaccgggggtgtgcccacctgtgctgagctggacggcga
cgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttca
tctgcaccaccggcaagctgccgtgccctggccaccctcgtgaccacctgacctacggcgtgcagtgtttagccg
ctaccccgaccacatgaagcagcagcacttctcaagtccgcatgccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttc
ttcaaggacgacggcaactacaagaccgcgcccagggtgaagttcgagggcgacaccctgggtgaaccgcatcgagc
tgaagggcatcgactcaaggaggacggcaacatctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgt
ctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaagggtgaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagc
gtgcagctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgtgcccgacaaccactacct
gagcaccagtcgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggctctgtgagttcgtgaccgccc
ccgggatcactctcgcatggacgagctgtacaagtaaagcgccctagatcaagcttatcgataatcaacctctggatt
acaaaatttgtaaagattgactgggtattcttaactatgttgccttttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgatcat
gctattgcttcccgatggcttcttctccttctgataaatcctgggtgtgtctctttatgaggagttgtggccggtgtcagg
caacgtggcggtgtgactgtgttgcagcgaacccccactgggtggggcattgccaccacctgtcagctccttccg
ggactttgccttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttgcctgctggacaggggctcggt
gttgggactgacaattccgtggtgtgtcggggaaatcatcgcttcttgggtgtcgcctgtgtgccacctggattctg
cgcgggacgtccttctgctacgtccctcgccctcaatccagcggaccttcttcccgcgccctgctgccggctctgcggc
ctcttccgcttctgccttgcctcagacgagtcggatctcccttggggccgctccccgcatcgataccgtcgactcgct

gatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgtgtttgccccccccgtgccttcctgaccctggaaggtgcc
ctccactgtccttcttaataaaatgaggaaattgcatcgcatgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtggggtg
ggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggtctatggcttctgag
gcggaagaaccagctggggctcgactag**agcatggctacgtagataagtagcatggcgggttaatcattaacta**
caaggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgacc
aaaggtcgcgcgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagcttttgca
aaagcctagcgctccaaaaagcctcctcactacttctggaatagctcagaggccgaggcggtcggccttgcataa
ataaaaaaattagtcagccatggggcggaatggcggaactgggagggttagggcgggatgggagggtta
ggggcgggactatggttctgactaattgagatgcatgcttgcatacttctgctgctggggagcctgggacttccaca
cctggttctgactaattgagatgcatgcttgcatacttctgctgctggggagcctgggacttccacacctaactgac
acacattccacagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggttgcgtattggcgctctccgcttctc
gtcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggaatacggttatccac
agaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggcc
gcgttctggcgttttccataggtcgcgcctcctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaa
acccgacaggactataaagataccaggcggttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgacctgcccgtta
ccggatacctgtccgcttctccctcgggaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggttaggt
cgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagccccaccgctgcgccttatccggtaactatcgtctgag
tccaacccggaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggc
ggtgctacagagtcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggatctgcgctctgctaagc
cagttaccttcgaaaaagagttggtagctctgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttgttgcaag
cagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttctacggggtgacgctcagtggaacga
aaactcacgttaagggatttggatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatcctttaaattaaaaatgaagtttaa
atcaatctaaagtatatatgagtaaacttggctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtct
attcgttcatccatagttgctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggttaccatctggccccagtgctg
caatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcg
cagaagtgtcctgcaactttatccgctccatccagctattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttcgccagtta
atagttgcgcaacgttgttgcattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgttggtaggttctcattcagctccggtcc
caacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgcaga
agtaagttggccgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttc
tgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgccggcgctcaatacg
ggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcattgaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaagg
atcttaccgctgttgagatccagttcgatgaaccactcgtgcacccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcggttc
tggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacaggaagtgtgaatactcat
actcttccttttcaatattatgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataa
caaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctat

aaaaataggcgatcacgaggcccttcgtctcgcggttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctccc
 ggagacgggtcacagctgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcggtcagcggtgttgccg
 ggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgaccattcgacgctctcccttatgcgact
 cctgcattaggaagcagcccagtagtaggtgaggccgtgagcaccgccgccaaggaatggtgcatgcaaggag
 atggcgcccaacagtccccggccacggggcctgccaccataccacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaagt
 ggcgagcccgatcttcccatcgggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccgg
 ccacgatgcgtccggcgtagaggatctggctagcgatgaccctgctgattggttcgctgaccattccgggtgctgggacg
 gcgttaccagaaactcagaaggttcgtccaacaaaccgactctgacggcagtttacgagagagatgatagggtctgct
 tcagtaagccagatgtacacaattaggctgtacatattgtcgttagaacgcggctacaattaatacataaccttatgtatc
 atacacatacgatttaggtgacactatagaatacacggaattaattc

Negrita = secuencia ITR

Cursiva = promotor de Mpz

Subrayado = EGFP

Subrayado en cursiva = secuencia WPRE

SEQ ID NO. 2: Construcción AAV-Mpz.GJB1

tagctg*cgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccggg***cgctg***ggcgac***cttgg***tcgccc*
ggcctc*agtgagcgagcgagcgcgagagaggagtg***gccaactccatc***actaggggttcctgtag***ttaa**
gatta*acccg***ccatg***ctacttatctacgtagccatg***ctctag***gtacccctcgaagcttcctgttcagactcgttcctgct*
gtaccccttcaatgccccacatcaaatcaaacacagatggcacatatctactctaaatatatgcagagcttcacaaacgt
catacacgtacgtgtgtcacacacgcacacacacacccctccacctctgcccttaccttgcgtgtcccatctagacattatcc
ctcccatccccttatttcccttatcaaaatgggtgctccttcaagggttcaaataacactgcttcctggacctgactcctcttctc
ctgaacttcctgtgttaagtgattcctagtgactgtgccttggtagtggtgagattgccctctgcttctccctctgctcctcat
ctagtgatcttgagctttagaaagaactgaattaccattctaatacgagcattctcgaactctccaaatagccaccaagca
ggacaataggcagcttgatcatttaaactgtgcatggcaaaaggaatcgaaggatttctaacagaagtggggggg
gggagatctgggcttctcctggaagttcctgatagagaaaatcttctgcctgggtagaatctccaggatgcaggagat
ggaaaaagtggtcccaaggactttagtctacaggtgtggagccatcggaacaacgagacaccctaattgggagtg
ctctgaaagaaacttgcccttagggcctagggctctcaggcaaggaggctaagaaggaatccttgcgttagcctttgga
tttaggttctcagcttatctatccctcagagaagtgtgtctatgtcccttctgtccctctgcctcaccaccccaacattcca
acctagggtagggggaggtcagtatacacaagccctctgtgaaggggtggtatgtgtcccccacccccctaccag
agtatacaatgcccttctgctccatgccctgccaccctcccaccacctctcaattgcacatgccagggtgcaattggtca
ctggctcaggacagccccctcatgctgggatccaggggatttaagcaggttcagaaaacaccactcagttcctgtcc
cccgtctctccaccacacagacgctctgccaagcttcgagaatgaggcaggatgaactggacaggtttgtacaccttgc
tcagtggcgtaaccggcattctactgccattgcccagtatggctctcggtcatcttcatcttcagaatcatggtgctggtgg

tggctgcagagagtgtgtggggtgatgagaaatcttcctcatctgcaacacactccagcctggctgcaacagcggttgcta
tgaccaattcttccccatctcccatgtgcggctgtggtccctgcagctcatcctagttccaccccagctctcctcgtggccat
gcacgtggctcaccagcaacacatagagaagaaaaatgctacggcttgagggccatggggaccccctacacctggag
gaggtgaagaggcacaagggtccacatctcagggacactgtggtggacctatgtcatcagcgtggtgttccggctgtgttt
gaggccgtcttcatgtatgtctttatctgctctaccctggctatgccatgggtgcggctgggtcaagtgcgacgtctacccctgcc
ccaacacagtggactgctcgtgtcccgccccaccgagaaaaaccgtcttcaccgtcttcatgctagctgcctctggcatctg
catcatcctcaatgtggccgaggtggtgtacctcatcatccgggcctgtgcccgccgagcccagcgccgctccaatccac
cttcccgaagggctcgggcttcggccaccgcctctcacctgaatacaagcagaatgagatcaacaagctgctgagtga
gcaggatggctccctgaaagacatactgcgccgagccctggcacccgggctgggctggctgaaaagagcgaccgc
tgctcggcctgctgaggatccctcgaggtcgacggtatcgataagcttatcgataatcaacctctggattacaaaatttgtg
aaagattgactggtattcttaactatgttgccttttacgctatgtggatacgcgtcttaatgcctttgtatcatgctattgcttc
cgataggctttcattttctcctcctgtataaatcctggttgcctctttatgaggagtgtggtggccgttgcaggcaacgtggcg
tgtgtgcactgtgttgcgtgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgcttt
ccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttcccgcgtgctggacaggggctcggctgttgggactg
acaattccgtggtgttgcggggaaatcatcgtcctttccttggtgctcgccctgtgttgcacctggattctgcgcgggacgt
ccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcgagccttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggccttccgcgt
cttcgccttcgccctcagacgagtcggatctcctttggggccgcctccccgcacgcataccgtcgactcgctgatcagctc
gactgtgccttctagttgccagccatctgtgttggccctccccgcctccttgaccctggaaggtgccactccactgtc
ctttcctaataaaaatgaggaaattgcacgcattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtggggtggggcaggaca
gcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggctctatggcttctgaggcggaaaga
accagctggggctcgactagagcatggctacgtagataagtagcatggcggggttaatacctaactacaaggaacc
cctagtgtaggagtggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgc
ccgacgcccgggctttgccgggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagccttttgcaaaagcctagg
cctcaaaaaaagcctcctcactactctggaatagctcagaggccgaggcgccctcgccctctgcataataaaaaaa
attagtcagccatggggcggagaatgggcggaactgggcggagttagggcgggatgggcggagttagggcgggga
ctatggtgctgactaattgagatgcatgctttgcatactctgcctgctggggagcctggggactttccacacctggttctga
ctaattgagatgcatgctttgcatactctgcctgctggggagcctggggactttccacaccctaactgacacacattccaca
gctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggttgcgtattgggcgctcttcgcttctcgtcactgactc
gctgcgctcggctcgttcggctgcggcgagcggatcagctcactcaaaggcggttaatacggttatccacagaatcaggg
gataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgtgtggc
gttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgtcaagtcagaggtggcgaaacccgacagg
actataaagataccaggcggttccccctggaagctccctcgtgcgctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgt
ccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctcaa
gctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggt
aagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacag

agttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatgttgatctgcgctctgctgaagccagttaccttc
 ggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaacaaccacccgctggtagcgggtggtttttgtttgcaagcagcagatta
 cgcgagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggctgacgctcagtggaacgaaaactcacgt
 taagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaattaaaaatgaagtttaaatcaatctaaa
 gtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatacagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcac
 catagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctgccccagtgctgcaatgatacc
 gcgagacccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgagcagaagtggt
 cctgcaactttatccgctccatccagctctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagttgctc
 aacgttggtgaccttgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatca
 aggcgagttacatgatcccccattgtgtgcaaaaaagcggtagctccttcggtcctccgatcgtgtgcagaagtaagttgg
 ccgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctctactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggt
 gagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtagcggcgaccgagttgctcttggccggtcaatacgggataatacc
 gcgccacatagcagaactttaaagtgctcatcattgaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctg
 ttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatctttactttaccagcgtttctgggtgagca
 aaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgataactcatactcttcttttc
 aatattattgaagcatttatcaggggtattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataaacaatatggg
 ttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaaataggc
 gtatcacgaggcccttctgtctcgcggttccggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgagacggtc
 acagcttgctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcggtcagcgggtgttgcggtgtcggtg
 ctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgaccattcgacgctctcccttatgcgactctgcattag
 gaagcagcccagtagtaggtgagggcgttgagcaccgcccgcgaaggaatggtgatgcaaggagatggcgccc
 aacagtccccggccacggggcctgccaccataccacgcccgaacaagcgtcatgagcccgaagtggcgagcc
 cgatcttccccatcgggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgc
 gtccggcgtagaggatctggctagcgtgacacctgctgattggttcgctgaccatttccgggtcggggacggcggttaccag
 aaactcagaagggtcgtccaaccaaaccgactctgacggcagtttacgagagagatgatagggtctgcttcagtaagcc
 agatgtacacaattaggctgtacatattgtcgttagaacgggctacaattaatacataaccttatgtatcacacatac
 gatttaggtgacactatagaatacacggaattaattc

Negrita = secuencia ITR

Cursiva = promotor de Mpz

Subrayado = Cx32

Subrayado en cursiva = secuencia WPRE

SEQ ID NO. 3: Construcción AAV-miniMpz.Egfp

tagctgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccggcgctgggacgacctttggtcgccc
ggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtgggcaactccatcactaggggttcctttagttaat
gattaacccgccatgctacttatctacgtagccatgctctaggtaccgctctcagggaaggaggctaagaaggaatc
ctttgctgtagccttttgatttaggttctcagcttatctatccctcagagaagtgtgtctatgtccctttctgcccctgcctcac
cccaccccaacattccaacctagggtaggggaggtcagtatacacaaagccctctgtgtaaggggtggtatgtgtccc
cccacccccctaccagagtatacaatgccccttctgctccatgcccctgccaccctcccaccaccttcaattgcacatg
ccaggctgcaattggtcactggctcaggacagccccctcatgctgggatccaggggatttaagcaggttcagaaaa
caccactcagttccttgtccccgctctctccacccacagacgctctgccaaccggtcgccaccatggtgagcaagggc
gaggagctgttcaccgggggtgtgcccacctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtcc
ggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgcc
ctggcccacctctgtgaccacctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgtaccccgaccacatgaagcagcacga
cttctcaagtcgcatgcccgaaggctacgtccaggagcgacccatcttctcaaggacgacggcaactacaagacc
cgcgccgaggtgaagttcgagggcgacacctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttaaggaggacg
gcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaa
cggcatcaaggtgaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcag
aacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccacaaccactacctgagcaccagtcgcccctgagcaaaq
accccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgcccggggatcactctcggcatggacgagc
tgtacaagtaaagcgccctagatcaagcttatcgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattc
ttaactatgttgccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttccgctatggcttcattttcc
tcctgtataaatcctggttgcgtctctttatgaggagttgtggccggtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgttgc
gacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccac
ggcggaactcatcgccgctgccttgcgcgtgctggacaggggctcggtgttgggactgacaattccgtggtgtgtc
ggggaaatcatcgctctttccttggctgctgcctgtgttgcacctggattctgcgaggacgtccttctgtacgtcccttcg
gccctcaatccagcggaccttcttcccgccgctgctgcccgtctgcccgtcttccgcttctgccttgcacctcaga
cgagtggatctcccttggggccctccccgcacgataccgtcgactcgctgatcagcctcgactgtgcctttagttgcc
agccatctgttgttgcctccccctgcctccttgacctggaaggtgccactccactgtccttcttaataaaatgagg
aaattgcacgcattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgg
gaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggctctatggcttctgaggcgaaagaaccagctggggctcgact
agagcatgggtacgtagataagtagcatggcggttaataactacaaggaacccctagtgatggagttgg
ccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaaggtcgcccgacgcccgggctttg
cccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagcttttgcaaaagcctaggcctccaaaaaagcctcctc
actacttctggaatagctcagaggccgaggcgccctcgccctctgcataaataaaaaaattagtcagccatggggcg
gagaatgggcggaactgggagggttagggcgggatgggagggttagggcgggactatggttgcgtactaattg
agatgcatgcttgcatacttctgctgctggggagcctggggacttccacacctggttgcgtgactaattgagatgcatgctt
gcatacttctgctgctggggagcctggggacttccacaccttaactgacacacattccacagctgcattaatgaatcgg

ccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctctccgcttctcgctcactgactcgctgcgctcggtcggtcgg
ctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtataacaggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaa
catgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccggttgctggcggttttccatagggtccgccc
ccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcg
ttccccctggaagctccctcgctcctctcgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgccttttcccttcgggaa
gcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgctccaagctgggctgtgtgcacgaa
cccccggtcagccgaccgctgcgccttatccggttaactatcgctttagtccaacccggttaagacacgacttatcgcca
ctggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtgtacagagttctgaagtgggtgccta
actacggctacactagaagaacagttttggatctgcgctcgtcgaagccagttaccttcggaaaaaagagttggtagct
cttgatccggcaaaacaaaccaccgctggtagcgggtggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaagga
tctcaagaagatcctttgatcttttacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgag
attatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaataaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatagtaaacttg
tctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgt
cgtgtagataactacgatacgggaggggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccg
gctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgcctcca
tccagctctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgcattgctacag
gcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttattcagctccgggttccaacgatcaaggcgagttacatgatcccc
atgttgtcaaaaaagcggtagctccttcggtcctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgcagtggtatcactcatggtt
atggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattct
gagaatagtgtatcgggcgaccgagttgctcttgcggcgctcaatacgggataataccgcgccacatagcagaacttta
aaagtgtcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaac
ccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttaccagcggttctgggtgagcaaaaaacaggaaggcaaaatg
ccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcttttcaatattattgaagcatttatcag
ggtattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaataggggttccgcgcacatttcccgaa
aagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgatcacgaggcccttctgtct
cgcgcttccggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgagacggtcacagctgtctgtaagcggatg
ccgggagcagacaagccgctcagggcgctcagcgggtgttggcgggtgtcgggctggcttaactatgcggcatcag
agcagattgtactgagagtgacacattcgacgctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggtg
aggccgttgagcaccgcccgcgaaggaatgggtgatgcaaggagatggcgcccaacagtccccggccacgggg
cctgccaccataccacgcggaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttcccatcggtgatgtcg
gcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagaggatctggct
agcgatgacctgctgattggttcgctgaccttccgggtgcgggacggcggtaccagaaaactcagaaggttcgtcaa
ccaaaccgactctgacggcagtttacgagagagatgatagggtctgcttcagtaagccagatgtacacaattaggcttg
tacatattgtcgttagaacgcggctacaattaatacataacctatgtatcacacatacgatttaggtgacactatagaata
cacggaattaattc

Subrayado en cursiva = secuencia WPRE

cctgttcagactcgtttcctgctgtaccctttcaatggccccacatcaaatacaacacagatggcacatatctactctaaatat
atgcagagcttcacaaacgtcatacagctacgtgtgtcacacacgcacacacacaccctccacctctgcccttacctttg
ctgtcccatctagacattatccctcccatcccctatttcccttatcaaaatggctgctcctcaagggtccaaataacactgctt
cctggacctgactcctcttctcctgaacttcctgtgttaagtgtattcctagtgcactgtgccttggtagttgttgagattgccctc
tgcttctccctctgcctcctcatctagtgtcttgagctttagaagaagaactgaattaccattctaatacagagcatttctgaact
ctccaaatagccaccaagcaggacaataggcagctcttgatcatttaactgctgcatggcaaaaggaatcgaaggattt
cttaacagaagtgggggggggggagatctgggcttctcctggaagttcctgatagagaaaaattctgcctgggtagaa
tctcccaggatgcagggagatggaaaaagtgttcccaaggactttgtagtctacaggttgaggagccatcggaacaac
gagacaccctaatttgggagtgctctgaaagaaacttgcccttaggccctagggtctcagggaaggaggctaagaag
gaatcctttgctgtagccttttggatttaggtttctcagcttatctatccctcagagaagtgtgtctatgtcccttttctgtccctctgc
ctcaccaccaccaacattccaacctagggtagggggagggtcagtatacacaagccctctgtgtaaggggtggtatgt
gtccccccacccccctaccagagtatacaatgcccttctgctccatgccctgccacctcccaccacctctcaattgc
acatgccaggctgcaattggtcactggctcaggacagccccctcatgctggggatccaggggattttaagcaggttcag
aaaacaccactcagttccttctccccgcctctctccacccacagacgctctgcc

gctctcaggcaaggaggctaagaaggaatccttgtctgtagcctttggattaggtttctcagcttatctatccctcagagaa
gtgtgtctatgtcccttttctgtccctctgcctacccccacccaacattccaacctagggtagggggagggtcagtatacaca
aagccctctgtgtaaggggtggtatgtgtccccccacccccctaccagagtatacaatgccccttctgtccatgcccctg
ccacctcccaccacctctcaattgcacatgccagggtgcaattggctactgggtcaggacagccccctcatgctgggga
tccagggggattttaagcaggttcagaaaaacaccactcagttccttgtccccgcctctctccacccacagacgctctgcc

atgaactggacaggtttgtacaccttgctcagtggcgtgaaccggcatttactgccattggccgagtatggctctcggtcat
cttcatcttcagaatcatggtgctggtggtggctgcagagagtgtgtggggtgatgagaaatcttctcatctgcaacacac
tccagcctggctgcaacagcgtttgctatgaccaattcttccccatctcccatgtgcggctgtggtccctgcagctcatcctag
ttccaccccagctctcctcgtggccatgcacgtggctcaccagcaacacatagagaagaaaatgctacggcttgaggg
ccatggggaccccctacacctggaggaggtgaagaggcacaaggctccacatctcagggacactgtggtggacctatgt
catcagcgtggtgttccggctgttgtttgagggcgtcttcatgtatgtctttatctgctctaccctggctatgccatggtgcggct

gggtcaagtgcgacgtctacccctgccccaacacagtggactgcttcgtgtccgccccaccgagaaaaccgtcttcacc
gtcttcattgtagtgcctctggcatctgcatcatctcaatgtggccgaggtgggtacatcatccgggctgtgccc
ccgagcccagcgccgtccaatccacctcccgaagggtcggtcgccaccgcctctcacctgaatacaagca
gaatgagatcaacaagctgctgagtgcaggtggctccctgaaagacatactgcgcgcagccctggcaccgggg
ctgggtgggtgaaaagagcgaccgtgctcgccctgctga

**SEQ ID NO. 7: Dominio SH3 y repeticiones tetratricopeptídicas 2 (SH3TC2):
GenBank: BC114486.1**

atgggtgggtgcttctgcatccccagggagcggagtctgacccggggccaggtaaagaaactcctccaagg
atccaactgtatcgagtgcgtatagcctcatctgaatacaaggaaaaatgtttctgccacagaacattaatccagacct
gacactctccttctgtgtaaagagccgctccaggaggtgtgaaatggacccctacaggaagctgctcgaggcggtct
gggcactggagaatgaggaccaggaggtgcgcatgctgttaaggacctctcagcaaggttggtcagtatccagtctca
gagggcccagtttctcatcacctcaagaccatggaggaaatctggaagttctccacctacctaattagaacatctcctct
ttgaccacaagtactggctcaactgcatattgggtggaggatacagagatccaagtgtctgtagatgataaacacctggaa
acaataacctgggactcctgatacaggaaggccacttctctgcagagccctgtgtccgtgactccaccagccgagaa
ggaaggggaatgcttgacactttgcaagaatgagtaatctcagtgaagatggcagaagctggctccgagttggaaggc
gtgtcttggtagcaggtcagcggggcctggtactggtgtcagcctggagcctctgcctctcccttccaccagtgttcta
aagaattatccaggaagctgtggccttccaggaagagggttgacaggtcctatcagattggcagaggacgctgta
aggccttgacgggttatgagccaggagaaaaggatgaactgaatttctaccaggagaaaagcattgagatcatcggtt
tgtcatacctgggcttcagtgttcattgaaagtcgacaagttcaggacaagtgggcttctccccaccaggaacataga
tcctgattcttattcccaatgagcaggaactctgccttctcagtgtgaggagagatgctccctgttggccctgggaagt
ataagcagactgagtgtccagcttctccacactctgtctgcactgacatcacatctgtctaccggctcagtgggttgaat
ccatccagaatcctccaaatgatctgagtgcacccagcctgaaggctcaaggaggtcaggcctggcagagcctggg
aggagcatcaggccgtgggtccagacagtcagcagctctgaggactccagcctggaggaggagctcctctcgcc
acctcagacagctatcgctgccggagcctgatgacctgatgacccggaactgctcatggacctaagcactggtcagg
aggaggaggctgagaactcgccccatattggcttttctggatcatgagggttatgctgaccacttaagagtctctatgac
ttctccttcttctcacttctcctttatagcttctctgaggaggatgagttgtggcctacctggaggcatcaagaaagtgg
gccaagaagagccacatgacctgggcccctgcccggctctgcttctcctgggcccggctgagcatcaggaaggtaaaa
ctctctcaggccagggtgtacttcgaggaggccatccacattctcaatggagcatttgaggacctatccttgggtggccactc
tgtacatcaatttgggtgccatctacctgaaacagaggctgagacataaaggctccgcccgttggaaaaggcagggtgcc
ctgtggcctgctgctgacctgagcttagtgccaagcatgaactcgacgtggtggcctacgtgctgcgccaggggat
tgtggtgggcagcagcccgtggaggccagggcctgcttctggccatccgcttgcctgagcctaggccggcacgag
gaggtcctgccccttgcgagcgccctgcagctcctctctggacacctcctgcctctgagggtgtggccagtgtttgagttt
ctgtatgacaagaaatatctccacacctgcagtggcctctgtccagcaacatggatccagagtgcccaagggtgtct
cttctatttggcagggtccacctgtcctccagaacacaaccaagctccttggcttcttccccaggctgggggtgaagttct

gccttgccctgccaatgctcagacaggccctggctgctgtgaggaactagcagaccggagcaccagagggccct
gtgtctcatcctttccaaagtgtacctcgagcacagggtctctgacggtgccatccactacctgagccaggccttggtgcta
gggcagctgctgggtgagcaggaatcctttgagtcttctctgctgctggcatgggcctatctcttagccagccaggccaag
aaggctttggatgtgcttgagccactgctatgctccctgaaggagacagagagtctcactcaaaggggagtcactataa
cctcctgggacttgactccaaggtgaaggccgggtgaacaggggcagccaagagctatcttcgggccttgaacagagc
ccaggaggtgggagatgtgcataaccaggcagtggtatggccaatcttgccacctgagccttaagtctgggctcag
catccagccagaaactatctctgagggctgtacgactctattgtgaacttcaggccagtaaggagacagacatggaatt
agtacagggtttctctggttgcccaagttctggtgtctggacaccagctgacctatggccttcttgttatgaaatggcattg
ctgtttggcctaaggcatcgacatctaaagagtcagcttcaggccaccaaatccctctgccatttctacagctctgtgtcccc
aaacctgaggcatgcatcacctacctagcactggctggccctggctcagcaactcagggaccgggagatggaag
ggaggctgctggagtccctggggcagctttatcggaacctaaataaccgccaggctccctcaggaggtcactcacatgcat
caaggagagcctgcgtatcttcattgacctgggggagacagacaaggctgctgaggcctggcttggggcggggcgact
ccactacctatgcaggaagacgagctggtggagctgtgcctgcaggcagccatccagacagccctgaagtgcagagg
agcctttgctggctctcaaactttatgaagaagcagggtgatgtgttctcaatgggacccgccacaggcatcatgcagtgg
agtactaccgagctggagctgttcttttagcaaggaggtgaaggcgggtgagaactgagctccggattttcaataagctga
cagagctgcagattagcctcgaaggctatgagaaggctttggaatttgcaccctggccgccaggctcagcacagtcac
aggagatcagaggcaagagctggtggcctttcaccgcctggctacagtgtactactccctgcacatgtatgagatggctg
aggactgtacctgaagacctgtccctctgtccacctggctgcagagtccaaggaggccctgtactatgccaagggtg
tattatgcctgggagactcacctctgccagctgaaggatgccatgatgccactgagtacttcttctggccctggcag
cagcggctcctgctgggtgatgaggagcttcaggacaccattaggagcaggctggacaacatctgccagagccccctgt
ggcacagcaggccctccgggtgctcctcagagagggcgcggtggctgagtgggtggcctggccctctga

SEQ ID NO. 8: Proteína 22 de mielina periférica (PMP22): Secuencia de referencia NCBI: NM_000304.4

agttacaggagcaccaccagggaacatctcggggagcctggttgaagctgcaggcttagtctgtcggctgcgggtct
ctgactgccctgtggggagggtctgccttaacatcccttcatttggctgcaaagaaatctgcttgaagaaggggttacg
ctgtttggccgggcagaaactccgctgagcagaactgccgccagaatgctcctctgttctgagtatcatcgtcctccac
gtcgcggtgctggtgctgctgttctgtctccacgatcgtcagccaatggatcgtgggcaatggacacgcaactgatctctgg
cagaactgtagcacctcttctcaggaaatgtccaccactgtttctcatcatcaccaaacgaatggctgcagtctgtccagg
ccaccatgatcctgtcgatcatcttcagcattctgtctctgttcttcttccaaactcttcacctcaccaaggggggag
gttttacatcactggaatcttccaaattctgtggtctgtgcgtgatgagtgctgcggccatctacacggtgaggcaccggg
agtggcatctcaactcggattactcctacggttctgcctacatcctggcctgggtggccttccccctggcccttctcagcgggtg
tcattatgtgatcttgcggaaacgcgaatgaggcgcccagacgggtctgtctgaggctctgagcgtagataggggaaggg
aggaagggaaaacagaaagcagacaaagaaaaaagagctagcccaaatcccaactcaaaccaaaccaaac
agaaagcagtgagggtgggggtgctgttgattgaagatgtatataatatctccggtttataaaacctattataacacttttta

catatatgtacatagattgtttgcttttatgttgaccatcagcctcgtgtgagccttaaagaagtagctaaggaactttacatc
 ctaacagtataatccagctcagatattttgtttgtttttgtttgtttgttttaccagaaataagataactccatctcgccctt
 ccctttcatctgaaagaagatacctccctcccagtcacctcatttagaaaaccaagtggtgtagaaaccccaaatgtc
 caaaagcccttttctggtgggtgacccagtgcatccaacagaaacagccgctgcccgaacctctgtgtgaagctttacgc
 gcacacggacaaaatgccaaactggagcccttgcaaaaacacggcttggtgattggcatacttgcccttacaggtgg
 agtatcttcgtcacacatctaaatgagaaatcagtgacaacaagtcttgaaatggtgctatggattaccattccttattatca
 ctaatcatctaaacaactcactggaaatccaattaacaattttacaacataagatagaatggagacctgaataattctgtgt
 aatataaatggtttataactgctttgtacctagctaggctgctattactataatgagtaaatcataaagccttcactcc
 cacatttttctacggctcggagcatcagaacaagcgtctagactcctgggaccgtgagttcctagagcttggtgggtctag
 gctgttctgtgcctccaaggactgtctggaatgactgtattggccaccaactgtagatgtatataggtgccctctgatgct
 aagactccagacctttgtttgtcttgcatcttctgattttataccaactgtgtggactaagatgcattaaaataaacatcagag
 taactca

SEQ ID NO. 9: Proteína cero de mielina (MPZ): GenBank: AK313555.1

agttctcgtgccccactttctcaacccacagatgtccggggccctgccccagctatggctcctggggctccct
 catccagccccagccctatcctggctgtgctgtcttctcttcttgggtgctgtccccggccagggccatcgtggtttacaccg
 acagggaggtccatggtgctgtgggtcctccgggtgacctgactgctccttctggtccagtgagtggtctcagatgaca
 tctccttcacctggcgctaccagcccgaagggggcagagatgccatttcgatcttccactatgccaagggacaaccctac
 attgacgaggtggggaccttcaaagagcgcacccagtggttaggggacctcgctggaaggatggctccattgtcatac
 acaacctagactacagtgacaatggcacgttcactgtgacgtcaaaaaccctccagacatagtgggcaagaccttca
 ggtcacgctgtatgtctttgaaaaagtgccaactaggtacggggtcggtctgggagctgtgatcgggggtgtcctcgggggtg
 gtgctgtgtgctgtgctgtctttctacgtggttcggtactgctggctacgcaggcaggcgccctgcagaggaggctcagtg
 ctatggagaaggggaaattgcacaagccaggaaaggacgcgtcgaagcgggcgccagacccagtgctgtatg
 caatgtggaaccacagcagaagcaccaaagctgctagtgagaagaaggccaaggggctgggggagtgctcgcaagg
 ataagaaatag

SEQ ID NO. 10: Respuesta de crecimiento temprano 2 (EGR2): Secuencia de referencia de NCBI: NM_000399.5

aactgagcgaggagcaattgattaatagctcggcgaggggactcactgactgttataataacactacaccagcaactcc
 tggcttcccagcagccggaacacagacaggagagagtcagtggaatagacattttctatttctaaaaaacagcaa
 ctgtttgtacttttatttctgttgatttttttcttggtgtgtggtggtgttttaagtgtggagggcaaaaggagataccatccc
 aggctcagttcaacccctctccaaaacggctttctgacactccaggtagcgagggagttgggtctccaggtgtgcgag
 gagcaaatgatgaccgccaaggccgtagacaaaatcccagtaactctcagtggtttgtgcaccagctgtctgacaacat
 ctacccggtggaggacctcgcggccacgtcggtgaccatcttcccaatgccgaactgggagggccctttgaccagatg
 aacggagtgccggagatggcatgatcaacattgacatgactggagagaagaggtcggttgatctcccatatcccagc

agctttgctcccgctctctgcacctagaaaccagaccttcacttacatgggcaagttctccattgacacctcagtacacctggtgc
 cagctgctaccagaaggcataatcaatattgtgagtgaggcatcttgcaaggggtcacttccccagcttcaaccacag
 cctcatccagcgtcacctctgcctccccaaccactggccacaggacccctgggtgtgtgcacatgtcccagaccca
 gcctgacctggaccacctgtactctccgccaccgcctcctccttattctggctgtgcaggagacctctaccaggacctt
 ctgcttctgtcagcagccaccacctccaccttctctctggcctaccaccacctccttctatccatccccaagcca
 gccacggacccaggtctcttccaatgatcccagactatcctggattcttccatctcagtgccagagagacctacatggtg
 cagctggcccagaccgtaagcccttccctgccactggacacctgcggtgccccctccactcactccactctctaca
 atccgtaactttaccctggggggccccagtgctgggtgaccggaccagggggccagtgaggagcagcaggggacccc
 ggctgctggttagcagctcagcagcagcagcagccgcccgcgcgcctataaccacaccacctgccactgcg
 gccattctgaggcctcgcaagtacccaacagacccagcaagacgcccgtgcacgagaggccctaccctgcccc
 gcagaaggctgcgaccggcggttctcccgctctgacgagctgacacggcacatccgaatccacactgggcataagcc
 ctccagtgctggatctgcatgcgaacttcagccgcagtgaccacctcaccacccatccgcacccacaccggtag
 aagcccttcgcctgtgactactgtggccgaaagttgcccggagtgtgagaggaagcgccacaccaagatccacctg
 agacagaaagagcggaaaagcagtgccccctctgcatcggtgccagccccctctacagcctcctgctctgggggctg
 cagcctgggggtaccctgtgcagcagtaacagcagcagctctggcgaggggcgctcgcccctgtcctctcggaccc
 ggacacctgagatgagactcagggtgataccagctcccaaagggtcccggaggcccttgtccactggagctgcaca
 aaaaacactaccaccttctgtcctctctccttctgtgggcaaagggccttgggtgagctagcactgcccccttccacc
 tagaagcaggttcttctaaaacttagccattctagtctctcttaggtgagttgactatcaacccaaggcaaaggggagg
 ctgagaaggagggtgtgtgggacccctggccaagagggtgaggtctgacctgtttaaaggggtgtttgactagggttt
 gctacccacttcccctattttgacctatcacagggtttgacctggatgtcagagttgatctaagacgttttctacaatagg
 tgggagatgctgacccctcaagtggggacagcaaaaagacaagcaaaaactgatgtgcactttatggcttgggactgatt
 tgggggacattgtacagtgagtgaaagtatagccttatgccacactctgtggccctaaaatggtgaatcagagcatactag
 ttgtctaacccctgaagcaatatgtattataaactcagagaacagaagtgaatgtgatgggaggaacatagcaatatct
 gctcctttcagagttgttgagaaatgtaggctatttttcagtgatatccactcagattttgtgtattttgatgtacactgttctta
 aattctgaatcttgggaaaaaatgtaaagcatttatgatctcagaggtaactatttaagggggatgtacatatattctctga
 aactaggatgcatgcaattgtgtggaagtgtccttggcctgtgtgatgtagacaatgtacaaggctctgcatgtaaagg
 gttgccttattatggagaaaaaaatcactccctgagtttagtatggctgtatattctgcctattaatatttgaatttttttagaa
 agtatattttgtatgctttgtttgtgactaaaaggtgtacctttagtcaaatcagataagaatgtacataatgtaccgga
 gctgattgttggcttagctcttaatagttgtgaaaaaataaatctattctaacgcaaaaccactaactgaagttcagata
 atggatgggttgtgactatagtgtaaataaatacttttcaacaata

SEQ ID NO. 11: Proteína 1 asociada con la diferenciación inducida por gangliósidos (GDAP1): Secuencia de referencia NCBI: NM_018972.3

atggctgagaggcaggaagagcagagagggagccccccctgagggcggaaggcaaggccgacgcggagggttaa
 gctcattctgtaccattggacgcattccttcagctctcaaaagggtgcgcttggaattgctgaaaaggcattgaagtgcgag

gaacatgatgtaagtctgcccttgagtgagcacaatgagccttggttatgctgttgaaactcaactggagaagtgcctgtcct
 tatccacggggaaaacataattgtgaggccactcagatcattgattatcttgaaacagactttcctggatgaaagaacacc
 caggttaatgcctgataaagaaagcatgtattaccacgggtacaacattaccgagagctgcttgactccttgccaatgg
 atgcctatacacatggctgcattttacatcctgagttaactgtggactccatgatcccggttatgcaactacaaggattcgta
 gccaaattggaacacagagctgagctgaagaaactgtgaagaaaaccagattacaagaagcatacattgcaa
 aacagaaacgacttaaatcaaagctgctgatcatgacaatgtcaagtattgaagaaaattctgatgagttggagaaag
 tcttgatcaggtgaaactgaattgcaaagaagaaatgaagaaacccagaagagggccagcaaccttggtctgcg
 gtgaatcctcaccctggcagacgtctcactcgtgtcacattgcatcgactgaagttcctggggttgcaaggagaaactg
 gggaaacggaaagcgaccaaacttgaaacctattacgagcgtgtctgaagagaaaaacatttaacaaggttttagg
 acatgtcaacaatatattaatctctgcagtgtgccaacagcattccgggtggccaagaaaagggcccaaaagtcttg
 gcacgacccttggttggttgctgcaggagtggtatatttgctttatgctttcagaaagaggctggcagcatgatatta
 gcatttagaccagaccaaattatttctag

SEQ ID NO. 12: regulado aguas abajo de N-Myc 1 (NDRG1): Secuencia de referencia NCBI: NM_001135242.1

atgtctcgggagatgcaggatgtagacctcgtgaggtgaagcctttggtggagaaaggggagaccatcacccggcctc
 ctgcaagagtttgatgtccaggagcaggacatcgagactttacatggctctgttcacgtcacgctgtgtggactcccaag
 ggaaaccggcctgtcatcctcacctaccatgacatcgcatgaaccacaaaacctgctacaaccccccttcaactacg
 aggacatgcaggagatcacccagcactttgccgtctgccacgtggacgccccctggccagcaggacggcgagcctcc
 tccccgcagggtacatgtacccctccatggatcagctggctgaaatgcttctggagtccttaacagtttgggtgaaaa
 gcattattggcatgggaacaggagcaggcgctacatcctaactcgatttgcttaacaacctgagatggtggaggg
 cctgtccttatcaacgtgaaccttgtgcggaaggctggatggactgggccctccaagatctcaggatggaccaag
 ctctgccggacatggtggtgtccaccttttgggaaggaagaaatgcagagtaacgtggaagtgtccacacctaccgc
 cagcacattgtgaatgacatgaacccggcaacctgcacctgttcatcaatgcctacaacagccggcgagcctggag
 attgagcgaccaatgccgggaacccacacagtcacctgcagtgccctgctctgttggtggttggggacagctgcctgc
 agtggatgccgtggtggagtgaactcaaaattggacccaacaaagaccactctcctcaagatggcggactgtggcgg
 cctcccgagatctccagccggccaagctcgtgaggtcctcaagtactctgtgcagggcatgggatacatgccctcg
 gctagcatgaccgcctgatgcggtcccgacagcctctggttcagcgtcacttctctggatggacccgcagccgctc
 ccacaccagcgagggcacccgaagccgtccacaccagcgagggcacccgcagccgctgcacaccagcgag
 ggggccacctggacatcaccccaactcgggtgctgtgggaacagcgccgggccaagtccatggaggtctcctg
 ctag

SEQ ID NO. 17: Construcción AAV-humano-Mpz-GJB1

tagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcccgggcaaagcccggcgctcgggagacctttggtcgccc
 ggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagggagtgccaactccatcactaggggttccttgtagttaat

gattaacccgccatgctacttatctacgtagccatgctctaggtaccgcctggcataaacttcatttattaaagtttattt
gtctttaatctctcatataacttagtcttctgatattgcagctgtgtgtgcccctctttgtactcccagcattttgttcattactaaa
ggaagtgcatggcttattatacttgattgttgatgggtttgtcctctgatcttcccatctccacctcccaaaccaaatttcaac
tccttgctggaaggacttaattttattcctctcttattacctgcattctcatactttacatattgctggcacttaatacaatttgtag
cctgaaataaattgaaatggacttaaacagcagcatgaagcactgaaggacttcttgacaaacggaaaggtcagggg
cttcttgccctggaaatagtcagtgagaaaaacttctgtctgggaagaatcgacaggatgaaggagggtgcgggga
aaaaaactcccataggacttggatctcaagaagtctgtaatgcagcccacattagaggagataacaggggatatcct
atcttcagagttctctgggggaaacctccctctagttcctagggctgtgaggcagcctctctcaggcaaggaggctgagga
gaaatccccttttatggccttaaatgaggttcatactatccctcagagaagtgtgtgtgtccctgtttttgcccctctccctc
accacccccacacattccagcctggggcagggggaggccagtggaacacaaagccctctgtgtatgggggtgtatgt
gtccccccacccctccaccagactatacaatgcccctctgtccctgcactctgccccctccccaccacctctcaactg
cacatgccaggctgcaattggttactggctgaggacagccccctcatgtggggccctaggggatttaagcaggtcca
ggaacccccgttcagttcctgggtccccactttctcaacccccacagatgtccggggccctgcccctgccccagcaccg
gtcgcggtatcctgaggcaggatgaactggacaggtttgtacaccttgcctcagtgccgtgaaccggcattctactgccattg
gccgagtatggctctcggtcatcttcatcttcagaatcatggtgctggtggtggtgcagagagtgtgtgggtgatgagaa
atcttcttcatctgcaacacactccagcctgggtgcaacagcgtttgctatgaccaattcttccccatctcccatgtgcggct
gtgttccctgcagctcatcctagttccaccccagctctcctctgtggccatgcacgtggctcaccagcaacacatagagaa
gaaaatgctacggctgagggccatggggaccccctacacctggaggaggtgaagaggcacaaggtccacatctcag
ggacactgtggtggacctatgtcatcagcgtggtgttccggctgtgtttgaggccgtcttcatgtatgtctttatctgcttacc
ctggctatgccatggtgcggctggtcaagtgcgacgtctacccctgccccaacacagtggactgcttctgttcccggccca
ccgagaaaaaccgtcttaccgtcttcatgtctagctgcctctggcatctgcacatcctcaatgtggccgagggtggtgtacctc
atcatccgggctgtgcccggcgagcccagcggcctccaatccaccttcccgaagggtcgggctcgggctcggccaccgc
ctctcacctgaatacaagcagaatgagatcaacaagctgctgagtgcagcaggatggctccctgaaagacatactgcgc
cgcagccctggcaccggggctgggctggctgaaaagagcgaccgctgctcggcctgctgactcgagatcgatatccat
cacactggcgccgcaagcttatcgataatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtattcttaactatgtt
gctccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggcttcattttctcctctgtata
aatcctggttgcctcttctttagaggagttgtggcccgttgcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaa
ccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcgga
ctcatcgccgctgccttggccgctgctggacaggggctcggctgttgggactgacaattccgtggtgtgtcggggaaa
tcatcgctccttcttggctgctgcctgtgttgcacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaa
tccagcggaccttcttcccgggctgctgcccgtctgcggcctcttccgcgtcttgccttcgcccctcagacgagtcgg
atctccccttggggcgcctccccgcacgataccgtcgactcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatct
gtgttttggccctccccgtgccttcttgaccctggaagggtgccactcccactgtccttcttaataaaatgaggaaattgca
tcgattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagaca
atagcaggcatgctggggatgcgggtgggctctatggcttctgaggcggaagaaccagctggggctcgactagagcat

ggctacgtagataagtagcatggcgggtaatcattaactacaaggaacccctagtgatggagttggccactcc
ctctctgcgcgctcgcctcactgaggccggcgaccaaaggctcgccgacgcccgggctttgcccggg
cggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagcttttgcaaaagcctaggcctccaaaaagcctcactacttc
tggaatagctcagaggccgaggcggcctcggcctctgcataataaaaaaattagtcagccatggggcggagaatg
ggcggaactgggaggagttagggcgggatggcgaggtagggcgggactatggttgctgactaattgagatgcat
gctttgcatacttctgctgctggggagcctggggactttccacacctggttgctgactaattgagatgcatgctttgcatactt
ctgctgctggggagcctggggactttccacaccttaactgacacacattccacagctgcattaatgaatcgccaacgc
gcggggagaggcgggttgctattggcgctcttccgcttctcgcctcactgactcgctcgctcggctgctcggtgcggc
gagcggatcagctcactcaaaggcggtaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtga
gcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaggccgcgttgctggcggttttccataggctccgccccctgac
gagcatcacaataatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcggttcccc
tggaagctccctcgctgcctctcgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgccttctccctcggaagcggtg
cgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgctccaagctgggctgtgtgcagaaaccccc
gttcagcccgaccgctgcgccttatccgtaactatcgcttgagtcgaacccgtaagacacgacttatcgccactggca
gcagccactggaacaggattagcagagcgaggtatgtaggggtgctacagagttctgaagtgtggcctaactacg
gctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctcgtggaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatc
cggcaaacaaaccaccgctggttagcgggtggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaa
gaagatccttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggaatttggcatgagattatca
aaaaggatcttcacntagatccttttaataaaaaatgaagtttaataatcaatctaaagtatatagtaaacttggtctgac
agttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgctggt
agataactacgatacgggaggggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctc
cagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggctcgaactttatccgcctccatcca
gtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgaacggtgttgccattgctacaggcat
cgtggtgtcacgctcgctgttggtatggcttattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggt
gtgcaaaaaagcggtagctcctcggctcctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgcagtggtatcactcatggttatgg
cagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgaga
atagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcggcgctcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaag
tgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgaaccact
cgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcggttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgca
aaaaagggaataaggggcgacacggaaatgtgaatactcactcttcttttcaatattatgaagcatttatcagggttat
tgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataaacaataaggggtccgcgcacattccccgaaaagtgc
cacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgatcacgaggcccttctgctcgcg
tttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgagacggtcacagctgtctgtaagcggatgccggga
gcagacaagcccgtagggcgctcagcgggtgttgccgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcag
attgtactgagagtgaccattcgacgctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggttagggcc

ccttgaaataaattgaaatggacttaaacagcagcatgaagcactgaaggacttcttgacaaacggaaaggtcagggg
cttcttgcttgaaatagtcagtgaggagaaaaacttctgtctgggaagaatcgacaggatgaagggaggtgcgggga
aaaaaactcccataggacttggtcatctcaagaagtctgtaatgcagcccacattagaggagataacaggggatatcct
atcttcagagttctctgggggaaacctccctctagttcctagggctgtgaggcagcctctctcaggcaaggaggtgagga
gaaatcccttttatggcctttaaattgaggtccatatctatccctcagagaagtggtgtgtgtccctgttttgcctctccctc
accacccccacacattccagcctggggcagggggaggccagtggaacaaaagccctctgtgtatggggtggtatgt
gtccccccacccctccaccagactatacaatgccccctgtctccctgcactctgccccctccccaccacctcctaactg
cacatgccagggtgcaattggttactggctgaggacagccccctcatgtggggccctaggggatttaagcaggttcca
ggaaccccccttcagttcctgggtccccacttttcaacccccacagatgctcggggccccctgccccctgccccagcacg
gtcgcaccatgtgtgagcaagggcgaggagctgttcaccgggggtgtgcccacctgtgtgagctggacggcgacgta
aacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagtcatctg
caccacgggaagctgcccgtgcccgtggccaccctctgaccaccctgacctacggcggtgacgttccagccgctac
cccgaccacatgaagcagcagcacttctcaagtccgccatgccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctca
aggacgacggcaactacaagacccgcgagggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctga
agggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctat
atcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgc
agctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcgccgacggccccgtgtgtgctgcccgacaaccactacctgagc
accagtcggccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgcatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgcccggg
gatcactctcgcatggacgagctgtacaagtaaagcgccctagatcaagcttatcgataatcaacctctggattaaa
aatttgaagattgactggtatttctaactatgttgccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctat
tgcttcccgtatggcttcatcttctcctgtataaatcctgggtgtgtctctttatgaggagttgtggccggtgtcaggcaac
gtggcgtggtgtgcactgtgttgcagcgaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctccttccgggact
ttcgcttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttggccgctgtgacaggggctcggtgttgg
gcactgacaattccgtggtgttgcggggaaatcatcgctcttcttggctgctgcctgtgttgcacctggattctgcgcg
ggacgtccttctgctacgtcccttggccctcaatccagcggaccttcttcccgccgctgctgcccgtctgcccctctt
ccgcttctgccttgcctcagacgagtcggatctcccttggggccgctccccgcatgataccgtcgactcgctgatc
agcctcgactgtgccttctagtgtccagccatctgttgttggccctccccgtgccttcttgacctggaaggtgccactcc
cactgtccttcttaataaaaatgaggaaattgcatcgcatgtgtgtaggtgtcattctattctggggggtggggtggggc
aggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgtggggatgcggtgggctctatggcttctgaggcg
gaaagaaccagctggggctcgactagagcatggctacgtagataagtagcatggcggggttaatacctaactaaa
ggaacccctagtgtatggagttggcactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccggggcgacaaa
ggtcgcccgcgcccgggctttgcccgggcccctcagtgcgagcgagcgagcgcgagagcttttgaaaa
gcctaggcctccaaaaagcctcctcactacttctggaatagctcagaggccgagggcgccctcgccctctgcataata
aaaaaattagtcagccatggggcggaagaatgggcggaactggcgaggttagggcgggatggcgggaggttagg
ggcgggactatggtgtgactaattgagatgcatgcttgcatacttctgctgtggggagcctggggactttcacacct

ggttgctgactaattgagatgcatgctttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttccacaccctaactgacaca
cattccacagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggttgcgtattgggcgctcttccgcttctcgctc
actgactcgctgcgctcggtcggtcggtcggtcggtcggtcggtcggtcggtcggtcggtcggtcggtcggtcggtcggt
atcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaaaggccgcgt
tgctggcggttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccc
gacaggactataaagataccaggcggttccccctggaagctccctcgctgcgctctcctgttccgacctgcccgttaccgg
atacctgtccgcttctccctcggaagcggtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttc
gctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccgctgcgcttatccggtaactatcgcttgagtcca
acccggtgaagacacgacttatcgccactggcagcagccactgtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggt
gctacagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacaglatttggatctgcgctctgctgaagcca
gttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcgggtgggtttttgttgcaagca
gcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtgacgctcagtggaacgaaa
actcacgttaagggttttggcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaataaaaaatgaagtttaaatc
aatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctattt
cgttcatccatagttgctgactccccgctgtagataactacgatacgggaggggcttaccatctggccccagtgctgcaa
tgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcag
aagtggctctgcaactttatccgctccatccagctctattaattgttgccgggaagctagagtaagttagttcgcagttaata
gtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcggtgtcacgctcgctggttggtatggcttattcagctccggttcca
acgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtcaaaaaagcggttagctcctcggtcctccgatcggtgtcagaagt
aagtggccgcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgt
gactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttggccggcgtaatacggg
ataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatc
ttaccgctgttgagatccagttcgtatgaaccactcggtgcacccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcggttctgg
gtgagcaaaaacaggaaggcaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatact
cttcttttcaatattatgaagcatttatcagggtattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataaaca
aataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataa
aaataggcgatcacgaggcccttctgctcgcgcgttccggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccg
agacggtcacagctgtctgtaagcggtatgccgggagcagacaagcccgtagggcgcgtagcgggtgttggcggg
tgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgaccattcgacgctctcccttatgcgactcc
tgcattaggaagcagcccagtagtaggttagggcgttagcaccgcccgcgcaaggaatggtgcatgaaggagat
ggcgcccaacagtccccggccacggggcctgccaccatacccacgcccgaacaagcgctcatgagcccgaagt
gagagcccgatcttcccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggc
cacgatgcgtccggcgtagaggatctggctagcgtgacctgtgattggttcgctgaccatttccgggtgcgggacgg
cgttaccagaaaactcagaagggtcgtccaaccaaaccgactctgacggcagtttacgagagagatgatagggtctgcttc

agtaagccagatgctacacaattaggctgtacatattgtcggttagaacgcggctacaattaataacataaccttatgtatcat
acacatacgatttaggtgacactatagaatacacggaattaattc

Negrita = secuencia ITR

Cursiva = promotor de Mpz humano

Subrayado = EGFP

Subrayado en cursiva = secuencia WPRE

**SEQ ID NO. 20: AAV-minMpz-SH3TC2.myc.ITR para el reemplazo
terapéutico del gen SH3TC2**

**tagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgctgggagaccttggcgccc
ggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgccaactccatcactaggggttcctttagttaat
gattaacccgccatgctacttatctacgtagccatgctctaggtaccgctctcaggcaaggaggctaagaaggaatc
ctttgctgtagccttttgatttaggtttctcagcttatctatccctcagagaagtgtgtctatgtccctttctgtccctctgcctcac
cccacccaacattccaacctagggtagggggaggtcagtatacaaaagccctctgtgtaaggggtggtatgtgtccc
cccacccccctaccagagtatacaatgcccttctgtccatgccctgccacccctcccaccacctctcaattgcacat
gccaggctgcaattggctcactggctcaggacagccccctcatgtggggatccaggggatttaagcaggttcagaaa
acaccactcagttccttgtccccgctctctccacccacagacgctctgccaaccggtaccatgggtggctgcttctgcat
cccaggagcgagtgctgacctggggcccaggtaaagaaactcctccaaggatccaactgtatcgagtgagtgtat
agcctcatctgaatacaaggaaaaatgtttctgccacagaacattaatccagacctgacactctccttctgtgtaaagagc
cgctccaggaggtgtgtaaattggacccctacaggaagctgctcgaggcggtctgggactggagaatgaggacca
ggaggtgcatgctgtttaaggacctctcagcaaggttggtcagtatccagtctcagagggccagtttctcatcaccttc
aagaccatggaggaaatctggaagtctccacctaccttaatttaggctacgtatccatgtgtctagaacatctccttttgac
cacaagtactggctcaactgcatattgggtggaggatacagagatccaagtgtctgtagatgataaacacctggaacaat
atacctgggactcctgatacaggaaggccacttctctgcagagccctgtgctccgtgactccaccagccgagaaggaa
ggggaatgcttgacactttgcaagaatgagtaatctcagtgaagatggcagaagctggctccgagttggaaggcggtgc
tttggtgacagggtcagcggggcctggtactggtgtcagccttggagcctctgcctctccctttccaccagtgggtcctaaaga
attatccaggaagctgtggcctttccaggaagagggattggacaggctcctatcagattggcagaggacgctgtaaggc
cttgacgggttatgagccaggagaaaaggatgaactgaatttctaccaggagaaaagcattgagatcatcggtttgtca
tacctgggcttcagtggttcattggaagtgcacaagttcaggacaagtgggcttctgtccaccagggaacatagatcctg
attcttattcccaatgagcaggaactctgcctttctcagtgtatgaggagagatgctccctgttgccctgggaagtataa
gcagactgagtggtccagcttctccacactcttgcctgcactgacatcacatctgtctaccggctcagtggtttgaatccat
ccagaatcctccaaatgatctgagtgcatccagcctgaaggtttcaaggagggtcaggcctggcagagcctgggagga
gcatcaggccgtggggtccagacagtccagcagctctgaggactccagcctggaggaggagctcctctcgccacctc
agacagctatcgctgccggagcctgatgaccttgatgacctggaactgctcatggacctaaagcactgggtcaggagga**

caaaagcctagggcctcaaaaaagcctcctactacttctggaatagctcagaggccgaggcgccctggcctctgcat
aaataaaaaaattagtcagccatggggcggaagaatgggcggaactgggcggagttagggcgggatgggcggag
ttagggcggggactatggttctgactaattgagatgcatgcttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttcca
cacctggttctgactaattgagatgcatgcttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttcacaccctaactg
acacacattccacagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggttgcgtattggcgctcttccgcttc
ctcgtcactgactcgtcgcctcggtcgttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggaatacggttatc
cacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaag
gccgcttgcgtggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcg
aaacccgacaggactataagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgtctcctgttccgacctgcccgt
taccggatacctgtccgctttctccctcggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtag
gtcgttgcctcaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagcgtgcgccttatccggaactatcgtcttg
agtccaacccggaagacacgactatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtag
gcggtgtacagagtcttgaagtgtggcctaactacggctacactagaagaacagtttggatctgcgctctgtgaa
gccagttacctcggaagaggttgtagcttgcgtccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttgttga
agcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttgcgttttctacggggtctgacgctcagtggaac
gaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatcctttaaattaaaaatgaagttt
aaatcaatctaaagtatatatgagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctg
tctatttgcgttcatcatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcctaccatctggccccagtc
tgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagc
gcagaagtgtcctgcaactttatccgcctccatccagctctattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttccagtt
aatagtttgcgcaacggttgttgcattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgttggtaggttcattcagctccggtc
ccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcggtagctccttcggctcctccgatcgttgcag
aagtaagtggccgcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgcttt
tctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttggccggcgtaatac
gggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaag
gatcttaccgctgttgagatccagttcagatgaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcgtt
ctgggtgagcaaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaaggaataagggcgacacggaaatgttgaatactca
tactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataa
acaaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaaccta
taaaaaataggcgtatcacgaggcccttctcgtcgcgcgttccggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctccc
ggagacgggtcacagcttctgtgaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgctcagcgggtgttggcg
gggtgcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccattcgacgctctcccttatgcgact
cctgcattaggaagcagcccagtagtaggttagggcgttagcaccgcccgcaaggaatggtgatgaaggag
atggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgtcatgagcccgaagt
ggcgagcccgatcttcccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccgg

ccacgatgcgtccggcgtagaggatctggctagcgatgaccctgctgattggtcgtgaccattccgggtgcgggacg
gcgttaccagaaactcagaagggttcgccaaccaaacccgactctgacggcagtttacgagagagatgatagggtctgct
tcagtaagccagatgctacacaattaggctgtacatattgtcgttagaacgcggctacaattaatacataaccttatgtatc
atacacatacgatttaggtgacactatagaatacacggaattaattc

Negrita = secuencia ITR

Cursiva = promotor mini Mpz

Subrayado = SH3TC2

Subrayado en cursiva = poliA sintético mínimo

SEQ ID NO. 21: AAV-humano-miniMpz-SH3TC2

**tagctgcgcgtcgcctcactgaggccgcccgggcaaagcccggtcgggacaccttggctgccc
ggcctcagtgcgcgagcgcgcgagagggagtgccaaactccatcactaggggttcctgtagtaat
gattaacccgccatgctacttatctacgtagccatgctctaggtacctctcaggcaaggaggctgaggagaaatc
ccttttatggcctttaaattgaggttccatatctatccctcagagaagtgtgtgtgtccctgtttgtccctctccctcaccacc
ccccacaacattccagcctggggcagggggaggccagtgacacaaagccctctgtgtatgggggtgtgtgtccc
ccacccctccaccagactatacaatgcccctctgtcctcgcactctgccccctccaccacctctcaactgcacat
gccaggctgcaattggttactggctgaggacagccccctcatgctggggccctaggggatttaagcaggttcagggaac
ccccgttcagttcctggtccccactttctcaacccacagatgctccggggccctgccccgccccagcggtaccatgg
gtggctgcttctgcatcccaggagcggagctgacccggggccaggtaaagaaactcctccaaggatccaactgt
atcgagtgcgtgtatagcctcatctgaatacaaggaaaaatgtttctgccacagaacattaatccagacctgacactctcc
ttctgtgtaaagagccgtccaggaggtgtgtaaattggacccctacaggaagctgctcggaggcggctctgggcactgg
agaatgaggaccaggaggtgcgcagctgtttaaaggacctctcagcaagggttggtcagtatccagtctcagagggccca
gtttctcatcacctcaagacatggaggaaatctggaagtctccacctacctaatttaggctacgtatccatgtgtctaga
acatctcctcttgaccacaagtactggctcaactgcatattggtggaggatacagagatccaagtgtctgtatgataaa
cacctggaaacaatactgggactcctgatacaggaaggccactctctgcagagccctgtgtcctgactccacc
agccgagaaggaaggggaatgctgacactttgcaagaatgagttaatctcagtgaagatggcagaagctggctccga
gttgaaggcgtgtctttgtgacaggtcagcggggcctggtactggtgtcagccttgagcctctgcctctcccttccacc
agtgttcctaaagaattatccaggaagctgtggcctttccaggaagagggttgacaggctcctatcagattggcaga
ggacgctgtaaggcctgacgggttatgagccaggagaaaaggatgaactgaatttaccaggagagaaagcattgag
atcatcggcttctcatacctgggcttcagtggtcattggaaagtcgacaagttcaggacaagtgggcttgtcccaccag
gaacatagatcctgattctattcccaatgagcaggaactctgccttctcagtgtatgaggagagatgtccctgttgccc
tggaagtataagcagactgaggttccagcttccacactctgtcgcactgacatcacatctgtctaccggctcagt
gggttgaatccatccagaatcctccaaatgatctgagtgcatcccagcctgaagggttcaaggaggtcaggcctggcag
agcctgggaggagcatcaggccgtgggtccagacagtccagcagctctgaggactccagcctggaggaggagctc**

ctctcgccacctcagacagctatcgctgccggagcctgatgacctgatgacccggaactgctcatggacctaagca
ctggtcaggaggaggaggctgagaactcgccccatattggctttctggatcatgagggttatgctgaccactttaagag
tctctatgacttctccttctcttctcacttctcctttatagcttctctgaggaggatgagtttgctgacctacctggaggcatcaa
gaaagtgggccaagaagagccacatgacctgggccccatgccggctctgcttctcctgggcccggctgagcatcagga
aggtcaaactctctcaggccagggtgtacttcgaggaggccatccacattctcaatggagcatttgaggacctatccttgg
ggccactctgtacatcaatttgctgccatctacctgaaacagaggctgagacataaaggctccgccctgttgaaaagg
caggtgccctgctggcctgctgacctgacctgagtgagtgccaagcatgaactcgacgtggtggcctacgtgctgccc
caggggattgtggtgggcagcagcccgtggaggccaggcctgctttctggccatccgcttgcctgagcctagggccg
gcacgaggaggctctgcccttgcgagcgctgcagctcctctctggacacctcctgcctctgaggctgtggccagtgt
ttgagtttctgtatgacaagaaatatctccacacctgcagtgccctctgtccagcaacatggtatccagagtggccaagg
gatgtcttctctatttgccaggtccacctgtcctccagaacacaaccaagctcctggcttctctcccaggctgggtga
agtttctgccttggcctggccaatgctcagacaggccctggctgctgtgaggaactagcagaccggagcaccagagg
gccctgtgtctatccttccaaagtgtacctcgagcacaggctcctgacggtgccatccactacctgagccaggccttgg
tgtagggcagctgtgggtgagcaggaatcctttgagttctctctgctggcatgggctatctcttagccagccaggc
caagaaggcttggatgtgcttgagccactgctatgctccctgaaggagacagagagtctcactcaaaggggagtcact
ataacctcctgggacttgactccaaggtgaaggccgggtgaacagggcagccaagagctatctcgggccttgaaca
gagcccaggagggtgggagatgtgcataaccaggcagtggtatggccaatcttggccacctgagccttaagtctgggc
tcagcatccagccagaaactatctcctgcaggctgtacgactctattgtgaactcaggccagtaaggagacagacatgg
aattagtacagggtgttctctggttggcccaagttctggtgtctggacaccagctgacctatggccttcttgtatgaaatggc
attgctgttggcttaaggcatcgacatctaaagagtcagcttcaggccaccaaatccctctgccatttctacagctctgttc
cccaaacctgaggcatgcatcacctaccatgagcactggctggccctggctcagcaactcagggaacgggagatgg
aaggagggtgctggagtccctggggcagctttatcggaacctaaataccgccagggtccctcaggaggctcactcacatg
catcaaggagagcctgcgtatcttcattgacctgggggagacagacaaggctgctgaggcctggcttggggcggggcg
actccactacctcatgcaggaagacgagctggtggagctgtgcctgcaggcagccatccagacagccctgaagtca
aggagccttctgtggctctcaaactttatgaagaagcagggtgatgtgttctcaatgggacccgccacaggcatcatgcag
tggagtactaccgagctggagctgttcttttagcaaggagggtgaaggcggtgagaactgagctccggatttcaataagc
tgacagagctgcagattagcctcgaaggctatgagaaggcttgggaattgccacctggccgcccaggctcagcacagt
cacaggagatcagaggcaagagctggtggcctttaccgcctggctacagtgtactactcctgcacatgtatgagatgg
ctgaggactgctacctgaagaccctgtccctctgtccacctggctgcagagtgccaaggaggccctgtactatgccaag
gtgtattatgcctgggcagactcacctctgccagctgaaggatgccatgatgcactgagtacttcttctggccctggc
agcagcggtcctgctgggtgatgaggagcttcaggacaccattaggagcaggctggacaacatctgccagagccccct
gtggcacagcagggccctccgggtgtcctcagagagggcgcggtggctgagtggtggctggcctctgagcggc
cgcgagctctcgagaggccataaagagctcagatgcacatcagagtggttgggttttgggtgagatctaagctta
gcatggctacgtagataagtagcatggcggttaatcattaactacaaggaaccctagtgtatggagttggcca
ctccctctctgcgcgtcgtcgtcactgaggccgggacgacaaaggtcgcccgacggcggttggcc

gggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgagagccttttgcaaaagcctaggcctccaaaaagcctcctcact
acttctggaatagctcagaggccgagggcgccctggcctctgcataataaaaaaattagtcagccatggggcgag
aatgggcggaactgggaggagttagggcgggatgggaggagttagggcgggactatggttgctgactaattgagat
gcatgctttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttccacacctggttgctgactaattgagatgcatgctttgcat
acttctgcctgctggggagcctggggactttccacaccctaactgacacacattccacagctgcattaatgaatcggccaa
cgcgggggagaggcggttgctgattggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcctcggtcggtcggtgc
ggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatg
tgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccggttgctggcggttttccataggctccgccccct
gacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccgacaggactataaagataccaggcggttcc
ccctggaagctccctcgctgcctctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgcctttctccctcggggaagcgt
ggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgctccaagctgggctgtgtgcagaacccc
ccgttcagcccgaccgtgcgccttatccggaactatcgcttgagtccaacccggaagacacgacttatcgccactgg
cagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgtgctacagagttctgaagtggcgctaacta
cggctacactagaagaacagtatgttgatctgcgctcgtgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctctga
tccggcaaacaaaccacgctggtagcgggtgtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctca
agaagatccttgatctttctacgggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggatgttggtcatgagattatc
aaaaaggatcttcacctagatccttttaataaaaaatgaagtttaataatctaaagtatatatgagtaaaacttggtctga
cagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcacatagttgcctgactccccgctggt
agataactacgatacgggaggggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctc
cagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgagcaagtggtcctgcaactttatccgcctccatcca
gtctattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttcgccagtaataagtttgcgcaacgttggtgcatgacaggcat
cgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttattcagctccgggtcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgtt
gtgcaaaaaagcggtagctccttcggtcctccgatcgttgctcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatggttatgg
cagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgaga
atagtgatgcggcgaccgagttgctcttgcggcgctcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaag
tgctcatcattgaaaaagcttctcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgaaccact
cgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcggttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgca
aaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatacttctcttttcaatattattgaagcatttatcagggttat
tgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataaacaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgc
cacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgatcacgaggcccttctcgtcgcgcg
tttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgagacggtcacagctgtctgtaagcggatgccggga
gcagacaagcccgtcagggcgctcagcgggtgttgccgggtgtcgggctggcttaactatgcggcatcagagcag
attgtactgagagtgaccattcgacgctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggttgaggcc
gttgagcaccgcccgcgaaggaatggtgcatgaaggagatggcgccaacagtccccggccacggggcctgcc
accatacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttcccatcggtgatgtcggcgata

taggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagaggatctggctagcgat
gacctgctgattggttcgctgaccattccgggtgcgggacggcggtaccagaaactcagaagggtcgtccaaccaaac
cgactctgacggcagtttacgagagagatgatagggctgcttcagtaagccagatgctacacaattaggctgtacatatt
gtcgttagaacgcggctacaattaatacataaccttatgtatcacatacagatttaggtgacactatagaatacacgga
attaattc

Negrita = secuencia ITR

Cursiva = promotor hP0 mini-humano

Subrayado = SH3TC2

Subrayado en cursiva = poliA sintético mínimo

SEQ ID NO. 22: promotor de hP0 mini-humano

Tctctcaggcaaggaggctgaggagaaatcccttttatggcctttaaattgaggtccatatctatccctcagagaagtgtg
tctgtgtccctgttttgcctctccctcaccacccccacacattccagcctggggcagggggaggccagtggaaca
aagccctctgtgtatgggtggtatgtgtccccccaccctccaccagactatacaatgcccttctgtccctgcactctg
ccccctccccaccacctctcaactgcacatgccaggctgcaattggttactggctgaggacagccccctcatgtgggg
ccctaggggattttaagcaggtccaggaaccccccggttcagttcctggtccccactttctcaacccacagatgtccgg
gccctgcccctgccccagc

SEQ ID NO. 23: AAV-humano-miniMpz-Egfp

tagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgctcgggcgacctttggt
cgccccgctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtgccaaactccatcactaggggttccttgta
gttaatgattaacccgccatgctacttatctacgtagccatgctctaggtacctctcaggcaaggaggctgaggag
aaatcccttttatggcctttaaattgaggttccatatctatccctcagagaagtgtgtgtgtccctgttttgcctctccctca
ccacccccacacattccagcctggggcagggggaggccagtggaacaaagccctctgtgtatgggtggtatgtg
tccccccaccctccaccagactatacaatgcccttctgtccctgcactctgccccctccccaccacctctcaactgc
acatgccaggctgcaattggttactggctgaggacagccccctcatgtggggccctaggggattttaagcaggtccag
gaacccccgttcagttcctggtccccactttctcaacccacagatgtccggggcccctgcccctgcccagcacgggt
cgccaccatggtgagcaagggcgaggagctgtcaccggggtggtgccatcctggtcgagctggacggcgacgtaa
acggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgc
accaccggcaagctgcccgtgccctggccaccctcgtgaccacctgacctacggcgtagtgcttcagccgctacc
ccgaccacatgaagcagcacgacttctcaagtccgccatgccgaaggctacgtccaggagcgacacatcttctcaa
ggacgacgggcaactacaagaccgcgcccagggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaa
gggcatcgactcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctata
tcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcgagcgtgca

gctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagca
cccagtcgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgcccggg
atcactctcgcatggacgagctgtacaagtaaagcgccctagatcaagcttatcgataatcaacctctggattacaaa
attgtgaaagattgactgggtattcttaactatgttgctcctttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctatt
gctcccgtatggcttcatttctcctcctgtataaatcctgggtgctgctctttatgaggagttgtggccggtgtcaggcaac
gtggcggtgtgactgtgttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctccttccgggact
ttcgcttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttggcgctgctggacaggggctcggtgttg
gcactgacaattccgtggtgtgtcggggaaatcatcgctccttctggctgctgcctgtgttgccacctggattctgcgcg
ggagctccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcgaccttcttcccgcgccctgctgcccgtctgcggcctctt
ccgctcttcgcttgccttcagacgagtcggatctcccttggggccgctccccgcatcgataccgtcgactcgctgatc
agcctcgactgtgccttctagtgtccagccatctgtgtttgcccctccccgtgccttcttgacctggaaggtgccactcc
cactgtccttcttaataaaatgaggaaatgcatcgcatgtgtgtagtaggtgcattctattctggggggtgggggtggggc
aggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgtggggatgcggtgggctctatggcttctgaggcg
gaaagaaccagctggggctcgactag**agcatggctacgtagataagtagcatggcggggtaataactacaa**
ggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgacaaa
ggctgcccgcgcccgggcttggccgggcgccctcagtgcgagcgagcgcgagcgttttgcaaaa
gcctaggcctccaaaaagcctcctacttctggaatagctcagaggccgaggcgccctcgccctctgcataata
aaaaaattagtcagccatggggcggaatgggcggaactggcgaggtaggggcggaatgggcgaggtagg
ggcgggactatggtgtgactaattgagatgcatgcttgcatactctgcctgctggggagcctggggacttccacacct
ggtgtgactaattgagatgcatgcttgcatactctgcctgctggggagcctggggacttccacaccttaactgacaca
cattccacagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggttgcgtattggcgctcttccgcttctcgctc
actgactcgctgcgctcggtcggtcggtgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtatccagata
atcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgct
tgtggcggttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcagagggtggcgaaacc
gacaggactataaagataccagggttccccctggaagctccctcgctgcgctctctgttccgacctgcccgttaccgg
atacctgtccgcttctcccttcgggaagcggtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgtc
gctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtcca
accggtaagacacgacttatgccactggcagcagccactggaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggt
gctacagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagcca
gttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttgttgcaagca
gcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaa
actcacgttaagggttttggcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaataaaaaatgaagtttaaatc
aatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatt
cgttcatccatagttgctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggaggggcttaccatctggccccagtgctgcaa
tgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgag

EGFP (pAAV-Mpz.Egfp, vector simulado), ambos bajo el promotor de Mpz de 1,127 kB que se muestra para conducir a expresión específicamente en células de Schwann (26, 32). Estos vectores se clonaron mediante el uso de la construcción de AAV pAM/Mbp-EGFP-WPRE-bGH como plásmido de partida (57), que contiene el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) y la secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino (bGHpA) flanqueada por AAV2 repeticiones de terminales invertidas (Figuras 1 y 9).

Los detalles específicos de cómo se clonaron las tres construcciones AAV-Mpz.Egfp, AAV-Mpz.GJB1 y AAV-miniMpz.Egfp son los siguientes:

264-P0-EGFP-WPRE (=AAV-Mpz.Egfp - SEQ ID NO. 1)

Se usó el plásmido pBluescript SK + que contiene la secuencia promotora Mpz para digerir la secuencia promotora mediante el uso de enzimas de restricción XhoI y EcoRV. El vector AAV también se digirió mediante el uso de las mismas enzimas. Después de la ligación y transformación, se confirmó el ensamblaje correcto del casete de expresión mediante mapeo de digestión de restricción y secuenciación directa mediante el uso de cebadores que cubren la secuencia codificante completa.

264-Mpz(P0)-Cx32-WPRE (= AAV-Mpz.GJB1 - SEQ ID NO. 2)

El ORF *Mpz/Cx32* se amplificó por PCR a partir de una construcción lentiviral preparada previamente. Los cebadores usados para la amplificación fueron P0-Cx32-F 5'- AGGGGTACCCTTCCTGTTTCAGACT-3' (SEQ ID NO. 13) P0-Cx32- R 5'- CCGCTCGAGGGATCCTC AGCAG-3' (SEQ ID NO. 14). El producto de PCR (2030 pb) se purificó en gel mediante el uso del kit de extracción en gel de Qiagen y se digirió con KpnI y XhoI. El vector AAV también se digirió con las mismas enzimas de restricción. El casete de expresión completo se confirmó mediante secuenciación directa de los ORF.

264-Mpz(P0) min-EGFP-WPRE (=AAV-miniMpz.Egfp – SEQ ID NO. 3)

El vector 264 de AAV se digirió con HindIII y se autoligó. Después, se insertó un enlazador en el vector. La Mpzmin se amplificó por PCR a partir de la secuencia promotora de Mpz de rata, mediante el uso de los siguientes cebadores: KpnI-P0-F: 5'- GGGGTACCGCTCTCAGGCAAG-3' (SEQ ID NO. 15) y AgeI-P0- R: 5'- AAACCGGTTGGCAGAGCGTCTGT-3' (SEQ ID NO. 16). Después, el inserto (420 pb) se clonó direccionalmente en nuestro vector 264 de AAV. Se digirió EGFP de otra construcción mediante el uso de AgeI y HindIII y se ligó directamente en.

Ejemplo 2: Producción, purificación y titulación del vector AAV

La producción de vectores AAV9 se realizó de acuerdo con protocolos publicados (58). Los plásmidos pAAV-Mpz.Egfp y pAAV-Mpz.GJB1 se empaquetaron de forma cruzada en la cápside AAV9 (plásmidos de cápside proporcionados por el Dr. A. Bosch, Universidad de Barcelona, España, y desarrollados originalmente por el Dr. James Wilson, Universidad de Pennsylvania Vector Core, PA, EE. UU.).

Se generaron reservas virales de AAV para los pseudotipos 9 como se describió anteriormente (59). Los vectores recombinantes de AAV (rAAV) se produjeron por transfección triple de 2×10^8 células HEK293 con 250 μ g de pAAV, 250 μ g de pRepCap y 500 μ g de plásmido pXX6 mezclado con polietilenimina (PEI; ramificado, MW 25 000; Sigma). Brevemente, 48 h después de la transfección, las células se recogieron por centrifugación (200 g, 10 min); se resuspendieron en 30 ml de NaCl 20 mM, MgCl₂ 2 mM y Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) y se lisaron mediante tres ciclos de congelación-descongelación. El lisado celular se clarificó mediante centrifugación (2000 g, 10 min) y las partículas de rAAV se purificaron a partir del sobrenadante mediante un gradiente de iodixanol como sigue: El lisado clarificado se trató con 50 U/ml de Benzonase (Novagen; 1 h, 37 °C) y se centrifugó (3000 g, 20 min). Se recogió el sobrenadante que contenía el vector y se ajustó a NaCl 200 mM mediante el uso de una solución madre 5 M. Para precipitar el virus a partir del lisado celular clarificado, se añadió polietilenglicol (PEG 8000; Sigma) hasta una concentración final del 8 % y la mezcla se incubó (3 h, 4 °C) y se centrifugó (8000 g, 15 min). Los sedimentos que contenían rAAV se resuspendieron en NaCl 20 mM, MgCl₂ 2 mM y Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) y se incubaron durante 48 horas a 4 °C. Las partículas de rAAV se purificarán mediante el uso del método de iodixanol como se describió (59). Si fue necesario, el rAAV se concentró y se desaló en PBSMK mediante el uso del dispositivo de filtro centrífugo Amicon Ultra-15 (Millipore). La titulación se evaluó mediante cuantificación picogreen (60) y se calculó como genomas virales por mililitro (vg/ml).

Ejemplo 3: Suministro de vector intratecal

Después de una pequeña incisión en la piel a lo largo del nivel de la columna lumbar inferior para visualizar la columna, se suministró el vector AAV en el espacio intervertebral L5-L6 de ratones anestesiados a una velocidad lenta de 5 μ l/min. Se usó una jeringa Hamilton de 50 μ l (Hamilton, Giarmata, Rumania) conectada a una aguja de calibre 26 para inyectar un volumen total de 20 μ l que contenía $0,5-1 \times 10^{11}$ genomas del vector (vg) del vector AAV. Un movimiento de la cola se consideró un indicativo de una administración intratecal satisfactoria.

Ejemplo 4: Expresión génica dirigida a células de Schwann mediada por AAV9

Se trataron ratones de tipo salvaje de 2 meses con el vector AAV9-Mpz-Egfp descrito en los Ejemplos 1 y 3 anteriores. Las muestras se analizaron mediante extracción de ADN de los tejidos del SNP y se determinó la presencia del ADN viral medido como números de copias de vectores (VCN) 4 y 6 semanas después de la inyección (Tabla 1) como describimos previamente (33). La tinción por inmunofluorescencia de las secciones de la raíz lumbar y la inmunotransferencia de la raíz lumbar, los nervios femorales y los nervios ciáticos también se llevaron a cabo como se describe a continuación 4 y 8 semanas después de la inyección (Tabla 2).

Tinción por inmunofluorescencia: Para la inmunotinción, los ratones se anestesiaron con avertina de acuerdo con los protocolos aprobados institucionalmente, y después se perfundieron transcardíacamente con solución salina normal seguida de paraformaldehído nuevo al 4 % en tampón PB 0,1 M. Se disecaron la médula espinal lumbar-sacra con raíces espinales adheridas, así como también los nervios motores ciáticos y femorales bilaterales. Todos los tejidos se congelaron para obtener crio secciones, mientras que los nervios ciático y femoral se aislaron y se separaron las fibras bajo un estereoscopio. Las fibras o secciones separadas se permeabilizaron en acetona fría y se incubaron a temperatura ambiente con una solución de bloqueo de BSA 5 % (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania) que contenía Triton-X 0,5 % (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania) durante 1 h. Los anticuerpos primarios usados fueron: anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína asociada con la contactina (Caspr, 1:50; obsequio del Dr. Elior Peles, Weizmann Institute of Science), antisuero de conejo contra EGFP (1:1000; Invitrogen, EE.UU.), Capr2 (1:200, Alomone Labs, Israel) y Cx32 (1:50; Sigma, Munich, Alemania) todos diluidos en solución de bloqueo e incubados durante la noche a 4 °C. Después, los portaobjetos se lavaron en PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios purificados por afinidad cruzada de ratón y conejo conjugados con fluoresceína y rodamina (1:500; Jackson ImmunoResearch, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos celulares se visualizaron con DAPI (1 µg/ml; Sigma, Munich, Alemania). Los portaobjetos se montaron con medio de montaje fluorescente y las imágenes se fotografiaron bajo un microscopio de fluorescencia con una cámara digital mediante el uso del programa Axiovision (Carl Zeiss MicroImaging; Oberkochen, Alemania).

Las tasas de expresión para el gen indicador de Egfp se cuantificaron tras contar el número de las células de Schwann positivas a EGFP como porcentaje del total de

las células de Schwann en las raíces lumbares y los nervios ciáticos. La expresión de Cx32 se cuantificó tras visualizar áreas nodales de fibras mielinizadas con marcadores de dominio axonal que incluyen Kv1,2 yuxtaparanodal y Caspr paranodal en tinción doble con Cx32. El número de áreas nodales positivas para la inmunorreactividad de Cx32 se contó como un porcentaje del total de áreas nodales en las raíces lumbares y los nervios ciáticos.

Análisis de inmunotransferencia: Se usó el análisis de inmunotransferencia de lisados de nervios periféricos y de la raíz para detectar la expresión del gen indicador Egfp o Cx32 en tejidos de ratones inyectados. Se incubaron inmunotransferencias de lisados de raíz lumbar, femoral y nervio ciático recogidos 4 semanas después de la inyección con anticuerpos primarios anti-Egfp (1:1000; Abcam) y anti-Cx32 (clon 918, 1:3000) de conejo seguidos de anticuerpos secundarios anti-conejo conjugados con HRP (Jackson ImmunoResearch, diluido 1:3000). El anticuerpo unido se visualizó mediante un sistema de quimioluminiscencia mejorado (GE Healthcare Life Sciences).

Los resultados se muestran en la Figura 2 y las Tablas 1 y 2 a continuación. Fue posible detectar niveles altos de expresión del gen indicador EGFP (proteína fluorescente verde mejorada) específicamente en las células de Schwann, las células mielinizantes del SNP, que incluye las raíces de los nervios espinales lumbares y los nervios ciáticos distales, y esto muestra la expresión específica del gen indicador EGFP en muestras de raíz lumbar y nervio ciático, lo que indica que la expresión específica de tejido en células de Schwann se logra mediante el uso de este sistema de suministro de vector.

Tabla 1: Números de copias de vectores (VCN) en todos los tejidos examinados en ratones WT inyectados con AAV9-Mpz.*Egfp*:

	4 semanas			6 semanas			8 semanas		
	Raíces lumbares	Nervio ciático proximal	Nervio ciático distal	Raíces lumbares	Nervio ciático proximal	Nervio ciático distal	Raíces lumbares	Nervio ciático proximal	Nervio ciático distal
VCN	2,66 ± 1,37	0,31 ± 0,13	0,07 ± 0,03	0,62 ± 0,28	0,23 ± 0,13	0,02 ± 0,01	0,24 ± 0,1	0,82 ± 0,45	0,18 ± 0,08
N número de ratones	4	2	4	4	4	4	3	4	4

Tabla 2: Tasas de expresión de EGFP (% de las células de Schwann positivas a *Egfp*) en raíces lumbares y nervios ciáticos de ratones WT inyectados con AAV9-Mpz.EGFP 4 y 8 semanas después de la inyección:

	Ciático		Raíces	
	4 semanas	8 semanas	4 semanas	8 semanas
Expresión de EGFP	53,6 ± 7,66	39,9 ± 2,49	29,7 ± 1,89	35,0 ± 3,23
N	4	3	4	3

Ejemplo 5: Expresión del vector AAV9-Mpz.GJB1 suministrado intratecalmente en ratones Cx32KO y R75W KO de 2 meses

El vector AAV9-Mpz.GJB1 se produjo como se describe en el Ejemplo 1 anterior (5×10^{12} vg/ml) y se suministró a ratones Cx32 KO de 2 y 6 meses mediante inyección intratecal lumbar (i.th.) (5×10^{10} vg en 20 μ l). El análisis de las VCN a partir del ADN extraído de los tejidos del SNP como se describió anteriormente (33) por célula en diferentes tejidos reveló una biodistribución generalizada (Figura 3A), incluso en las raíces espinales y los nervios ciáticos con niveles más altos en el hígado (55). Se llevaron a cabo análisis de inmunotinción e inmunotransferencia como se describió anteriormente. Cx32 se expresó en áreas de mielina paranodal en más del 60-70 % de las células de Schwann mielinizantes en las raíces espinales lumbares y en las fibras del nervio ciático (Figuras 3B-D). La expresión de Cx32 suministrada por AAV9 a niveles altos también podría detectarse mediante transferencia Western de lisados de tejido del SNP de ratones Cx32 KO inyectados en lugar de sin inyectar (Figura 3F).

Para aclarar si el vector viral AAV9-Mpz.GJB1 que permite niveles de expresión más altos podría superar los efectos de interferencia de mutantes retenidos en Golgi

observados con el vector lentiviral en nuestros estudios previos (29, 34), los inventores también inyectaron a ratones con R75W inactivado (R75W KO) de 2 meses de edad. De manera importante, la localización paranodal de la Cx32 suministrada por AAV9 también se detectó en tejidos de R75W/KO, a pesar de la coexpresión del mutante de interferencia R75W retenido en Golgi que muestra la localización perinuclear típica (Figura 3E). Por lo tanto, AAV9 muestra el potencial de proporcionar una expresión génica dirigida a las células de Schwann, de alto nivel y generalizada que también puede superar el efecto de interferencia de un mutante CMT1X retenido en Golgi representativo.

Estos resultados se muestran en la Figura 3 y en las Tablas 3 y 4 a continuación, lo que demuestra que el uso de los vectores para suministrar copias del gen GJB1 de tipo salvaje da como resultado la expresión exitosa de Cx32 tanto en ratones con Cx32 inactivada como en ratones con R75W inactivado. El mutante R75W retenido en Golgi (Figura 3E) también logra la expresión de Cx32 a pesar de la presencia de la proteína mutante R75W Cx32 en áreas perinucleares, mientras que esto no había sido posible en trabajos previos que no usaban el vector AAV.

Tabla 3: Números de copias de vectores en todos los tejidos examinados en ratones Cx32 KO inyectados con AAV9-Mpz.GJB1:

	Raíces lumbares	Nervio ciático	Músculo	Médula espinal
VCN	0,20 ± 0,05	0,18 ± 0,07	0,05 ± 0,03	0,17 ± 0,08
N	12	12	3	5

Tabla 4: Tasas de expresión de Cx32 (% de áreas de mielina paranodales positivas a Cx32) en raíces lumbares y nervios ciáticos de ratones transgénicos Cx32 KO y Cx32 KO/R75W de 2 y 6 meses inyectados con AAV9-Mpz.GJB1:

	Ciático			Raíces lumbares		
	KO 2 meses	KO 6 meses	KO R75W	KO 2 meses	KO 6 meses	KO R75W
Expresión de Cx32	71,5 ± 5,8	71,7 ± 6,0	73,2 ± 5,1	63,1 ± 3,1	62,7 ± 8,1	64,9 ± 3,8
N	6	3	6	6	3	6

Ejemplo 6: Análisis de comportamiento de ratones Cx32 KO de 6 meses inyectados con AAV9-Mpz.GJB1 (completo) en comparación con crías de la misma camada tratadas con AAV9-Mpz.Egfp (simulados)

Tratamiento de los ratones: Se realizó un ensayo de terapia génica mediante el uso de dos grupos de ratones con Cx32 inactivada (KO) de 6 meses de edad. Se consideró adecuado un mínimo de 8-12 ratones por grupo de tratamiento para cada resultado medido para evaluar las diferencias estadísticamente significativas sobre la base de los estudios previos mediante el uso de modelos similares (32, 33). Los animales se trataron a la edad de 6 meses, después de la aparición de la patología (que se conoce que comienza después de los 3 meses de edad).

Se aleatorizaron ratones de la misma camada para recibir tratamiento AAV9-Mpz.GJB1 (completo) o AAV9-Mpz.Egfp (tratamiento simulado, como grupo de control) y se les asignó un número de codificación para su identificación posterior.

Pruebas de comportamiento: Después, se evaluaron los ratones mediante pruebas de comportamiento como se establece a continuación antes del tratamiento y nuevamente a las edades de 8 y 10 meses, por un examinador sin conocer la condición del tratamiento (Figura 4 y Tabla 5).

Prueba de varilla giratoria: Se determinaron el equilibrio y la coordinación del motor como se describió anteriormente (61) mediante el uso de un aparato de varilla giratoria de aceleración (Ugo Basile, Varese, Italia). El entrenamiento de los animales consistió en tres ensayos por día con un período de descanso de 15 minutos entre ensayos, durante 3 días consecutivos. Los ratones se colocaron sobre la varilla y se aumentó la velocidad gradualmente de 4 a 40 rotaciones por minuto (rpm). La prueba se realizó el cuarto día mediante el uso de dos velocidades diferentes, 20 y 32 rpm. Se calculó la latencia de caída para cada velocidad. La prueba duró hasta que el ratón se cayó de la barra o después de que el ratón permaneciera en la barra durante 600 segundos y después se retirara. Cada ratón se colocó en la varilla giratoria tres veces a cada velocidad usada y se obtuvieron tres valores diferentes para cada velocidad. Se usaron valores medios para cada ratón a las dos velocidades diferentes.

Prueba de fuerza de agarre: Para medir la fuerza de agarre, los ratones se sujetaron por la cola y se bajaron hacia el aparato (Ugo Basile, Varese, Italia) hasta que agarraron la rejilla con las patas traseras. Los ratones se retiraron suavemente hasta que soltaron la rejilla. Las medidas de la fuerza en g se indicaron en el equipo. Cada sesión consistió en tres ensayos consecutivos y se promediaron las mediciones.

Se comparó la fuerza de las extremidades traseras entre ratones tratados con AAV9.Mpz-GJB1 y AAV9.Mpz-Egfp.

Los ratones viejos Cx32 KO tratados con el vector terapéutico completo AAV9-Mpz.GJB1 se desempeñaron significativamente mejor en esas pruebas en comparación con las crías de la misma camada inyectadas con el vector simulado (no terapéutico) AAV9-Mpz.Egfp (n = 20 ratones por grupo).

Los resultados se muestran en la Figura 4 y la Tabla 5 a continuación, que muestran que el rendimiento motor (medido por las pruebas de la varilla giratoria y de agarre del pie) en el grupo tratado con GJB1 mejoró 2 meses después de la inyección (a los 8 meses de edad) y que esta mejora se mantuvo estable hasta los 10 meses de edad. Los ratones tratados de forma simulada no mostraron una mejora en el rendimiento motor.

Tabla 5: Comparación longitudinal del desempeño del comportamiento motor de los grupos de tratamiento Cx32 KO:

Comparación de puntos de tiempo (meses de edad)	Grupo de tratamiento completo AAV9.Mpz-GJB1 (Prueba de Mann-Whitney comparado con tratamiento simulado)			Grupo de tratamiento simulado AAV9.Mpz-Egfp		
	Varilla giratoria 20 RPM (segundo)	Varilla giratoria 32 RPM (segundo)	Prueba de agarre de alimentos (gramo)	Varilla giratoria 20 RPM (segundo)	Varilla giratoria 32 RPM (segundo)	Prueba de agarre de alimentos (gramo)
6	317,7 ± 45,62 p > 0,05	103,5 ± 27,90 p > 0,05	74,5 ± 5,46 p > 0,05	345,1 ± 85,60	159,7 ± 56,34	76,0 ± 9,14
8	241,3 ± 35,92 p > 0,05	84,6 ± 26,89 p > 0,05	93,5 ± 5,18 p = 0,0196	207,7 ± 38,43	64,5 ± 18,60	76,2 ± 3,41
10	312,7 ± 39,79 p > 0,05	121,9 ± 27,42 p = 0,0427	103,4 ± 6,01 p = 0,0025	288,9 ± 42,44	71,2 ± 25,86	73,2 ± 5,15

Ejemplo 7: Estudios de conducción motora del nervio ciático

Se trataron ratones Cx32 KO a la edad de 6 meses como se describe en el Ejemplo 6 anterior, después de la aparición de la neuropatía y después, se llevaron a cabo estudios de conducción nerviosa motora a la edad de 10 meses como se describe a continuación.

Velocidad de conducción del nervio motor (MNCV): La MNCV se midió *in vivo* mediante el uso de métodos publicados (62) de los nervios ciáticos bilaterales después de la estimulación en animales anestesiados en la muesca ciática y distalmente en el tobillo mediante electrodos bipolares con pulsos de onda cuadrada supramáximos (5 V) de 0,05 ms. Las latencias de los potenciales de acción del músculo compuesto (CMAP) se registraron mediante un electrodo bipolar insertado entre los dígitos 2 y 3 de la pata trasera y se midieron desde el artefacto del estímulo hasta la aparición de la desviación de la onda M negativa. La MNCV se calculó tras dividir la distancia entre los electrodos de estimulación y de registro por el resultado de restar la latencia distal de la proximal.

Los resultados del estudio de la MNCV realizado a los 10 meses de edad se muestran en la Figura 5 y la Tabla 6 a continuación, la cual muestra que la velocidad de conducción del nervio motor mejoró cuando se midió a los 10 meses en ratones Cx32 KO tratados con GJB1, y se aproxima a los niveles del tipo salvaje, en comparación con el grupo de control tratado de forma simulada (n = 10 ratones).

Tabla 6: Velocidades de conducción del nervio motor y medidas de amplitud de AAV9.Mpz.EGFP (Simulado, grupo de control Cx32 KO), AAV9.Mpz.GJB1 (Completo, grupo de tratamiento completo) y WT:

	Simulado	Completo	valor de p simulado vs completo	WT	valor de p WT vs completo
MNCV (m/s)	30,4 ± 0,87	34,8 ± 1,44	0,0316	41,7 ± 1,62	0,0068
Amplitud	3,2 ± 0,35	4,15 ± 3,22	> 0,05	3,3 ± 0,29	> 0,05

Ejemplo 8: Análisis morfológico de raíces espinales anteriores, nervios ciáticos y nervios femorales de ratones Cx32 KO después del suministro intratecal de AAV9-Mpz.GJB1 en comparación con el vector de ratones tratados de forma simulada

Se trataron ratones Cx32 KO como se describe en el Ejemplo 6 anterior a la edad de 6 meses y se examinaron 4 meses después, a la edad de 10 meses.

Los ratones se perfundieron transcardíacamente con glutaraldehído 2.5% en tampón PB 0.1 M. La médula espinal lumbar con múltiples raíces espinales adheridas, así como también los nervios femoral y ciático, se disecaron y fijaron durante la noche a 4 °C, después se osmicaron, deshidrataron e incluyeron en resina de araldita (todos adquiridos de Agar Scientific, Essex, Reino Unido). Se obtuvieron secciones semifinas transversales (1 µm) de la médula espinal lumbar con raíces y la porción media de los nervios motor femoral y ciático y se tiñeron con azul de toluidina alcalina (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania). Las secciones se visualizaron con lentes objetivos de 10 ×, 20 × y 40 × y se capturaron con una cámara Nikon DS-L3 (Nikon Eclipse-Ni; Tokio, Japón). Se obtuvieron imágenes de toda la raíz o secciones de nervios transversales con un aumento final de 100-200 ×, y se capturaron una serie de campos parcialmente solapados que cubrían el área de la sección transversal de las raíces o los nervios con un aumento final de 400 ×. Estas imágenes se usaron para examinar el grado de mielinización anormal en ambos grupos, como se describió anteriormente (22, 32, 63). En resumen, todos los axones desmielinizados, remielinizados y mielinizados normalmente se contaron mediante el uso de los siguientes criterios: los axones mayores de 1 µm sin vaina de mielina se consideraron desmielinizados, los axones con vainas de mielina <10 % del diámetro axonal y/o los axones rodeados por “bulbos de cebolla”(es decir, los procesos y la matriz extracelular de las células de Schwann dispuestos circunferencialmente) se consideraron remielinizados, y otros axones mielinizados se consideraron mielinizados normalmente.

Además, se contó el número de macrófagos espumosos presentes dentro de la sección transversal completa de cada raíz o nervio, como una indicación de inflamación. Los macrófagos se identificaron en secciones semifinas a un aumento de 400 x como células cargadas de restos de mielina, desprovistas de una membrana basal y que extienden pequeños procesos similares a microvellosidades, como se describió anteriormente (64, 65). El conteo de macrófagos se calculó como la relación por 1000 fibras mielinizadas, para tener en cuenta las diferencias de tamaño entre diferentes raíces y nervios espinales. Todos los análisis patológicos se realizaron sin conocer la condición de tratamiento de cada ratón.

Los resultados se muestran en la Figura 6 y la Tabla 7 (para las raíces espinales anteriores), la Figura 7 y la Tabla 8 (para los nervios ciáticos) y la Figura 8 y la Tabla 9 (para los nervios motores femorales). Estos resultados muestran una mielinización mejorada de las raíces espinales, los nervios ciáticos y los nervios femorales en comparación con el grupo de control tratado de forma simulada con menos fibras

desmielinizadas y remielinizadas, junto con una relación mejorada de fibras mielinizadas de manera anormal. Todas las muestras mostraron una reducción en el número de macrófagos espumosos en el grupo tratado con GJB1, lo que indica una reducción de la inflamación en el grupo tratado.

Tabla 7: Resultados del análisis morfométrico de las raíces lumbares anteriores en ratones Cx32 KO tratados intratecalmente a los 10 meses de edad:

	Inyectado con AAV9-Mpz.Egfp (simulado)	Inyectado con AAV9-Mpz.GJB1 (completo)	Prueba de Mann-Whitney
Raíces lumbares anteriores	(n = 10 ratones)	(n = 10 ratones)	
Relación de fibras mielinizadas de manera anormal	0,315 ± 0,016	0,215 ± 0,032	p = 0,0147
Número de macrófagos/1000 fibras	14,85 ± 1,38	9,31 ± 1,20	p = 0,0068

Tabla 8: Resultados del análisis morfométrico de los nervios ciáticos en ratones Cx32 KO tratados intratecalmente a los 10 meses de edad:

	Inyectado con AAV9-Mpz.Egfp (simulado)	Inyectado con AAV9-Mpz.GJB1 (completo)	Prueba de Mann-Whitney
Nervios ciáticos	(n = 10 ratones)	(n = 10 ratones)	
Relación de fibras mielinizadas de manera anormal	0,105 ± 0,004	0,058 ± 0,003	p < 0,0001
Número de macrófagos/1000 fibras	7,76 ± 0,48	3,84 ± 0,69	p = 0,0005

Tabla 9: Resultados del análisis morfométrico de los nervios motores femorales en ratones Cx32 KO tratados intratecalmente a los 10 meses de edad:

	Inyectado con AAV9-Mpz.Egfp	Inyectado con AAV9-Mpz.GJB1	Prueba de Mann-Whitney
Nervios femorales	(n = 9 ratones)	(n = 10 ratones)	
Relación de fibras mielinizadas de manera anormal	0,333 ± 0,012	0,207 ± 0,009	p <0,0001
Número de macrófagos/1000 fibras	10,03 ± 0,47	4,87 ± 0,73	p <0,0001

Ejemplo 9: Desarrollo de vectores AAV para la expresión dirigida a células de Schwann conducida por elementos promotores mínimos (miniMpz)

El enfoque basado en AAV9 descrito en los ejemplos anteriores tiene un potencial alto de traducción clínica para tratar otros tipos de CMT desmielinizantes, que incluyen la CMT4C. Sin embargo, es necesario superar la limitación de la capacidad transgénica más pequeña en los vectores AAV.

Para facilitar la expresión génica dirigida a las células de Schwann mediada por AAV, los inventores clonaron una versión mínima del promotor de Mpz. A partir del promotor de Mpz de longitud completa de 1,127 kb (SEQ ID NO. 4) y sobre la base de los datos de potenciador/ChIP-seq que indican que los elementos reguladores funcionales (sitios de unión de Egr2 y Sox10) del promotor de Mpz de longitud completa están ubicados dentro de 400 pb aguas arriba del codón de inicio (56), los inventores seleccionaron esta estrategia para lograr la expresión dirigida en las células de Schwann con un promotor de tamaño mínimo para permanecer dentro de la capacidad de transporte del vector AAV. Los inventores amplificaron por PCR los 410 pb del promotor de Mpz aguas arriba del codón de inicio y después clonaron adicionalmente este promotor miniMpz en el plásmido de transferencia AAV junto con Egfp aguas abajo como gen indicador y produjeron el vector AAV9-miniMpz.Egfp (SEQ ID NO. 3 y Figura 9).

Este vector AAV9-miniMpz.Egfp también se validó *in vivo* en ratones de tipo salvaje (WT) de 2 meses mediante el uso del mismo método de suministro que se

describe en el Ejemplo 3 mediante una inyección intratecal lumbar única, y se ha demostrado que conduce a la expresión del gen indicador EGFP en un porcentaje alto de las células de Schwann mielinizantes en todo el SNP. Esto mostró una expresión generalizada del vector que se restringió principalmente a las células de Schwann mielinizantes en los tejidos del SNP, con más del 50 % de relaciones de expresión y números de copias de vectores (VCN) elevados en las raíces espinales lumbares y los nervios periféricos (Figura 10).

La inmunotinción de tejido de la médula espinal de ratones inyectados con AAV9-miniMpz-Egfp que se llevó a cabo de manera similar a como se describe en el Ejemplo 4 con marcadores celulares que incluyen NeuN neuronal, GFAP astrocítico y CC-1 oligodendrocítico en las materias blanca y gris combinados con EGFP mostró expresión de la construcción conducida por miniMpz sólo en un subconjunto muy pequeño de aproximadamente 2-3 % de neuronas y células gliales en el SNC cuantificado a partir de n = 3-5 ratones (Figura 11).

Los resultados se muestran en la Figura 10 (raíz lumbar y nervio ciático) y en la Figura 11 (médula espinal lumbar) y demuestran que la expresión de EGFP se distribuye adecuadamente en la raíz lumbar y el nervio ciático y que existe una expresión mínima en la médula espinal lumbar, lo que muestra que después de la inyección existe biodistribución del vector y expresión de la proteína indicadora EGFP en las células de Schwann en el sistema nervioso periférico.

Ejemplo 10: Eficacia del tratamiento de terapia génica en un modelo de CMT1X cuando se trata preventivamente en las primeras etapas de la neuropatía

Los grupos de ratones con Cx32 inactivada (KO) de 2 meses de edad, un modelo de CMT1X (n = 10 ratones por grupo), se inyectaron a la edad de 2 meses con el vector terapéutico (completo) AAV9-Mpz-GJB1 o con el vector de control negativo (simulado) AAV9-Mpz-Egfp. El análisis del comportamiento se realizó antes del tratamiento y a los 4 y 6 meses de edad. El análisis electrofisiológico se llevó a cabo a los 6 meses de edad, seguido de un análisis morfológico de secciones semifinas de tejidos nerviosos periféricos. Se usaron los mismos protocolos que se describen en los Ejemplos 6-8 anteriores, aparte de que los ratones se trataron a la edad de 2 meses.

Estos datos proporcionan un modelo para el tratamiento preventivo de ratones en las primeras etapas de la neuropatía (2 meses de edad) además del tratamiento terapéutico en una etapa posterior de 6 meses (Ejemplos 6-8).

Resultado del comportamiento en ratones de 6 meses de edad Cx32 KO tratados frente a los tratados de forma simulada

Se realizó el tratamiento de grupos de ratones de 2 meses de edad con Cx32 inactivada (KO), un modelo de CMT1X, con el vector terapéutico (completo) o de control negativo (simulado) y se examinó la fuerza motora de los ratones a los 4 y 6 meses de edad. El grupo tratado completamente mostró una mejora significativa de la fuerza muscular en ambos puntos de tiempo en comparación con el grupo tratado de forma simulada (Figura 12 A y B). El grupo completamente tratado también mostró una mejora significativa con el tiempo después del tratamiento (Figura 12C), mientras que los ratones tratados de forma simulada no mostraron ninguna mejora.

Estudios electrofisiológicos en ratones Cx32 KO de 6 meses de edad tratados preventivamente frente a los tratados de forma simulada

En la Figura 13 se muestran los estudios electrofisiológicos en ratones Cx32 KO de 6 meses tratados (completos) y tratados de forma simulada con una mejora significativa de las velocidades de conducción del nervio ciático después del tratamiento de terapia génica.

La Figura 13 muestra la mejora significativa de la velocidad de conducción del nervio ciático en ratones Cx32 KO tratados preventivamente con AAV9-Mpz-GJB1 (vector completo) en comparación con los tratados con el vector simulado.

Estudios morfológicos en tejidos de nervios periféricos en ratones Cx32 KO de 6 meses de edad tratados frente a los tratados de forma simulada

Los estudios morfológicos en tejidos de nervios periféricos en ratones Cx32 KO de 6 meses de edad tratados frente a los tratados de forma simulada. Se examinaron secciones semifinas de raíces lumbares anteriores (Figura 14), nervios ciáticos medios (Figura 15) y nervios motores femorales (Figura 16) y se cuantificó la relación de fibras mielinizadas de manera anormal, así como también el número de macrófagos en los grupos de ratones Cx32 KO tratados completamente en comparación con los tratados de forma simulada a la edad de 6 meses.

Como se muestra en cada una de las Figuras 14, 15 y 16, se encontraron menos fibras desmielinizadas (*) o remielinizadas (r) y menos macrófagos espumosos en los ratones tratados en comparación con los tratados de forma simulada. Esto es un indicativo de una mielinización mejorada y una reducción de la inflamación en el grupo tratado.

Ejemplo 11: Desarrollo de un vector terapéutico humanizado para tratar la CMT1X

Los vectores descritos en el Ejemplo 1 están controlados por el promotor de Mpz de rata. Para humanizar esta construcción y hacerla más adecuada para aplicaciones

clínicas, los inventores también han clonado una construcción Mpz-GJB1 humana (SEQ ID NO: 17) mediante el uso de un promotor hP0 humano (SEQ ID NO: 18) que pueden usarse para pruebas preclínicas de respuesta a la dosis y estudios de toxicidad y biodistribución en primates no humanos (NHP). La secuencia de P0 humana se amplificó por PCR a partir de ADN genómico mediante el uso de cebadores para introducir las enzimas de restricción KpnI y AgeI. Los cebadores fueron: KpnhP0-F- 5'-AGGGGTACCGCCTGGCATAAAC-3' (SEQ ID NO. 25) y AgehP0-R-5'- AATTTACCGGTGCTGGGGCAG-3' (SEQ ID NO. 26). Después de la ligación de hP0, se cortó el ORF de Cx32 a partir de una construcción preexistente mediante el uso de BamHI y XhoI. Se ligó Cx32 en la construcción de transferencia de AAV y se confirmó el ensamblaje correcto del casete de expresión mediante mapeo de digestión de restricción y secuenciación directa.

También se generó un plásmido de vector simulado humanizado (Mpz-Egfp humano) para el uso como control (SEQ ID NO: 19).

Ejemplo 12: Desarrollo y análisis de expresión de un vector terapéutico para tratar la CMT4C

Se desarrolló una construcción mini-Mpz-SH3TC2.myc similar a las descritas en el Ejemplo 9 que usa el promotor derivado de rata mini Mpz de la SEQ ID NO. 5 anterior, mediante el uso del inserto del gen SH3TC2 y con modificaciones adicionales en el segmento ITR-ITR (que incluye la eliminación de WPRE y el reemplazo de poliA con un poliA sintético mínimo) (68, 69) para permanecer dentro del límite aproximado de 4700 pb para permitir un empaquetado eficiente en el AAV9. La secuencia de este vector terapéutico se muestra en la SEQ ID NO: 20.

El análisis de la expresión de este vector terapéutico novedoso (mini-Mpz-SH3TC2.myc) se realizó en grupos de ratones del modelo de CMT4C. Estos resultados complementan el desarrollo del vector promotor mínimo de Mpz que dirige la expresión del gen indicador descrito en el Ejemplo 9 anterior.

La construcción novedosa AAV-miniMpz-SH3TC2.myc se produjo y empaquetó en el serotipo AAV9 que logra títulos de 5×10^{12} vg/ml. El vector (total de 1×10^{11} vg en un volumen de 20 μ l) se suministró mediante inyección intratecal lumbar en ratones Sh3tc2^{-/-} de 5 meses (n = 5) y se examinó la expresión 5 semanas después de la inyección en secciones de la raíz espinal lumbar y del nervio ciático bilateral fijados.

La expresión de SH3TC2 se detectó en un porcentaje alto de las células de Schwann mielinizantes en todo el SNP, lo que incluye las raíces y los nervios ciáticos, en un aspecto granular perinuclear característico y ocasionalmente a lo largo de toda

la longitud de la célula de Schwann (Figuras 17A-F). La cuantificación del porcentaje de las células de Schwann inmunorreactivas a SH3TC2 mostró una tasa de expresión promedio del 54.67 % en las raíces lumbares y del 45.39 % en los nervios ciáticos (Figura 17G).

Estos resultados indican que la construcción logró un buen nivel de expresión en las células de Schwann mielinizantes en todo el SNP.

Ejemplo 13: Desarrollo de un vector terapéutico humanizado para tratar la CMT4C

Se modificó la construcción mini-Mpz-SH3TC2.myc (SEQ ID NO: 20) (como se describe en el Ejemplo 12 anterior) que es muy adecuada para pruebas preclínicas (debido a la inclusión de la versión mínima del promotor de Mpz de rata y la etiqueta myc en SH3TC2 para facilitar el análisis de expresión preclínico) para que sea más adecuado para la aplicación clínica (SEQ ID NO: 21).

Se eliminó la etiqueta myc y se reemplazó la versión mínima del promotor de rata por la secuencia correspondiente del promotor de Mpz humano mínimo (SEQ ID NO: 22). Este vector puede usarse para las pruebas finales preclínicas de respuesta a la dosis y los estudios de toxicidad y biodistribución del NHP antes de pasar a las aplicaciones clínicas. También se generó un plásmido de vector simulado humanizado (miniMpz-Egfp humano) (SEQ ID NO: 23).

REFERENCIAS

1. Baets J, De Jonghe P, Timmerman V. Recent advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Opin Neurol*. 2014; 27 (5): 532-40.
2. Kleopa KA, Scherer SS. Inherited Neuropathies. *Neurol Clinics North America*. 2002; 20: 679-709.
3. Kleopa KA, Kagiava A, Sargiannidou I. Gene Therapy for CMT Inherited Neuropathy. En: Duan D, Mendell J (eds): *Muscle Gene Therapy*. 2019; https://doi.org/10.1007/978-3-030-03095-7_35 (Springer, Cham).
4. Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Orton-Scott M, Bone L, Paul DL, y otros. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science*. 1993; 262: 2039-42.
5. Kleopa KA, Scherer SS. Molecular genetics of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med*. 2006; 8: 107-22.
6. Hahn AF, Brown WF, Koopman WJ, Feasby TE. X-linked dominant hereditary motor and sensory neuropathy. *Brain*. 1990; 113: 1511-25.

7. Birouk N, Le Guern E, Maisonobe T, Rouger H, Gouider R, Gugenheim M, y otros. X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with connexin 32 mutations - clinical and electrophysiological study. *Neurology*. 1998; 50: 1074-82.
8. Shy ME, Siskind C, Swan ER, Krajewski KM, Doherty T, Fuerst DR, y otros. CMT1X phenotypes represent loss of GJB1 gene function. *Neurology*. 2007; 68: 849-55.
9. Dubourg O, Tardieu S, Birouk N, Gouider R, Léger JM, Maisonobe T, y otros. Clinical, electrophysiological and molecular genetic characteristics of 93 patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain*. 2001; 124: 1958-67.
10. Liang GSL, de Miguel M, Gomez-Hernandez JM, Glass JD, Scherer SS, Mintz M, y otros. Severe neuropathy with leaky connexin32 hemichannels. *Ann Neurol*. 2005; 57: 749-54.
11. Al-Mateen M, Craig AK, Chance PF. The Central Nervous System Phenotype of X-Linked Charcot-Marie-Tooth Disease: A Transient Disorder of Children and Young Adults. *J Child Neurol*. 2014; 29: 342-8
12. Hahn AF, Ainsworth PJ, Bolton CF, Bilbao JM, Vallat JM. Pathological findings in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease: a morphometric and ultrastructural analysis. *Acta Neuropathol*. 2001; 101: 129-39.
13. Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, Koike H, Nakagawa M, Yoshikawa H, y otros. Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients. *Brain*. 2003; 126: 134-51.
14. Kleopa KA, Zamba-Papanicolaou E, Alevra X, Nicolaou P, Georgiou DM, Hadjisavvas A, y otros. Phenotypic and cellular expression of two novel connexin32 mutations causing CMT1X. *Neurology*. 2006; 66: 396-402.
15. Omori Y, Mesnil M, Yamasaki H. Connexin 32 mutations from X-linked Charcot-Marie-Tooth disease patients: functional defects and dominant negative effects. *Mol Biol Cell*. 1996; 7 (6): 907-16.
16. Yoshimura T, Satake M, Ohnishi A, Tsutsumi Y, Fujikura Y. Mutations of connexin32 in Charcot-Marie-Tooth disease type X interfere with cell-to-cell communication but not cell proliferation and myelin-specific gene expression. *J Neurosci Res*. 1998; 51 (2): 154-61.
17. Yum SW, Kleopa KA, Shumas S, Scherer SS. Diverse trafficking abnormalities of Connexin32 mutants causing CMTX. *Neurobiol Dis*. 2002; 11: 43-52.

18. Deschênes SM, Walcott JL, Wexler TL, Scherer SS, Fischbeck KH. Altered trafficking of mutant connexin32. *J Neurosci*. 1997; 17: 9077-84.
19. Oh S, Ri Y, Bennett MVL, Trexler EB, Verselis VK, Bargiello TA. Changes in permeability caused by connexin 32 mutations underlie X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron*. 1997; 19 (4): 927-38.
20. Martin PEM, Mambetisaeva ET, Archer DA, George CH, Evans WH. Analysis of gap junctions assembly using mutated connexins detected in Charcot-Marie-Tooth X-linked disease. *J Neurochem*. 2000; 74: 711-20.
21. Kleopa KA, Yum SW, Scherer SS. Cellular mechanisms of connexin32 mutations associated with CNS manifestations. *J Neurosci Res*. 2002; 68: 522-34.
22. Sargiannidou I, Vavlitou N, Aristodemou S, Hadjisavvas A, Kyriacou K, Scherer SS, y otros. Connexin32 mutations cause loss of function in Schwann cells and oligodendrocytes leading to PNS and CNS myelination defects. *J Neurosci*. 2009; 29: 4748-61.
23. Sargiannidou I, Kim GH, Kyriakoudi S, Eun BL, Kleopa KA. A start codon CMT1X mutation associated with transient encephalomyelitis causes complete loss of Cx32. *Neurogenetics*. 2015; 16 (3): 193-200.
24. Anzini P, Neuberg DH-H, Schachner M, Nelles E, Willecke K, Zielasek J, y otros. Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin32. *J Neurosci*. 1997; 17: 4545-61.
25. Scherer SS, Xu YT, Nelles E, Fischbeck K, Willecke K, Bone LJ. Connexin32-null mice develop a demyelinating peripheral neuropathy. *Glia*. 1998; 24: 8-20.
26. Scherer SS, Xu YT, Messing A, Willecke K, Fischbeck KH, Jeng LJ. Transgenic expression of human connexin32 in myelinating Schwann cells prevents demyelination in connexin32-null mice. *J Neurosci*. 2005; 25: 1550-9.
27. Abel A, Bone LJ, Messing A, Scherer SS, Fischbeck KF. Studies in transgenic mice indicate a loss of connexin32 function in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999; 58: 702-10.
28. Jeng LJ, Balice-Gordon RJ, Messing A, Fischbeck KH, Scherer SS. The effects of a dominant connexin32 mutant in myelinating Schwann cells. *Mol Cell Neurosci*. 2006; 32: 283-98.
29. Kagiava A, Karaiskos C, Richter J, Tryfonos C, Lapathitis G, Sargiannidou I, y otros. Intrathecal gene therapy in mouse models expressing CMT1X mutations. *Hum Mol Genet*. 2018; 27 (8): 1460-73.

30. Huang Y, Sirkowski EE, Stickney JT, Scherer SS. Prenylation-defective human connexin32 mutants are normally localized and function equivalently to wild-type connexin32 in myelinating Schwann cells. *J Neurosci*. 2005; 25: 7111-20.
31. Hahn AF, Ainsworth PJ, Naus CCG, Mao J, Bolton CF. Clinical and pathological observations in men lacking the gap junction protein connexin 32. *Muscle Nerve*. 2000: S39-S48.
32. Sargiannidou I, Kagiava A, Bashiardes S, Richter J, Christodoulou C, Scherer SS, y otros. Intraneural GJB1 gene delivery improves nerve pathology in a model of CMT1X. *Ann Neurol*. 2015; 78: 303-16.
33. Kagiava A, Sargiannidou I, Theophilidis G, Karaiskos C, Richter J, Bashiardes S, y otros. Intrathecal gene therapy rescues a model of demyelinating peripheral neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113 (17): E2421-9. doi: 10.1073/pnas.1522202113.
34. Kyriakoudi S, Sargiannidou I, Kagiava A, Olympiou M, Kleopa KA. Golgi-retained Cx32 mutants interfere with gene addition therapy for CMT1X. *Hum Mol Genet*. 2017; 26 (9): 1622-33.
35. Fridman V, Bundy B, Reilly MM, Pareyson D, Bacon C, Burns J, y otros. CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: a cross-sectional analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015; 86 (8): 873-8.
36. Kessali M, Zemmouri R, Guilbot A, Maisonobe T, Brice A, LeGuern E, y otros. A clinical, electrophysiologic, neuropathologic, and genetic study of two large Algerian families with an autosomal recessive demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology*. 1997; 48 (4): 867-73.
37. Gabreels-Festen A, van Beersum S, Eshuis L, LeGuern E, Gabreels F, van Engelen B, y otros. Study on the gene and phenotypic characterisation of autosomal recessive demyelinating motor and sensory neuropathy (Charcot-Marie-Tooth disease) with a gene locus on chromosome 5q23-q33. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999; 66 (5): 569-74.
38. Azzedine H, Ravise N, Verny C, Gabreels-Festen A, Lammens M, Grid D, y otros. Spine deformities in Charcot-Marie-Tooth 4C caused by SH3TC2 gene mutations. *Neurology*. 2006; 67 (4): 602-6.
39. Gooding R, Colomer J, King R, Angelicheva D, Marns L, Parman Y, y otros. A novel Gypsy founder mutation, p.Arg1109X in the CMT4C gene, causes variable peripheral neuropathy phenotypes. *J Med Genet*. 2005; 42 (12): e69.

40. Colomer J, Gooding R, Angelicheva D, King RH, Guillen-Navarro E, Parman Y, y otros. Clinical spectrum of CMT4C disease in patients homozygous for the p.Arg1109X mutation in SH3TC2. *Neuromuscul Disord*. 2006; 16 (7): 449-53.
41. Varley TL, Bourque PR, Baker SK. Phenotypic variability of CMT4C in a French-Canadian kindred. *Muscle Nerve*. 2015.
42. Senderek J, Bergmann C, Stendel C, Kirfel J, Verpoorten N, De Jonghe P, y otros. Mutations in a Gene Encoding a Novel SH3/TPR Domain Protein Cause Autosomal Recessive Charcot-Marie-Tooth Type 4C Neuropathy. *Am J Hum Genet*. 2003; 73: 1106-19.
43. LeGuern E, Guilbot A, Kessali M, Ravise N, Tassin J, Maissonobe T, y otros. Homozygosity mapping of an autosomal recessive form of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 5q23-q33. *Hum Mol Genet*. 1996; 5 (10): 1685-8.
44. Lassuthova P, Mazanec R, Vondracek P, Siskova D, Haberlova J, Sabova J, y otros. High frequency of SH3TC2 mutations in Czech HMSN I patients. *Clin Genet*. 2011; 80 (4): 334-45.
45. Lupo V, Galindo MI, Martinez-Rubio D, Sevilla T, Vilchez JJ, Palau F, y otros. Missense mutations in the SH3TC2 protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4C affect its localization in the plasma membrane and endocytic pathway. *Hum Mol Genet*. 2009; 18 (23): 4603-14.
46. Arnaud E, Zenker J, de Preux Charles AS, Stendel C, Roos A, Medard JJ, y otros. SH3TC2/KIAA1985 protein is required for proper myelination and the integrity of the node of Ranvier in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106 (41): 17528-33.
47. Gouttenoire EA, Lupo V, Calpena E, Bartesaghi L, Schupfer F, Medard JJ, y otros. Sh3tc2 deficiency affects neuregulin-1/ErbB signaling. *Glia*. 2013; 61 (7): 1041-51.
48. Zoupi L, Savvaki M, Karagogeos D. Axons and myelinating glia: An intimate contact. *IUBMB Life*. 2011; 63 (9): 730-5.
49. Schiza N, Georgiou E, Kagiava A, Médard JJ, Richter J, Tryfonos C, y otros. Gene replacement therapy in a model of Charcot-Marie-Tooth 4C neuropathy. *Brain*. 2019; 142 (5): 1227-1241.
50. Tanguy Y, Biferi MG, Besse A, Astord S, Cohen-Tannoudji M, Marais T, y otros. Systemic AAVrh10 provides higher transgene expression than AAV9 in the brain and the spinal cord of neonatal mice. *Front Mol Neurosci*. 2015; 8:36.

51. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol.* 2009;27(1):59-65.
52. Gurda BL, De Guilhem De Lataillade A, Bell P, Zhu Y, Yu H, Wang P, y otros. Evaluation of AAV-mediated Gene Therapy for Central Nervous System Disease in Canine Mucopolysaccharidosis VII. *Mol Ther.* 2016; 24 (2): 206-16.
53. Calcedo R, Wilson JM. Humoral Immune Response to AAV. *Front Immunol.* 2013; 4: 341.
54. Jackson KL, Dayton RD, Klein RL. AAV9 supports wide-scale transduction of the CNS and TDP-43 disease modeling in adult rats. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2015; 2: 15036.
55. Meyer K, Ferraiuolo L, Schmelzer L, Braun L, McGovern V, Likhite S, y otros. Improving single injection CSF delivery of AAV9-mediated gene therapy for SMA: a dose-response study in mice and nonhuman primates. *Mol Ther.* 2015; 23 (3): 477-87.
56. Jang SW, Svaren J. Induction of myelin protein zero by early growth response 2 through upstream and intragenic elements. *J Biol Chem.* 2009;284(30):20111-20.
57. von Jonquieres G, Mersmann N, Klugmann CB, Harasta AE, Lutz B, Teahan O, y otros. Glial promoter selectivity following AAV-delivery to the immature brain. *PLoS One.* 2013; 8 (6): e65646.
58. Georgiou E, Sidiropoulou K, Richter J, Papaneophytou C, Sargiannidou I, Kagiava A, y otros. Gene therapy targeting oligodendrocytes provides therapeutic benefit in a leukodystrophy model. *Brain.* 2017; 140 (3): 599-616.
59. Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, Chesnut K, y otros. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* 1999; 6 (6): 973-85.
60. Piedra J, Ontiveros M, Miravet S, Penalva C, Monfar M, Chillon M. Development of a rapid, robust, and universal picogreen-based method to titer adeno-associated vectors. *Hum Gene Ther Methods.* 2015; 26 (1): 35-42.
61. Savvaki M, Panagiotaropoulos T, Stamatakis A, Sargiannidou I, Karatzioula P, Watanabe K, y otros. Impairment of learning and memory in TAG-1 deficient mice associated with shorter CNS internodes and disrupted juxtaparanodes. *Mol Cell Neurosci.* 2008; 39: 478-90.

62. Zielasek J, Martini R, Toyka KV. Functional abnormalities in P0-deficient mice resemble human hereditary neuropathies linked to P0 gene mutations. *Muscle Nerve*. 1996; 19 (8): 946-52.

63. Vavlitou N, Sargiannidou I, Markoullis K, Kyriacou K, Scherer SS, Kleopa KA. Axonal pathology precedes demyelination in a mouse model of X-linked demyelinating/type I Charcot-Marie Tooth neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010; 69: 945-58.

64. Kobsar I, Berghoff M, Samsam M, Wessig C, Maurer M, Toyka KV, y otros. Preserved myelin integrity and reduced axonopathy in connexin32-deficient mice lacking the recombination activating gene-1. *Brain*. 2003; 126: 804-13.

65. Groh J, Heintz K, Kohl B, Wessig C, Greeske J, Fischer S, y otros. Attenuation of MCP-1/CCL2 expression ameliorates neuropathy in a mouse model for Charcot-Marie-Tooth 1X. *Hum Mol Genet*. 2010; 19: 3530-43.

66. Shevtsova, Z. y otros (2005). "Promoters and serotypes: targeting of adeno-associated virus vectors for gene transfer in the rat central nervous system in vitro and in vivo." *Exp Physiol*; 90(1): 53-59

67. von Jonquieres, G. y otros (2016). "Recombinant Human Myelin-Associated Glycoprotein Promoter Drives Selective AAV-Mediated Transgene Expression in Oligodendrocytes." *Front Mol Neurosci*; 9: 13

68. Levitt, N., Briggs, D., Gil, A. y Proudfoot, N.J. (1989). Definition of an efficient synthetic poly(A) site. *Genes Dev*. 3, 1019–1025.

69. Bailey RM, Armao D, Nagabhushan Kalburgi S, Gray SJ. Development of Intrathecal AAV9 Gene Therapy for Giant Axonal Neuropathy. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018 15 de febrero; 9: 160-171.

Las modalidades de la invención se describirán ahora en los párrafos numerados siguientes:

1. Un vector viral para el uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con las células de Schwann en un sujeto que lo necesite, en donde el vector viral comprende una primera secuencia de ácido nucleico que puede transcribirse en un primer polinucleótido y en donde el vector viral es un vector AAV.

2. El vector viral para el uso del párrafo 1, en donde la expresión del primer polinucleótido está bajo el control de un promotor específico de las células de Schwann, opcionalmente un promotor específico de mielina.

3. El vector viral para el uso de los párrafos 1 o 2, en donde la expresión del primer polinucleótido está bajo el control del promotor de la proteína cero de mielina de longitud completa (Mpz), en donde el promotor de longitud completa es un promotor de la proteína cero de mielina de rata o humano de longitud completa.

4. El vector viral para el uso de los párrafos 1-3, en donde la expresión del primer polinucleótido está bajo el control de un promotor que está entre 100 pb y 1100 pb de longitud, en donde opcionalmente el promotor varía de 200 pb a 900 pb de longitud, 300 pb a 800 pb de longitud, 400 pb a 700 pb de longitud, en donde opcionalmente el promotor varía de 500 pb a 600 pb de longitud, en donde opcionalmente el promotor tiene una longitud de 410 pb.

5. El vector viral para el uso del párrafo 4, en donde el promotor es un promotor específico de mielina de longitud completa o mínimo, opcionalmente un promotor mínimo de la proteína cero de mielina (Mpz), en donde opcionalmente el promotor tiene una secuencia con al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 5 o la SEQ ID NO. 22, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 5 o la SEQ ID NO. 22.

6. El vector viral para el uso de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el vector tiene la capacidad de transducir las células de Schwann.

7. El vector viral para el uso de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el vector no se integra en el genoma de la célula huésped.

8. El vector viral para el uso de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el vector AAV se selecciona del grupo que comprende: AAV9 y AAVrh10.

9. El vector viral para el uso del párrafo 8, en donde el vector AAV es un AAV9.

10. El vector viral para el uso de uno cualquiera de los párrafos anteriores en donde el primer polinucleótido codifica y se traduce en un primer polipéptido o proteína.

11. El vector viral para el uso del párrafo 10 en donde el primer ácido nucleico comprende:

a) una secuencia de tipo salvaje o beneficiosa terapéuticamente de un gen asociado con neuropatía, del grupo que comprende o consiste en uno cualquiera de los siguientes genes: el gen de unión en hendidura beta 1 (GJB1); el dominio SH3 y repeticiones tetratricopeptídicas 2 (SH3TC2); la proteína 22 de mielina periférica (PMP22); la proteína cero de mielina (MPZ); la respuesta de crecimiento temprano 2

(EGR2); la proteína asociada con la diferenciación inducida por gangliósidos 1 (GDAP1); regulado aguas abajo de N-Myc 1 (NDRG1) u otros genes asociados con la neuropatía desmielinizante y la disfunción de las células de Schwann; o

b) una secuencia con al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con una secuencia de tipo salvaje de un gen asociado con neuropatía, por ejemplo, uno de los siguientes genes: gen de unión en hendidura beta 1 (GJB1); el dominio SH3 y repeticiones tetratricopeptídicas 2 (SH3TC2); proteína 22 de mielina periférica (PMP22); proteína cero de mielina (MPZ); la respuesta de crecimiento temprano 2 (EGR2); proteína asociada con la diferenciación inducida por gangliósidos 1 (GDAP1); regulado aguas abajo de N-Myc 1 (NDRG1) u otros genes asociados con la neuropatía desmielinizante y la disfunción de las células de Schwann;

en donde opcionalmente el primer ácido nucleico comprende una secuencia con al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con las SEQ ID NO. 6-12, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con las SEQ ID NO. 6-12.

12. El vector viral para el uso de los párrafos 10 u 11 en donde el primer ácido nucleico comprende la forma de tipo salvaje del marco de lectura abierto (ORF) o ADNc que se transcribe en un primer polinucleótido que codifica uno o más polipéptidos, seleccionados opcionalmente del grupo que comprende o consiste en: conexina-32 (Cx32); el dominio SH3 y repeticiones tetratricopeptídicas 2 (SH3TC2); la proteína 22 de mielina periférica (PMP22); la proteína cero de mielina (MPZ); la respuesta de crecimiento temprano 2 (EGR2); proteína asociada con la diferenciación inducida por gangliósidos 1 (GDAP1); regulado aguas abajo de N-Myc 1 (NDRG1).

13. El vector viral para el uso de los párrafos 10-11 en donde el primer ácido nucleico comprende el marco de lectura abierto (ORF) de tipo salvaje del gen de unión en hendidura beta 1 (GJB1).

14. El vector viral para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-13 en donde el vector es capaz de conducir la expresión a partir del primer polinucleótido, opcionalmente conducir la expresión de un primer polipéptido, en donde

opcionalmente el primer polipéptido es la proteína conexina 32 (Cx32), opcionalmente Cx32 de tipo salvaje.

15. El vector viral para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-10 en donde el primer polinucleótido codifica uno o más de los siguientes: un factor trófico (por ejemplo, BDNF, GDNF, NT-3, VEGF), un factor regenerativo (por ejemplo Angiogenina, Oct-6, Egr2, Sox-10), un factor de crecimiento (por ejemplo, IGF).

16. El vector viral para el uso de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en donde la administración del vector viral da como resultado una expresión de una primera proteína del primer polinucleótido que conduce a una del funcionamiento de las células de Schwann y/o un aumento de la formación de la vaina de mielina.

17. El vector viral para el uso de los párrafos 1-9, en donde el primer polinucleótido no codifica un polipéptido, en donde opcionalmente el primer polinucleótido es un ARN no codificante.

18. El vector viral para el uso del párrafo 17, en donde el ARN no codificante es un ARN en horquilla corta (ARNhc); microARN (miARN); ARN guía (ARNg).

19. El vector viral para el uso de uno cualquiera de los párrafos 17 o 18, en donde cuando el vector viral está en un organismo diana, la expresión del ARN no codificante causa una reducción en la expresión de un polinucleótido diana, en donde opcionalmente el polinucleótido diana es un gen ubicado en un organismo diana, ubicado opcionalmente en una célula en un organismo diana.

20. El vector viral para el uso del párrafo 19, en donde la expresión o sobreexpresión del polinucleótido diana en un organismo diana se considera asociada con una enfermedad asociada con las células de Schwann, en donde opcionalmente la enfermedad es una neuropatía desmielinizante dominante (CMT1), en donde opcionalmente el polinucleótido diana es un alelo mutado de la proteína cero de mielina (Mpz/P0) y la enfermedad asociada con las células de Schwann es la CMT1B, o en donde el polinucleótido diana es otro gen dominante asociado con la CMT1.

21. El vector viral para el uso de uno cualquiera de los párrafos 17-20, en donde la administración del vector viral da como resultado una mejora del funcionamiento de las células de Schwann y/o un aumento de la formación de la vaina de mielina.

22. El vector viral para el uso de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en donde la enfermedad asociada con las células de Schwann causa la destrucción y/o la formación reducida de la vaina de mielina por las células de Schwann.

23. El vector viral para el uso de uno cualquiera de los párrafos anteriores, donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad de

Charcot-Marie-Tooth (CMT); neuropatía hereditaria con riesgo de parálisis por presión (HNPP); neuropatías periféricas diabéticas y otras tóxicas; enfermedad de la neurona motora (MND).

24. El vector viral para el uso de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en donde la enfermedad es la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT).

25. El vector viral para el uso del párrafo 24, en donde la enfermedad se selecciona de: Charcot-Marie-Tooth tipo 1X (CMT1X); Charcot-Marie-Tooth tipos 1A-1F (CMT1A-1F); Charcot-Marie-Tooth tipos 4A-4H (CMT4A-4H).

26. El vector viral para el uso del párrafo 25, en donde la enfermedad es Charcot-Marie-Tooth tipo 1X (CMT1X).

27. El vector viral para el uso del párrafo 25, en donde la enfermedad es Charcot-Marie-Tooth tipo 4C (CMT4C).

28. El vector viral para el uso de los párrafos 16 o 21, en donde la función mejorada da como resultado un aumento de la formación de la vaina de mielina por las células de Schwann en comparación con la formación de la vaina de mielina por las células de Schwann en el sujeto antes del tratamiento.

29. El vector viral para el uso del párrafo 28, en donde el aumento de la formación de vaina de mielina por las células de Schwann conduce a una mejora en uno cualquiera o más de los siguientes parámetros:

- a) fuerza muscular;
 - b) velocidad de conducción del nervio ciático; y/o
 - c) respuesta de biomarcadores sanguíneos,
- en comparación con el sujeto antes del tratamiento.

30. El vector viral para el uso del párrafo 28 o 29, en donde la formación mejorada de la vaina de mielina por las células de Schwann conduce a una mielinización mejorada de los nervios periféricos.

31. El vector viral para el uso de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el AAV se administra al sujeto mediante inyección intratecal o inyección intravenosa, preferentemente en donde el AAV se administra mediante inyección intratecal.

32. El vector viral para el uso del párrafo 31 en donde el AAV se administra mediante una de las siguientes vías: inyección intratecal lumbar; inyección intratecal torácica; inyección intratecal cervical.

33. El vector viral para el uso del párrafo 32, en donde el vector viral se administra mediante inyección intratecal lumbar.

34. El vector viral para el uso de los párrafos 31-33, en donde el AAV se administra mediante una inyección intratecal única.

35. El vector viral para el uso de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el sujeto que lo necesita es un sujeto humano.

36. Un vector viral como se define en cualquiera de los párrafos anteriores.

37. Una célula que se ha transducido con un vector viral como se define en cualquiera de los párrafos anteriores, en donde opcionalmente la célula es una célula de Schwann.

38. Un promotor mínimo específico de mielina, en donde el promotor mínimo específico de mielina tiene una homología de secuencia con al menos 75 % de homología de secuencia o identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 5 o la SEQ ID NO. 22, opcionalmente al menos 80 %, u 82 %, u 84 %, u 86 %, u 88 %, o 90 %, o 92 %, o 94 %, o 96 %, o 97 %, o 98 %, o 99 %, o 100 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la SEQ ID NO. 5 o la SEQ ID NO. 22.

39. Un promotor mínimo específico de mielina que comprende o consiste en la secuencia de la SEQ ID NO. 5 o la SEQ ID NO. 22.

40. Una construcción polinucleotídica que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que es un promotor específico de las células de Schwann, opcionalmente un promotor específico de mielina, que comprende opcionalmente el promotor de la proteína cero de mielina (Mpz) o un promotor mínimo específico de mielina como se define en los párrafos 38 o 39, unido operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde el segundo ácido nucleico se transcribe en un primer polinucleótido y en donde la segunda secuencia de ácido nucleico: a) es el marco de lectura abierto o ADNc u otros elementos de un gen; o b) se transcribe en un ARN no codificante.

41. Un vector viral que comprende el promotor mínimo específico de mielina de acuerdo con cualquiera de los párrafos 38 o 39 o la construcción polinucleotídica del párrafo 40.

42. El vector viral para el uso de uno cualquiera de los párrafos 1-35 o el vector viral de los párrafos 36 o 41, en donde el vector tiene la capacidad de transducir las células de Schwann.

43. El vector viral para el uso de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el vector no se integra en el genoma de la célula huésped.

44. Un vector viral de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 42 o 43 que comprende:

- a) un AAV, en donde opcionalmente el vector AAV es un AAV9;
- b) un vector AAV-Mpz.Egfp que comprende un vector AAV9, el promotor de la proteína cero de mielina (Mpz) y el gen indicador de EGFP;
- c) un vector AAV9-Mpz-GJB1 que comprende un vector AAV9, el promotor de la proteína cero de mielina (Mpz) y el marco de lectura abierto (ORF) del gen de unión en hendidura beta 1 (GJB1);
- d) un vector AAV9-miniMpz.Egfp que comprende un vector AAV9, el promotor mínimo de la proteína cero de mielina (miniMpz) y el gen indicador de EGFP;
- e) un vector AAV9-Mpz-GJB1 humano que comprende un vector AAV9, el promotor de la proteína cero de mielina humana de longitud completa (hP0) y el marco de lectura abierto (ORF) del gen de unión en hendidura beta 1 (GJB1) (SEQ ID NO. 17);
- f) un vector AAV9-Mpz-Egfp humano que comprende un vector AAV9, el promotor de la proteína cero de mielina humana de longitud completa (hP0) y el gen indicador de EGFP (SEQ ID NO. 19);
- g) un vector AAV9-miniMpz-SH3TC2.myc.ITR que comprende un vector AAV9, un promotor mínimo de la proteína cero de mielina de rata (Mpz) y el marco de lectura abierto (ORF) del gen SH3TC2 (SEQ ID NO. 20);
- h) un vector AAV9-miniMpz-SH3TC2 humano que comprende un vector AAV9, un promotor mínimo de la proteína cero de mielina humano (hP0) y el marco de lectura abierto (ORF) del gen SH3TC2 (SEQ ID NO. 21); o
- i) un vector AAV9-miniMpz-Egfp humano que comprende un vector AAV9, un promotor mínimo de la proteína cero de mielina humano (hP0) y el gen indicador de EGFP (SEQ ID NO. 23).

45. Una composición farmacéutica que comprende el vector viral de uno cualquiera de los párrafos anteriores.

46. La composición farmacéutica del párrafo 45, en donde la composición comprende una cantidad apropiada del vector viral y además comprende un portador y/o excipiente aceptable farmacéuticamente.

47. Uso de un vector viral de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores en un método de fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con las células de Schwann, en donde opcionalmente la enfermedad causa destrucción y/o formación reducida de la vaina de mielina por las células de Schwann, en donde opcionalmente la enfermedad es la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

48. Un vector viral o construcción polinucleotídica de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores para el uso en un sistema CRISPR/Cas9, en donde el vector viral o polinucleótido comprende uno cualquiera o más de:

- a) un polinucleótido que codifica un ARN guía único (ARNgu) que se dirige a un gen de interés;
- b) un polinucleótido que codifica un polipéptido Cas9;
- c) un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés.

49. Un vector viral de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores, para el uso en un método de marcaje de las células de Schwann, por ejemplo, marcaje con proteína fluorescente, por ejemplo, la proteína verde fluorescente (GFP) o la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP), u otra proteína no fluorescente indicadora, en donde opcionalmente el marcaje de las células de Schwann puede usarse en un método de diagnóstico de una enfermedad asociada con las células de Schwann.

50. Un vector viral de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1-43, para uso en un método en donde se induce a las células de Schwann a diferenciarse en un tipo celular alternativo (por ejemplo, oligodendrocitos, astrocitos o neuronas).

51. Un vector viral de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1-43, para uso en un método de estimulación de las células de Schwann para apoyar la regeneración en un sujeto que lo necesite, opcionalmente después de una lesión o trauma.

52. Un kit para el uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con las células de Schwann, tras marcar las células de Schwann o regenerar las células de Schwann, en donde el kit comprende uno o más de:

- a) un vector viral como se define en cualquiera de los párrafos anteriores;
- b) una construcción polinucleotídica como se define en el párrafo 40;
- c) un vector viral;
- d) un vector viral que comprende la construcción polinucleotídica como se define en el párrafo 40;
- e) un portador y/o excipiente aceptable farmacéuticamente;
- f) una jeringa de un solo uso, por ejemplo una jeringa de un solo uso adecuada para inyección lumbar intratecal;
- g) instrucciones de uso.

53. Un kit de acuerdo con el párrafo 50, en donde el kit comprende más de un vector viral como se define en uno cualquiera de los párrafos anteriores, en donde opcionalmente el kit comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 vectores virales diferentes como se define en cualquiera de los párrafos anteriores.

54. Un vector viral para el uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con las células de Schwann en un sujeto que lo necesite, en donde el vector viral comprende una primera secuencia de ácido nucleico que puede transcribirse en un primer polinucleótido, y en donde la expresión de dicho primer polinucleótido está bajo el control de un promotor mínimo específico de mielina, que opcionalmente comprende o consiste en la secuencia definida en la SEQ ID NO. 5 o la SEQ ID NO. 22, en donde opcionalmente el vector viral es un vector AAV.

Debe entenderse que para los expertos en la técnica serán evidentes varios cambios y modificaciones de las modalidades preferidas actualmente descritas en la presente descripción. Dichos cambios y modificaciones pueden realizarse sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención y sin disminuir las ventajas que se pretenden tener. Por lo tanto, se pretende que dichos cambios y modificaciones estén cubiertos por las siguientes reivindicaciones.