

P-2019/58569

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2019/0014840**

Solicitud de patente a nombre de **UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS.**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la sociedad UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS., domiciliada en Boston, Massachussets, Estados unidos de América, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **14571** notificado electrónicamente el 14 de septiembre de 2021, relacionado con los requerimientos de fondo de la solicitud, atentamente me permito presentar la siguiente información:

1. Título

Indica el examinador que el título no se relaciona con el objeto de la solicitud contenido en la descripción y las reivindicaciones. En vista de lo anterior, el solicitante desea modificar el título así:

*“VECTORES AAV PARA LA EXPRESIÓN SEGURA DEL GEN MECP2 QUE
COMPRENDEN ELEMENTOS REGULADORES DE MIARN (MRE)”*

Este nuevo título se relaciona de manera directa y clara al objeto reclamado, y por lo tanto supera la objeción realizada por el examinador.

2. Modificación a las Reivindicaciones

Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto a este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consta de treintaidós (32) reivindicaciones y reemplaza completamente el presentado el 27 de diciembre de 2019. Específicamente, se realizaron las siguientes modificaciones:

- 2.1.** La reivindicación 1 se modificó de modo que ahora especifica que es un método *in vitro*, que el primer producto es una proteína MeCP2, y especificar que el miARN es un miARN no endógeno. Esta modificación encuentra soporte en la descripción tal como fue originalmente presentada, por ejemplo, en las líneas 9 a 21 de la página 12.
- 2.2.** La reivindicación 2 se reestructuró como una reivindicación dependiente dirigida a definir las características técnicas del paso b del método de la reivindicación 1. Para mejor claridad, las etapas fueron renombradas como b1, b2, b3 y b4.
- 2.3.** Se eliminaron las reivindicaciones 3, 12, 13, 15, 16, 27 a 36 y 44 a 49.
- 2.4.** Las características incluidas en la reivindicación 5 se dividieron en dos reivindicaciones dependientes (nuevas reivindicaciones 4 y 5).
- 2.5.** Se reestructuró la antigua reivindicación 14 (nueva reivindicación 12) para mejorar su claridad.
- 2.6.** Las antiguas reivindicaciones 17 y 27 se fusionaron en una nueva reivindicación independiente (Nueva reivindicación 13).
- 2.7.** Las características incluidas en la reivindicación anterior 23 se dividieron en dos reivindicaciones dependientes (nuevas reivindicaciones 19 y 20).
- 2.8.** La antigua reclamación 36 se renumeró como nueva reclamación 23, la antigua reclamación 26 se renumeró como nueva reclamación 24 y las antiguas reclamaciones 37 a 42 se renumeraron como nuevas reclamaciones 25 a 30. Las dependencias se ajustaron en consecuencia.
- 2.9.** Se incluyeron los números de secuencias (SEQ ID NO:) correspondiente a los miR-132, miR-122 y miR-1 en las antiguas reivindicaciones 6, 9 y 21 (nuevas reivindicaciones 6, 9 y 17).

2.10. Las características incluidas en la antigua reclamación 43 se dividieron en dos reivindicaciones dependientes (nuevas reclamaciones 31 y 32).

2.11. Se eliminaron los términos “*uno o más*”, “*dos o más*”, “*opcionalmente*” y “*al menos*”, que fueron reemplazados por rangos concretos cuando corresponda.

Al respecto, me permito señalar que dichas modificaciones no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud, pues se realizan con el fin de definir la materia reclamada de forma clara y superar las objeciones planteadas por el examinador en su concepto técnico.

3. Excepciones a la patentabilidad

El examinador rechaza las antiguas reivindicaciones 44 a 49 por considerar que harían referencia a un método para tratar el síndrome de Rett, es decir, a materia considerada exceptuada de patentabilidad de acuerdo con lo establecido en el Art. 20 literal (d) de la Decisión 486.

Al respecto, me permito manifestar que las reivindicaciones objetadas no hacen parte del capítulo reivindicatorio presentado junto a este memorial, superando así las objeciones del examinador.

4. Pago de tasas

Considerando que el presente memorial se presenta junto con modificaciones a las reivindicaciones, se adjunta recibo por concepto de pago de tasa de modificación a la solicitud, según lo establecido en la **Resolución 59669 de 2020**.

Ahora, en relación con el número de reivindicaciones, atentamente me permito resaltar que junto a la presente respuesta no se realiza el pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio tiene un número de cláusulas menor que el presentado anteriormente.

5. Claridad y concisión de las reivindicaciones

El solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones presentadas por el examinador en su concepto técnico, de modo tal que las nuevas reivindicaciones reclaman de manera clara y concisa la invención descrita. Con respecto a las objeciones específicas del examinador, me permito manifestar lo siguiente:

- 5.1** El examinador considera que las reivindicaciones 1, 2, 12 y 13, dirigidas a un *"método para modificar un transgén"*, no son concisas pues se refieren a la misma materia. De manera similar, el examinador considera que las reivindicaciones independientes 14 y 15, que se dirigen a *"Un vector AAV recombinante (rAAV) para la expresión autorregulada de una proteína"* y las reivindicaciones 16, 17 y 27, relacionadas con *"Un ácido nucleico recombinante que codifica un transcripto"*, deben fusionarse en una sola reivindicación independiente.

Al respecto por favor tenga en cuenta que, dado que la reivindicación 2 se hizo dependiente de la reivindicación 1 y las antiguas reivindicaciones 12 y 13 se eliminaron, la reivindicación 1 es ahora la única reivindicación independiente dirigida a un método para modificar un transgén. De manera similar, la nueva reivindicación 12 es la única reivindicación independiente dirigida a un vector AAV recombinante (rAAV).

Además, la nueva reivindicación 13 (que reúne las características de las anteriores reivindicaciones 17 y 27) es ahora la única reivindicación independiente dirigida a un ácido nucleico recombinante que codifica una transcripción.

En consecuencia, la objeción planteada al respecto ha sido superada por las modificaciones introducidas en el conjunto de reivindicaciones.

- 5.2** El examinador afirma que las anteriores reivindicaciones 1, 2, 5, 12 y 13 no son claras porque carecen de las características esenciales que permitirían a la persona normalmente versada en la materia a realizar la invención. En vista de lo anterior, el examinador sugiere indicar dichas características, por ejemplo, mencionar en el preámbulo que el método es un método *in vitro* y señalar la identidad del transgén a modificar y de los primero y segundos productos.

Con respecto a esta objeción, el solicitante desea señalar que la reivindicación 1 se modificó siguiendo las recomendaciones del examinador y ahora establece que el método es un método *in vitro* y que el primer producto es una proteína MeCP2.

Ahora, con respecto a la identificación del transgén específico a modificar, me gustaría señalar que esta no es una característica esencial del método reivindicado. El método de la invención se puede aplicar a múltiples transgenes que son capaces de autorregular la expresión de MeCP2 para (a) prevenir la toxicidad relacionada con la sobreexpresión de MeCP2 en el tejido cerebral diana (por ejemplo, usando sitios de unión para miR-132), y (b) prevenir la expresión del transgén en uno o más tejidos no diana. Esto significa que la reivindicación independiente 1 se dirige a un método para todos estos transgenes. Por lo tanto, limitar la reivindicación independiente a un transgén y miARN específicos conduciría a una restricción injusta del objeto reivindicado que podría ser aprovechada por terceros para eludir la protección otorgada por la patente y utilizar la invención del solicitante libremente.

En consecuencia, el solicitante considera que la nueva reivindicación 1 define todas las características necesarias para que una persona normalmente versada en la materia pueda llevar a cabo la invención y, por lo tanto, respetuosamente que se reconsidere la objeción.

5.3 El examinador menciona que el capítulo de reclamaciones incluye términos imprecisos, como "*opcionalmente*", "*uno o más*", "*al menos*" y "*dos o más*".

Al respecto, por favor tenga en cuenta que, si bien el solicitante no comparte la posición del examinador, ha decidido eliminar los términos objetados del pliego reivindicatorio con el fin de facilitar el trámite de la solicitud.

5.4 El examinador considera necesario incluir las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO:) relacionados con los términos "*miR-132*", "*miR-122*", "*miR-1*" en las reivindicaciones 6, 9, 20, 21, 30, 31 y 32.

A este respecto, me permito indicar que las SEQ ID NO: correspondientes se incluyeron en las nuevas reivindicaciones 6, 9 y 17. En consecuencia, amablemente solicito que la objeción al respecto se dé por superada.

5.5 El examinador considera que las reivindicaciones 7 y 10 no son claras, ya que no definen las características técnicas necesarias para su comprensión.

Al respecto me permito manifestar en primer lugar, que la reivindicación 7 fue modificada de modo que ahora se indica el número de sitios de unión para miARN.

En segundo lugar, me gustaría mencionar que las reivindicaciones 7 y 10 son reivindicaciones dependientes, por lo cual incluyen todas las características técnicas de la reivindicación independiente, que son las características que separan la invención del estado de la técnica. Además, las reivindicaciones 7 y 10 se refieren a elementos conocidos en el estado de la técnica, y, por lo tanto, son completamente claros para la persona normalmente versada en la materia, quien estaría en la capacidad de comprender el alcance de la materia reivindicada sin que esta esté limitada los ejemplos mostrados en la descripción.

En consecuencia, solicito respetuosamente que se reconsidere la objeción al respecto.

5.6 El examinador considera que la anterior reivindicación 14 no cuenta con soporte en la descripción porque no define los componentes estructurales del vector reivindicado.

En este sentido, por favor tenga en cuenta que la nueva reivindicación 12 (basada en la anterior reivindicación 14) ahora define que la proteína es una proteína MeCP2, lo cual está soportado por la solicitud tal como se presentó inicialmente.

Por tanto, la objeción ha sido superada.

5.7 El examinador considera que las anteriores reivindicaciones 15 a 17 no están soportadas por la descripción porque no definen los componentes estructurales del vector reivindicado.

En primer lugar, tenga en cuenta que las reclamaciones 15 y 16 se eliminaron del capítulo reivindicatorio, mientras que la antigua reivindicación 17 (nueva reclamación 13) fue restringida al incluir las características técnicas esenciales mencionadas en la reivindicación 27.

Por lo tanto, la nueva reivindicación 13 define todas las características técnicas necesarias para comprender y replicar la invención y corresponde a una generalización razonable del tema divulgado en la solicitud y la objeción al respecto debe superarse.

En vista de lo anterior, las objeciones relacionadas con la claridad, la concisión y el soporte en la descripción del capítulo reivindicatorio, han quedado completamente superadas.

6. Descripción

El examinador menciona que la descripción presenta errores tipográficos y no divulga la materia reclamada de forma suficientemente completa para que una persona normalmente versada en la materia pueda ejecutarla o reproducirla.

Frente a lo anterior, por una parte, me permito resaltar que junto con este memorial de respuesta se presenta una versión corregida de la descripción; dicha versión corregida se ocupa de los errores tipográficos mencionados por el examinador.

De otro lado, por favor tenga en cuenta que el capítulo reivindicatorio se ha modificado para referirse específicamente a métodos y vectores basados en un gen que codifica una proteína MeCP2, la cual es la característica técnica que diferencia la invención reivindicada del estado de la técnica.

Además, dado que la secuencia de la proteína MeCP2, los sitios de unión de miARN y la estructura de la región no codificante 3 'son bien conocidas en el estado de la técnica, el experto en la materia podría replicar la invención incluso cuando la reivindicación no los especifica.

En consecuencia, el solicitante reafirma que la memoria descriptiva presenta toda la información necesaria para reproducir la invención tal como se reivindica.

7. Novedad y nivel inventivo

7.1 Novedad

El examinador señala que el método de la reivindicación 1 carece de novedad en vista de las enseñanzas del documento WO2015164786, titulado " *Recombinant aav vectors useful for reducing immunity against transgene products*" (D1).

Además, el examinador argumenta que el vector AAV recombinante (rAAV) de las reivindicaciones anteriores 14-18, 20, 22-28, 30-35, 37, 39 y 40 carece de novedad sobre las enseñanzas del documento Sinnett S. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, titulado: " *Improved MECP2 Gene Therapy Extends the Survival of MeCP2-Null Mice without Apparent Toxicity after Intracisternal Delivery*" (D2).

A este respecto, me permito resaltar que el artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que la invención se considera nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica. Es decir, de acuerdo con el espíritu de la norma legal indicada, la invención no se considera como nueva si está "comprendida" en el estado de la técnica, dicha norma se está refiriendo, naturalmente, al invento en su totalidad y no a sus componentes de manera aislada.

Al respecto, considero pertinente recalcar que, para considerar que el objeto de la solicitud carece de novedad, se debe contemplar como mínimo los siguientes aspectos:

- El objeto de la invención en estudio debe estar contenida de forma TOTAL y ABSOLUTA en el documento que se menciona como anterioridad; y
- La comparación del objeto de la invención en cuestión y el estado del arte no debe centrarse o limitarse a los elementos de esta que son previamente conocidos, sino de lo inédito y novedoso que la caracteriza. Esto quiere decir que debe analizarse el valor agregado que aporta la invención con sus nuevas características al campo técnico al cual pertenece la solicitud en estudio.

Lo anterior significa que para que un documento del estado de la técnica pueda afectar la novedad de una solicitud, debe revelar todas y cada una de las características técnicas que la definen.

Aplicando lo anterior al caso concreto, para que las razones que aduce ese Despacho para desvirtuar la novedad fuesen ciertas, sería forzoso que se demostrara que la invención está totalmente comprendida en el estado de la técnica, específicamente, en forma individual en los documentos D1 o D2, lo cual no sucede en este caso.

De acuerdo con lo anterior, el solicitante desea señalar respetuosamente que la nueva reivindicación 1 menciona específicamente que el método reivindicado se basa en un primer producto que es una proteína MeCP2 y un miARN no endógeno.

D1 no divulga ni sugiere una composición o un método que utilicen un primer gen que codifica una proteína MeCP2, lo que significa que las características esenciales de la invención no se describen ni se sugieren en el documento D1 citado por el examinador. Por lo tanto, las reivindicaciones modificadas son nuevas a la luz del estado de la técnica.

Ahora, con respecto a la objeción de falta de novedad de las antiguas reivindicaciones 14 a 18, 20, 22 a 28, 30 a 35, 37, 39 y 40 en vista de las enseñanzas de D2, me gustaría mencionar que la característica principal del vector de AAV recombinante (rAAV) de la invención es que el transcrito comprende un primer sitio de unión de miARN específico para un primer miARN que está regulado positivamente por la expresión de

la proteína MeCP2 en la célula. Esta es una característica técnica funcional esencial que define la invención y, por lo tanto, debe ser tenida en cuenta por el examinador al estudiar la solicitud.

Es de resaltar que dicha característica no había sido descrita por D2, porque este documento no revela ni sugiere la inclusión de un sitio de unión de miRNA específico para un primer miRNA en un transcrito que está regulada positivamente por la expresión de la proteína expresada por el transcrito.

Por lo tanto, dado que ninguno de los documentos D1 y D2 divulga de forma TOTAL Y ABSOLUTA las características técnicas esenciales de la materia definida en las reivindicaciones independientes de la presente solicitud, es posible manifestar que la presente solicitud cumple con el requisito de novedad estipulado en el artículo 16 de la Decisión 486.

7.2 Nivel Inventivo

De otro lado, el examinador considera que las reivindicaciones 2-11, 19, 21, 29, 36-38 carecen de nivel inventivo sobre las enseñanzas combinadas de D1 y D2.

Con respecto, a lo anterior, me permito resaltar las disposiciones del artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, que establecen que *“se considerará que la invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica”*.

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. Por el contrario, el análisis de nivel inventivo **debe demostrar** la obviedad de la invención y establecer cómo ésta **no** contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace **necesario demostrar** que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

Ahora bien, dichas condiciones no se cumplen para el caso en cuestión, pues, tal como se mostrará más adelante, las enseñanzas del estado de la técnica representada en los documentos D1 y D2 no divulgan ni sugieren la invención con todas sus características técnicas, y, por lo tanto, la materia reclamada es inventiva a la luz del arte previo.

Características de la invención

La invención, según se define en el capítulo reivindicatorio modificado, se refiere a transgenes que incluyen sitios de unión a miARN no endógenos los cuales son capaces de autorregular la expresión de MeCP2 para:

- (a) prevenir la toxicidad relacionada con la sobreexpresión de MeCP2 en el tejido cerebral diana (p. ej., utilizando sitios de unión para miR-132), y
- (b) prevenir la expresión del transgén en uno o más tejidos no diana, es decir, células o tejidos en los que la expresión del transgén es indeseable, como el hígado o el corazón (p. ej., usando sitios de unión para miR-122 y/o miR -1, respectivamente).

Ahora bien, tal como se demuestra en la solicitud (ver, por ejemplo, el Ejemplo 2), la invención permite que estos transgenes puedan administrarse sistémicamente para lograr el efecto deseado en el cerebro mientras se reduce la toxicidad en tejidos no diana.

Con respecto a D1, D2 y sus diferencias con la invención

Como se mencionó anteriormente, D1 no describe ni sugiere una composición o métodos que empleen un primer gen que codifica una proteína MeCP2. De hecho, D1 no menciona en absoluto una proteína MeCP2 ni tampoco se refiere a la aplicación de sitios de unión a miARN no endógeno. De esta manera, tal documento no proporciona ninguna sugerencia que lleve a la persona normalmente versada en la materia a la

invención tal como se define en el capítulo reivindicatorio modificado presentada junto a este memorial.

Asimismo, aunque D2 describe los sitios de unión de miARN que son endógenos a la UTR 3' de MECP2: miR-19, miR-22 y miR-132. Ver p. Ej. página 112 de D2 ("Vectores"), no describe un transcrito que codifique la proteína MeCP2 humana y una región no codificante 3' como se reivindica.

D2 se relaciona con la mejora de la seguridad de la terapia génica para el síndrome de Rett y describe el diseño de un vector de segunda generación que incorpora un vector de segunda generación que contiene un promotor extendido (mMeP426) y sitios de unión de miARN endógenos de la 3' UTR de MeCP2, como se describió anteriormente. Asimismo, D2 no describe la incorporación de sitios de unión de miARN de tejidos no diana.

Visto todo lo anterior, el problema técnico objetivo de las reivindicaciones presentadas junto al presente memorial se puede formular como la provisión de un transgén alternativo que codifica MeCP2 humano que reduce la toxicidad fuera del objetivo.

La solución proporcionada por la solicitud y definida en las reivindicaciones no es obvia a la vista de D1 y D2. Las enseñanzas de D2 se relacionan con la modificación del promotor de MeCP2 endógeno y la UTR 3' de MeCP2 endógena, señalando que estas modificaciones son adecuadas para reducir los efectos fuera del objetivo, tales como la hepatotoxicidad. De hecho, D2 sugiere que se deberían desarrollar vectores de tercera generación para expandir el umbral de dosificación y mejorar la penetración cerebral del transgén MeCP2 (página 112 de D2).

En vista de lo anterior queda claro que D2 no presenta ninguna enseñanza o siquiera sugerencia que le indique a la persona normalmente versada en la materia que deban realizarse más modificaciones para reducir los efectos fuera del objetivo, y tampoco sugiere que el transgén deba ser modificado adicionalmente para incluir sitios de unión de miARN no endógenos.

En particular, a partir de la enseñanza de D2, la persona normalmente versada en la materia entendería que los problemas de toxicidad se han abordado utilizando las modificaciones endógenas, es decir, el documento D2 le indicaría a la persona normalmente versada en la materia que la ruta a seguir es mejorar la entrega del transgén MeCP2. Por lo tanto, la persona normalmente versada en la materia no habría tenido ningún motivo para identificar soluciones adicionales relacionadas con la reducción de la toxicidad del transgén, y mucho menos tendría ninguna sugerencia para incluir sitios de unión de miARN no endógenos como se menciona en el capítulo reivindicatorio modificado.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, está claro que el objeto de la invención no podría haberse derivado evidentemente a partir de las enseñanzas de D1 y D2.

El análisis realizado por el examinador es un análisis retrospectivo

Después de establecer las características de la materia reclamada y las enseñanzas del estado de la técnica, está claro que la única razón por la cual podría considerarse que el objeto de las reivindicaciones es obvio, sería si se realiza un análisis retrospectivo.

En este sentido, me permito resaltar lo establecido en el numeral 2.13.6.3 de la GUÍA PARA EL EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTE DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD publicada por la Superintendencia de Industria y Comercio, en donde se indica que:

"Es importante tener en cuenta que una invención reivindicada que, a primera vista, parece evidente, puede ser inventiva. Una vez formulada una nueva idea, a menudo se puede demostrar teóricamente el modo en el que se podría llegar a ella, a partir de algo conocido, a través de una serie de etapas aparentemente fáciles. El examinador de patentes debe evitar el uso de un análisis ex post facto de este tipo.

Es decir, el estado de la técnica se debe examinar sin el beneficio del conocimiento ofrecido retrospectivamente por la invención reivindicada. La indicación o la sugerencia que permita llegar a la invención reivindicada deben proceder del estado de la técnica o de los conocimientos generales de la persona del oficio normalmente versada en la materia, y no basarse en la divulgación del solicitante.

Uno de los factores que deben tomarse en consideración para establecer si la persona del oficio normalmente versada en la materia hubiera estado motivada a combinar los documentos del estado de la técnica es la probabilidad razonable de éxito como resultado de tal combinación de sugerencias del estado de la técnica, consideradas colectivamente.

En cualquier caso, el examinador de patentes deberá esforzarse por hacer una evaluación práctica conforme a la realidad. Deberá tener en cuenta todo lo que se sabe en cuanto a los antecedentes de la invención reivindicada y dar el valor justo a los argumentos o pruebas pertinentes presentados por el solicitante.

Por lo tanto, teniendo en cuenta que ni D1 ni D2 proporciona indicaciones claras que conduzcan efectivamente a la persona normalmente versada en la materia a la invención como se reivindica, pues no contienen ninguna enseñanza clara sobre la inclusión de sitios de unión de miARN no endógenos para proporcionar un transgén que codifica una proteína MeCP2 que reduce la toxicidad fuera del objetivo, es evidente que el objeto reivindicado no puede considerarse obvio y, por lo tanto, cumple con los requisitos de los artículos 16 y 18 de la Decisión 486 de 2000.

4. Conclusión

Con las modificaciones introducidas y los argumentos presentados puede concluirse que:

- i) El nuevo pliego reivindicatorio se ajusta a las disposiciones del Artículo 34 de la Decisión 486/00;

- ii) La materia reclamada en el nuevo pliego reivindicatorio es susceptible de patentabilidad;
- iii) La invención de la presente solicitud es clara y cuenta con el debido sustento en el capítulo descriptivo, a la vez que se encuentra divulgada de manera suficientemente completa, cumpliendo así con los requerimientos de los Artículos 30 y 28 de la Decisión 486;
- iv) La materia reclamada no ha habido sido descrita en el estado de la técnica, cumpliendo así con lo estipulado en el Art. 16 de la Decisión 486; y
- v) La invención de la presente solicitud no resulta obvia ni se derivada de manera evidente del estado de la técnica, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 18 de la Decisión 486.

Por tanto, atentamente me permito solicitar a ese Despacho otorgar el privilegio de patente solicitado a la solicitud en estudio, toda vez que cumple a cabalidad con los requerimientos de la Decisión 486 de 2000.

Asimismo, respetuosamente solicito a ese Despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

5. Anexos

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por treintaidós (32) reivindicaciones.
- Descripción modificada.
- Recibo de pago por concepto de modificaciones voluntarias.

Señora Directora,


CAROLINA DAZA MONTALVO
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle
TP-141563 CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

REIVINDICACIONES

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

(a) seleccionar un primer gen que codifica un primer producto en una célula, en donde el primer producto es una proteína MeCP2;

(b) seleccionar un miARN no endógeno, cuya expresión es regulada positivamente por el primer producto en la célula; y

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

2. El método *in vitro* para modificar un transgén de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el paso (b) del método además comprende:

(b1) seleccionar un segundo gen que codifica un segundo producto en la célula;

(b2) determinar que la expresión del segundo producto es regulada positivamente por el primer producto en la célula;

(b3) seleccionar un miARN no-endógeno; y

(b4) determinar que la expresión del miARN es regulada positivamente por el segundo producto en la célula.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la proteína MeCP2 es de isoforma e1 de MeCP2 o isoforma e2 de MeCP2.



4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el segundo producto es una proteína, o ácido nucleico.
5. El método de la reivindicación 4 en donde el ácido nucleico es un miARN.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el miARN es miR-132 (SEQ ID: 6).
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el método además comprende modificar la región no codificada 3' del transcripto para comprender uno a tres sitios de unión para un miARN de desorientación.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el miARN de desorientación inhibe la expresión del transgén de células de hígado, corazón, pulmón, músculo, páncreas, o que presentan antígeno.
9. El método de la reivindicación 7 u 8, en donde el miARN de desorientación es miR-122 (SEQ ID: 4), miR-1 (SEQ ID: 5), o miR-122 (SEQ ID: 4) y miR-1 (SEQ ID: 5).
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el paso de modificar el transgén comprende insertar el transgén en un vector.



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

12. Un vector AAV recombinante (rAAV) para expresión autorregulada de una proteína, el vector rAAV comprende un ácido nucleico modificado para expresar en una célula de un tejido objetivo un transcripto que codifica la proteína, en donde el transcripto comprende un primer sitio de unión de miARN específico para un primer miARN no endógeno que está regulado positivamente por la expresión de la proteína MeCP2 en la célula.

13. Un ácido nucleico recombinante que codifica un transcripto que tiene una región de codificación que codifica proteína MeCP2 humana o un fragmento funcional de la misma y una región no codificada 3' que comprende un sitio de unión a miARN no endógeno, en donde el sitio de unión a miARN comprende:

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

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

en donde el transcripto está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) de virus adenoasociado (AAV).

14. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 13, en donde la región de codificación codifica isoforma e1 de MeCP2.

15. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 13 o 14, en donde el MeCP2 humano comprende la secuencia definida en la SEQ ID NO: 1.



16. El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde el sitio de unión específico a miARN para un miARN que regula negativamente la expresión del transcripto comprende un sitio de unión a miR-132 (SEQ ID: 6), en donde el sitio de unión a miARN es dos o tres sitios de unión a miR-132 (SEQ ID: 6).

17. El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en donde el sitio de unión a miARN específico para un miARN inhibe la expresión del transcripto en un tejido no objetivo comprende un sitio de unión a miR-1 (SEQ ID: 5), sitio de unión a miR-122 (SEQ ID: 4), o sitio de unión a miR-1 (SEQ ID: 5) y miR-122 (SEQ ID: 4).

18. El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en donde el sitio de unión a miARN se ubica entre el último codón de la región de codificación y la cola poli A del transcripto.

19. El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, que además comprende un promotor.

20. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 19, en donde el promotor es un promotor de MeCP2 de ratón.

21. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 20, en donde el promotor de MeCP2 de ratón comprende la secuencia definida en la SEQ ID NO: 3.



22. El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 21, en donde el ácido nucleico recombinante se ubica en un plásmido.
23. El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22, en donde los ITR son ITR de AAV2.
24. Un vector viral que comprende el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 23, en donde el vector viral es un vector de virus adenoasociado (AAV), un vector de adenovirus, un vector lentiviral, un vector de herpesvirus, o un vector de baculovirus.
25. Un virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende:
un cápside que alberga el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 23.
26. El rAAV de la reivindicación 25, en donde el ácido nucleico comprende un ITR seleccionado de un ITR de AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, o AAV6.
27. El rAAV de la reivindicación 25 o 26, en donde la cápside comprende una proteína de cápside que facilita el paso del rAAV a lo largo de la barrera hematoencefálica.



28. El rAAV de la reivindicación 27, en donde la proteína de cápside tiene un serotipo seleccionado del grupo que consiste de AAV-PHP.B, AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV2.5, AAV5, AAV6, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAVrh10, AAV-B1, AAV9.45A-Cadena (por ejemplo, AAV9.45-AS), AAV9.45Angiopep, AAV9.47-Angiopep, AAV9.47-AS, AAV-CAM130, y AAV9HR.

29. El rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, en donde la proteína de cápside comprende o consiste de una secuencia definida en la SEQ ID NO: 14 o 15.

30. Una composición que comprende el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 23, el vector viral de la reivindicación 24, o el rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

31. La composición de la reivindicación 30, en donde la composición es formulada para inyección.

32. La composición de la reivindicación 31, en donde la composición es formulada para inyección sistémica (por ejemplo, inyección intravenosa) o inyección intratecal.

MECP2 EN SÍNDROME DE RETT

SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio bajo 35 U.S.C. sección 119(e) de la fecha de presentación de la Solicitud Provisional de EE.UU. con No. de Serie 62/516,060, presentada el 6 de junio de 2017, cuyo contenido completo se incorpora acá por referencia.

10 ANTECEDENTES

El síndrome de Rett es una enfermedad neurológica causada por la pérdida de las mutaciones de función en MeCP2. Se ha observado que la restauración postnatal de expresión de MeCP2 es efectiva en revertir algunos de los fenotipos presentes en ratones con MeCP2, pero permanecen preocupaciones de seguridad. 15. Adicionalmente, estudios que examinan la eficacia terapéutica de ciertos vectores de MeCP2 que codifican la isoforma e1 han observado únicamente el rescate parcial de fenotipos de Rett. Estos estudios se han enfocado típicamente en entrega intravascular (IV) o intracerebroventricular (ICV) prenatal, y en algunos casos se ha encontrado toxicidad hepática letal y cierre de las extremidades posteriores.

20 RESUMEN

Aspectos de la divulgación se relacionan con el descubrimiento que ciertas combinaciones de elementos reguladores (MRE) de miARN, por ejemplo sitios de unión de miARN asociados con ciclos de realimentación negativa de expresión de gen y sitios de unión de miARN que se desorientan de la expresión de transgén de tejidos no objetivos, permiten la expresión ajustable de transgén dentro de un rango reducido compatible con la función normal de proteína y la anulación de la toxicidad de transgén fuera del objetivo. En algunas modalidades, las composiciones y

métodos descritos por la divulgación son por lo tanto útiles para tratar enfermedades y desórdenes asociados con la pérdida de mutaciones de función, por ejemplo, síndrome de Rett el cual está asociado con la pérdida de mutaciones de función en el gen *MECP2*.

5 En consecuencia, en algunos aspectos, la divulgación suministra un método para obtener un transgén, el método comprende: seleccionar un primer gen que codifica un primer producto en una célula; seleccionar un segundo gen que codifica un segundo producto en la célula; determinar que la expresión del segundo producto sea regulada positivamente por el primer producto en la célula; seleccionar un
10 miARN; determinar que la expresión del miARN sea regulada positivamente por el segundo producto en la célula; y obtener un transgén para expresar en la celular un transcripto que tiene una región de codificación que codifica el primer producto y que tiene uno o más sitios de unión para el miARN.

 En algunos aspectos, la divulgación suministra un método para obtener un
15 transgén, el método comprende: seleccionar un primer gen que codifica un primer producto en una célula; seleccionar un miARN, cuya expresión es regulada positivamente por el primer producto en la célula; y, obtener un transgén que expresa un transcripto que tiene una región de codificación que codifica el primer producto y una región no codificada 3' que comprende uno o más sitios de unión
20 para el miARN.

 En algunos aspectos, la divulgación suministra un método para obtener un transgén, el método comprende: seleccionar un primer gen que codifica un primer producto en una célula; seleccionar un segundo gen que codifica un segundo producto en la célula; determinar que la expresión del segundo producto se regula
25 positivamente por el primer producto en la célula; seleccionar un miARN; determinar que la expresión del miARN se regula positivamente por el segundo producto en la célula; y, obtener un transgén para expresar en la célula un transcripto que tiene

una región de codificación que codifica el primer producto y una región no codificada 3' que comprende uno o más sitios de unión para el miARN.

En algunos aspectos, la divulgación suministra un ácido nucleico recombinante que codifica un transcripto que tiene i) una región de codificación que codifica una proteína y ii) dos o más sitios de unión de miARN, en donde los dos o más sitios de unión de miARN comprenden: por lo menos un primer sitio de unión de miARN específico para un primer miARN que es regulado positivamente por la expresión de la proteína en una célula de un tejido objetivo; y por lo menos un segundo sitio de unión de miARN específico para un segundo miARN que es expresado, independiente de la expresión de la proteína, en células de un tejido no objetivo.

En algunos aspectos, la divulgación suministra un ácido nucleico recombinante que codifica un transcripto que tiene una región de codificación que codifica proteína mECP humana o un fragmento funcional de la misma y una región no codificada 3' que comprende uno o más sitios de unión de miARN, en donde el uno o más sitios de unión de miARN comprenden: por lo menos un sitio de unión de miARN específico para un miARN que regula negativamente la expresión del transcripto; y por lo menos un sitio de unión de miARN específico para un miARN que inhibe la expresión del transcripto en un tejido no objetivo.

En algunos aspectos, la divulgación suministra un ácido nucleico recombinante que codifica un transcripto que tiene: una región de codificación que codifica MeCP2 humano o un fragmento funcional del mismo y, una región no codificada 3' que comprende uno o más sitios de unión de miARN, en donde el transcripto es flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) de virus adenoasociado (AAV). En algunas modalidades, un ITR AAV es un ITR AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, o AAV6. En algunas modalidades, los ITR AAV son ITR AAV2. En algunas modalidades, los ITR son secuencias artificiales que reemplazan la función ITR, por ejemplo, como se divulga en WO2016/172008.

En algunos aspectos, la presente divulgación suministra un vector viral que comprende un ácido nucleico recombinante como se describe por la divulgación. En algunas modalidades, un vector viral es un vector de virus adenoasociado (AAV), un vector de adenovirus, un vector lentiviral, un vector de herpesvirus, o un vector de baculovirus.

En algunos aspectos, la divulgación suministra un virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende: un ácido nucleico recombinante como se describe por la divulgación; por lo menos una repetición terminal invertida (ITR) de virus adenoasociado (AAV); y una proteína de cápside.

En algunos aspectos, la divulgación suministra un vector AAV recombinante (rAAV) para expresión autorregulada de una proteína, el vector rAAV comprende un ácido nucleico obtenido para expresar en una célula de un tejido objetivo un transcrito que codifica la proteína, en donde el transcrito comprende por lo menos un primer sitio de unión de miARN específico para un primer miARN, en donde la expresión del primer miARN es regulada positivamente por la expresión de la proteína en la célula.

En algunos aspectos, la divulgación suministra una composición que comprende un ácido nucleico recombinante como se describe por la divulgación, o un rAAV como se describe por la divulgación, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, una composición es formulada para inyección, por ejemplo, inyección sistémica (por ejemplo, inyección intravenosa) o inyección intratecal.

En algunas modalidades, un primer producto es una proteína. En algunas modalidades, la proteína es MeCP2, por ejemplo, isoforma e1 de MeCP2 o isoforma e2 de MeCP2. En algunas modalidades, un primer producto es un miARN o un ARN no codificado largo.

En algunas modalidades, un segundo producto es una proteína, o ácido nucleico. En algunas modalidades, el segundo producto es factor neurotrópico

derivado de hueso (BDNF). En algunas modalidades, el ácido nucleico es un miARN (por ejemplo, miR-132). En algunas modalidades, el primer miARN es miR-132.

En algunas modalidades, por lo menos un sitio de unión de miARN específico para un miARN que regula negativamente la expresión del transcripto comprende
5 un sitio de unión de miR-132, por ejemplo, dos o tres sitios de unión de miR-132.

En algunas modalidades, por lo menos un sitio de unión de miARN específico para un miARN que inhibe la expresión del transcripto en un tejido no objetivo comprende un sitio de unión a miR-1, sitio de unión a miR-122, o sitio de unión a miR-1 y miR-122. En algunas modalidades, el por lo menos un sitio de unión
10 específico para un miARN que inhibe la expresión del transcripto en un tejido no objetivo comprende tres sitios de unión a miR-1 (por ejemplo, 3x-miR-1) y tres sitios de unión a miR-122 (por ejemplo, 3x-miR-122).

En algunas modalidades, los métodos descritos por la divulgación además comprenden el paso de modificar la región no codificada 3' del transcripto para
15 comprende uno o más sitios de unión para uno o más miARN de desorientación. En algunas modalidades, uno o más miARN de desorientación inhiben la expresión del transgén de células de hígado, corazón, pulmón, músculo, páncreas, o inmunes (por ejemplo, que presentan antígeno). En algunas modalidades, uno o más miARN de desorientación son miR-122, miR-1, o miR-122 y miR-1. En algunas modalidades,
20 uno o más miARN de desorientación inhiben la expresión del transgén en células inmunes, tal como células que presentan antígeno (por ejemplo, células dendríticas, macrófagos, etc.). En algunas modalidades, uno o más miARN de desorientación es miR-15a, miR-16-1, miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, miR-21, miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-30b, miR-31, miR-34a, miR-92a-1, miR-106a,
25 miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-142-3p, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-181a, miR-223 o miR-424.

En algunas modalidades, un sitio de unión a miARN o sitios de unión a miARN se ubican entre el último codón de la región de codificación y la cola poli-A del transcripto.

5 En algunas modalidades de los métodos descritos por la divulgación, el paso de modificar el transgén comprende insertar el transgén en un vector. En algunas modalidades, un vector es un vector de clonación, vector de expresión, plásmido, o vector viral.

En algunas modalidades, un ácido nucleico recombinante además comprende un promotor, por ejemplo, un promotor de MeCP2 de ratón. En algunas 10 modalidades, un promotor de MeCP2 de ratón comprende la secuencia definida en la SEQ ID NO: 3.

En algunas modalidades, un ácido nucleico recombinante se ubica en un plásmido.

En algunas modalidades, una proteína de cápside es una proteína de cápside 15 que facilita el cruce del rAAV a lo largo de la barrera hematoencefálica de un sujeto. En algunas modalidades, una proteína de cápside tiene un serotipo seleccionado del grupo que consiste de AAV-PHP.B, AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV2.5, AAV5, AAV6, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAVrh10, AAV-B1, Cadena AAV9.45A (por ejemplo, AAV9.45-AS), AAV9.45Angiopep, AAV9.47-Angiopep, y AAV9.47-AS, AAV5, 20 AAVrh39, AAVrh43, CAM130, y AAV9HR. En algunas modalidades, una proteína de cápside tiene un serotipo como se describe en WO2015/127128, WP2016/054554, WO2016/054557, o WO2016/065001. En algunas modalidades, una proteína de cápside comprende o consiste de una secuencia definida en la SEQ ID NO: 14 o 15 (por ejemplo, AAV-PHP.B o AAV9).

25 En algunos aspectos, la divulgación suministra un método para tratar síndrome de Rett en un sujeto, el método comprende, administrar a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene síndrome de Rett una cantidad efectiva de: un

ácido nucleico recombinante como se describe por la divulgación; un rAAV como se describe por la divulgación; o, una composición como se describe por la divulgación.

En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto humano. En algunas modalidades, un sujeto es menor a 1 año de edad. En algunas modalidades, un sujeto se caracteriza por una mutación en al menos una copia del gen MeCP2, por ejemplo, una pérdida de mutación de función.

En algunas modalidades, un ácido nucleico recombinante, rAAV o composición como se describe por la divulgación es administrada por inyección, por ejemplo, inyección sistémica (por ejemplo, inyección intravenosa) o inyección intratecal. En algunas modalidades, la administración resulta en la cantidad efectiva de ácido nucleico recombinante, rAAV o composición que cruza la barrera hematoencefálica de un sujeto. En algunas modalidades, la administración resulta en un nivel no tóxico de expresión de MeCP2 en el cerebro del sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A-1B muestran la caracterización de nuevos vectores AAV-MeCP2 para terapia de gen segura y efectiva en síndrome de Rett. La Figura 1A muestra una ilustración esquemática de un mecanismo homeostático de autorregulación de MeCP2. La Figura 1B muestra una ilustración esquemática de la estructura de vectores AAV-MeCP2 autorregulados que codifican MeCP2-e2 humano con una etiqueta myc bajo un promotor de MeCP2 de ratón (-223 a +56) y diferentes elementos de reconocimiento de microARN (por ejemplo, miR-122/1T; miR-123T).

Las Figuras 2A-2C muestran la expresión efectiva de AAV2-MeCP2 en células HEK293T. La Figura 2A muestra la expresión de MeCP2 medida por Western Blot. La Figura 2B muestra la expresión de MeCP2 medida por un ensayo de expresión de proteína normalizada (Figura 2B). La Figura 2C muestra un perfil

de toxicidad de células 293T transducidas con AAV2-MeCP2 por cuatro días a una dosis de 30000 gc/célula.

Las Figuras 3A-3C muestran la expresión de AAV2-MeCP2 en neuronas corticales de ratón. La Figura 3A muestra neuronas corticales primarias de ratón que fueron transducidas a dosis de vector AAV en el rango de 1E3-1E5 vg/célula incluyendo AAV-GFP como control. La Figura 3B muestra el análisis de Western Blot de expresión de hME-CP2-myc en neuronas 5 días después de infección con vector 3E4 genoma(dosis)/célula. La Figura 3C muestra la expresión de miR-132 en respuesta al reenvío de AAV2-MeCP2.

Las Figuras 4A-4C muestran datos representativos obtenidos de experimentos en ratón *in vivo*. La Figura 4A muestra ratones tipo salvaje postnatal de 1 día inyectados por medio de la vena facial con AAV que codifica la isoforma e1 de MeCP2 humano que contiene 0, 1x, 2x, o 3x secuencias objetivo de miR-132. Los animales tipo salvaje fueron sacrificados 3 meses después de la inyección y todo el cerebro, corazón y tejido de hígado fueron sometidos a extracción total de ARN, síntesis de cADN y qRT-PCR usando cebadores específicos para la isoforma e1 de MeCP2 humano. Los datos fueron normalizados a AAV-MeCP2 que contiene 3x miR-132 secuencias objetivo, la cual se configuró en 1. La Figura 4B muestra el análisis de expresión de gen de isoforma e1 de MeCP2 humano en cerebro de ratones tipo salvaje seguido por inyección intracraneal de AAV-MeCP2. La Figura 4C muestra el análisis de expresión de gen de isoforma e1 de MeCP2 humano en el cerebro de ratones tipo salvaje seguido por inyección intracraneal de AAV-MeCP2.

La Figura 5 muestra que la expresión de MeCP2 impulsada por construcciones descritas por la divulgación es efectivamente desviada del corazón y el hígado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Aspectos de la divulgación se relacionan, en parte, con vectores AAV capaces de autorregular niveles de expresión de transgén (por ejemplo, MeCP2) para prevenir la toxicidad relacionada con sobreexpresión. En algunas modalidades, el mecanismo autorregulador se basa en la presencia de múltiples copias de un elemento regulador de miARN (por ejemplo, uno o más sitios de unión de miR-132) en el 3'UTR del casete transgén. Como se describe en la sección de Ejemplos, los vectores AAV capaces de autorregular la expresión de transgén, en algunas modalidades, tienen un perfil de eficacia y seguridad mejorado en comparación con otros factores AAV, por ejemplo, vectores AAV que comprende promotores de transgén negativo únicamente. Se debe reconocer que las observaciones descritas en la sección de Ejemplos en el contexto de construcciones de mi-R132/MeCP2 son aplicables a otras construcciones de expresión de transgén que comprenden sitios de unión de otros MiR que regulan la expresión de proteína (por ejemplo, a través de un ciclo de retroalimentación negativa).

En algunas modalidades, las rutas de entrega que son más probables para remediar la entrega global de gen al CNS (por ejemplo, inyección sistémica o inyección intratecal) son probables que resulten en alto nivel de transducción de órganos periféricos donde la expresión de transgén (por ejemplo, MeCP2) se puede volver tóxica. La divulgación se basa, en parte, en el reconocimiento que la combinación de elementos reguladores de miARN (MRE), tales como sitios de unión de miARN (por ejemplo, sitios de unión de miR-122 y sitios de unión de miR-1), con MRE asociados con ciclos de retroalimentación negativa que regulan la expresión de proteína (por ejemplo, sitios de unión de miR-132 para MeCP2), regulan simultáneamente los niveles de expresión de transgén y la expresión de transgén desorientada en órganos periféricos.

En consecuencia, en algunos aspectos, la divulgación suministra un método para modificar un transgén, el método comprende: seleccionar un primer gen que codifica un primer producto en una célula; seleccionar un miARN, cuya expresión

es regulada positivamente por el primer producto en la célula; y, modificar un transgén que expresa un transcripto que tiene una región de codificación que codifica el primer producto y uno o más sitios de unión para el miARN. En algunas modalidades, el uno o más sitios de unión para el miARN se ubican en una región no codificada 3' del transcripto.

En algunos aspectos, la divulgación suministra un método para modificar un transgén, el método comprende: seleccionar un primer gen que codifica un primer producto en una célula; seleccionar un segundo gen que codifica un segundo producto en la célula; determinar que la expresión del segundo producto sea regulada positivamente por el primer producto en la célula; seleccionar un miARN; determinar que la expresión del miARN sea regulada positivamente por el segundo producto en la célula; y, modificar un transgén para expresar en la célula un transcripto que tiene una región de codificación que codifica el primer producto y uno o más sitios de unión para el miARN. En algunas modalidades, el uno o más sitios de unión para el miARN se ubican en una región no codificada 3' del transcripto.

Como se usa acá, “modificar un transgén” se refiere a la producción (por ejemplo, síntesis) de un ácido nucleico recombinante que usa técnicas de clonación de gen, tal como reacción en cadena de polimerasa (PCR), digestión de enzima de restricción, y ligación de ácido nucleico *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Sambrook y otros, Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio, Cold Spring Harbor Press, Col Spring Harbor, NY.

Como se usa acá, un “producto” o “producto de gen” se refiere a un ácido nucleico (por ejemplo, transcripto de ARN, dsARN, miARN, etc.), un péptido, proteína, o polipéptido que es transcrito y/o trasladado de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN). En algunas modalidades, un producto es un transcripto de ARN que comprende una región de codificación de proteína. En algunas modalidades, una región de codificación de proteína codifica una proteína

asociada con una enfermedad causada por una pérdida de mutación de función (por ejemplo, MeCP2). Ejemplos adicionales de proteínas asociadas con una enfermedad causada por una pérdida de mutación de función incluyen pero no se limitan a tirosinasa (Tirosinemia), beta-galactosidasa de ácido lisosomal (GM1-gangliosidosis), beta-hexosaminidasa A y B (enfermedad de Tay-Sach y Sandhoff), aspartoacilasa (ASPA: enfermedad de Canavan), Aspartilglucosaminidasa (Aspartilglucosaminuria), tioesterasa de proteína Palmitoil (enfermedad de Batten Infantil), peptidasa tripeptidil (enfermedad de Batten infantil tardía), α -Galactosidasa (enfermedad de Fabry), α -Fucosidasa (Fucosidosis), proteína/catepsina A protectora (Galactosialidosis), β -Glucosidasa (enfermedad de Gaucher), Galactosilceramidasa (leucodistrofia de célula Globoide), α -Manosidasa (α -Manosidosis), Arilsulfatasa A (leucodistrofia metacromática), α -L-Iduronidasa (Mucopolisacaridosis I), α -N-acetilglucosaminidasa (Mucopolisacaridosis IIIB), Ácido esfingomielinasa (enfermedad de Nieman-Pick), α -Glucosidasa (enfermedad de Pompe) y Ácido Lipasa (enfermedad de Wolman), FOXG1 (Síndrome de FOXG1), CDKL5, N-Glyl, Glut-1 (enfermedad De Vivo), etc.

En algunas modalidades, un producto es un ácido nucleico de interferencia, por ejemplo, un miARN que regula la expresión o actividad de un producto de gen.

En algunas modalidades, un producto regula la expresión de gen o la expresión de proteína de un segundo producto. La regulación de expresión o translación de producto de gen puede ser positiva o negativa. "Regulación positiva" se refiere a un aumento de expresión o actividad de gen (por ejemplo, como resultado de la expresión o actividad de otro producto de gen). "Regulación negativa" se refiere a una disminución o inhibición de expresión o actividad de gen (por ejemplo, como resultado de la expresión o actividad de otro producto de gen a través de un ciclo de retroalimentación).

En algunas modalidades, los productos de gen tales como factores de crecimiento, factores de transcripción (por ejemplo, como se describen en Wang y

otros, Ácidos Nucleicos Res. 2010 Enero; 38 (emisión de base de datos): D119-D122), etc., son capaces de regular la expresión o actividad de transgén en una célula o sujeto. Ejemplos de factores de crecimiento incluyen neurotrofinas, tales como factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor de crecimiento de nervio (NGF), neurotrofina 3, neurotrofina 4, factor neurotrófico derivado de glial (GDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factores de crecimiento de fibroblasto (FGF1 a 23), neurturina, factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF-2), etc.

En algunas modalidades, los transgenes como se describen por la divulgación son modificados para comprender por lo menos un elemento regulador de miARN (por ejemplo, sitio de unión a miARN) que está asociado con un ciclo regulador de expresión de gen (por ejemplo, ciclos de retroalimentación negativa, ciclos de retroalimentación positiva, etc.). Generalmente, los ciclos reguladores de expresión de gen pueden ser endógenos a una célula, o artificiales (por ejemplo, uno o más elementos del ciclo de retroalimentación son provistos a lo largo de un transgén). En un ejemplo de un ciclo de realimentación negativa, la expresión de MeCP2 en una célula causa un aumento de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en la célula, lo cual a su vez aumenta la expresión de miR-132, lo cual a su vez regula la expresión de MeCP2 (Figura 1). Se debe apreciar que, en algunas modalidades, la divulgación se relaciona con ciclos de retroalimentación positiva, los cuales pueden ser usados para amplificar la expresión de transgén.

En algunas modalidades, los transgenes como se describen por la divulgación son modificados para comprender por lo menos un elemento regulador de miARN (por ejemplo, sitio de unión a miARN) que desvía la expresión del transgén de uno o más tejidos no objetivo. como se usa acá “tejido no objetivo” se refiere a un tejido (por ejemplo, células de un tejido) en el cual la expresión del transgén es indeseable. Por ejemplo, en algunas modalidades, la sobreexpresión de MeCP2 en una célula resulta en citotoxicidad hepática; en ese contexto, el tejido

hepático (por ejemplo, células hepáticas) son un tejido no objetivo. En algunas modalidades, un tejido no objetivo es hígado (por ejemplo, células de hígado), corazón (por ejemplo, células de corazón), páncreas (por ejemplo, células pancreáticas), músculo (por ejemplo, células musculares), células inmunes (por ejemplo, células que presentan antígeno, etc.), o cualquier combinación de las mismas.

Como se usa acá, “tejido objetivo” se refiere a un tejido (por ejemplo, células de un tejido) en el cual la expresión de un transgén es preferida con relación a otros tejidos, tal como tejidos no objetivo. En algunas modalidades, un tejido objetivo es un tejido CNS (por ejemplo, células CNS, tales como neuronas). Ejemplos no limitantes de tejido CNS incluyen tejido de cerebro (por ejemplo, neuronas, células gliales, etc.) y tejido de médula espinal.

Generalmente, el uno o más sitios de unión a miARN de un transcripto codificado por un transgén se ubican en la región sin trasladar 3' (3' UTR) del transcripto. En algunas modalidades, el uno o más sitios de unión a miARN se ubican entre el último codón de la región de codificación del transcripto y la cola poli A del transcripto. Sin embargo, se debe apreciar que, en algunas modalidades, uno o más sitios de unión a miARN se ubican en una región diferente al 3'UTR del transcripto, por ejemplo, en un intrón en el extremo 5' del transcripto. El número de sitios de unión a miARN modificados en un transgén como se describe por la divulgación variará dependiendo del producto de gen codificado por el transgén, y puede ser determinado empíricamente por un experto en la materia sin una cantidad indebida de experimentación. Por ejemplo, en algunas modalidades un transgén como se describe por la divulgación comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 sitios de unión a miARN. En algunas modalidades, un transgén como se describe por la divulgación comprende más de 10 (por ejemplo, cualquier entero entre 11 y 100) sitios de unión a miARN. En algunas modalidades, un transgén como se describe por la divulgación comprende 3, 4, o 5 sitios de unión a miARN. El uno o más sitios

de unión a miARN puede cada uno unirse al mismo miARN, o diferente miARN. En algunas modalidades, un transgén como se describe por la divulgación comprende uno o más (por ejemplo, 3) sitios de unión a miR-122, uno o más (por ejemplo, 3) sitios de unión a miR-1, y tres sitios de unión a miR-132.

5

Ácidos nucleicos recombinantes

En algunas modalidades, un transgén como se describe por la divulgación se codifica por un ácido nucleico recombinante. Una secuencia de “ácido nucleico” se refiere a una secuencia de ADN o ARN. En algunas modalidades, las proteínas y

10 ácidos nucleicos de la divulgación son aisladas. Como se usa acá, el término “aislado” significa producido artificialmente. Como se usa acá con respecto a ácidos nucleicos, el término “aislado” significa: (i) amplificado *in vitro*, por ejemplo, por reacción en cadena de polimerasa (PCR); (ii) producido recombinantemente por clonación; (iii) purificado, como por escisión y separación de gel; o (iv) sintetizado,

15 por ejemplo, por síntesis química. Un ácido nucleico aislado es uno que es fácilmente manipulable por técnicas de ADN recombinante bien conocidas en el arte. Así, una secuencia de nucleótido contenida en un vector en el cual los sitios de restricción 5’ u 3’ son conocidos o para el cual las secuencias de cebador de reacción en cadena de polimerasa (PCR) han sido divulgadas, es considerada

20 asilada pero una secuencia de ácido nucleico existente en su estado nativo en su huésped natural no lo es. Un ácido nucleico aislado puede ser purificado sustancialmente, pero no necesita serlo. Por ejemplo, un ácido nucleico que es aislado dentro de un vector de clonación o expresión no es puro porque puede comprender únicamente un pequeño porcentaje del material en la célula en la cual

25 reside. Dicho ácido nucleico es aislado, sin embargo, como el término es usado acá porque es fácilmente manipulable por técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia. Como se usa acá con respecto a proteínas y péptidos, el término “aislado” se refiere a una proteína o péptido que ha sido aislado de su ambiente

natural o es producido artificialmente (por ejemplo, por síntesis química, por tecnología de ADN recombinante, etc.).

El experto en la materia también se dará cuenta que se pueden hacer sustituciones conservadoras de aminoácido para suministrar variantes funcionalmente equivalentes, u homólogos de las proteínas de cápside. En algunos aspectos, la divulgación adapta alteraciones de secuencia que resultan en sustituciones conservadoras de aminoácido. Como se usa acá, una sustitución conservadora de aminoácido se refiere a una sustitución de aminoácido que no altera la carga relativa o las características de tamaño de la proteína en la cual se hace la sustitución de aminoácido. Se pueden preparar variantes de acuerdo con métodos para alterar la secuencia de polipéptido conocidos por un experto en la materia, tal como se encuentra en referencias que compilan dichos métodos, por ejemplo, Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio, J. Sambrook y otros, eds., Segunda Edición, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o Protocolos Actuales en Biología Molecular, F.M. Ausubel y otros, eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen sustituciones hechas entre aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; y (g) E, D. Por lo tanto, se puede hacer sustituciones conservadoras de aminoácido a la secuencia de aminoácido de las proteínas y polipéptidos divulgados acá.

En algunas modalidades, un ácido nucleico como se describe por la divulgación está contenido dentro de un vector. Como se usa acá, el término “vector” incluye cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, cromosoma artificial, virus, virión, etc., el cual es capaz de replicación cuando se asocia con los elementos de control adecuados y el cual puede transferir secuencias de gen entre células. Así, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores virales. Ejemplos de vectores virales

incluyen vector de adenovirus, vector de virus adenoasociado (AAV), vectores lentivirales, vectores de herpesvirus, vectores de baculovirus, etc.

MeCP2

5 En algunos aspectos, la divulgación se relaciona con composiciones y métodos para expresar proteína de MeCP2 en una célula o sujeto. “MeCP2” se refiere a proteína de unión a CpG de metilo 2, la cual es codificada por el gen *MeCP2* y juega papeles importantes (por ejemplo, funciones como un represor transcripcional, o activador transcripcional) en células de nervio, tal como neuronas
10 maduras. Un ejemplo de un gen *MeCP2* es representado por el Número de Acceso de GenBank NM_001110792 (MeCP2-e1). Otro ejemplo de un gen MeCP2 está representado por el Número de Acceso de GenBank NM_001110792 (MeCP2-e2). El gen *MeCP2* codifica dos isoformas de proteína MeCP2, referida como isoforma e1 de MeCP2 e isoforma e2 de MeCP2, las cuales difieren en longitud de su terminal
15 N. En algunas modalidades, la isoforma e1 de MeCP2 está representada por una secuencia definida en la SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, la isoforma e2 de MeCP2 está representada por una secuencia definida en la SEQ ID NO: 2.

En algunas modalidades, un transgén (por ejemplo, un ácido nucleico recombinante) codifica un fragmento funcional de proteína MeCP2 (por ejemplo, un
20 fragmento de isoforma e1 o isoforma e2). Un “fragmento funcional” de MeCP2 es una proteína MeCP2 truncada que retiene la función natural (por ejemplo, activador transcripcional o represor transcripcional) de proteína MeCP2 de tipo salvaje (por ejemplo, de longitud completa). En algunas modalidades, un fragmento funcional de MeCP2 comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más truncamientos de aminoácido
25 con relación a la proteína MeCP2 de longitud completa. En algunas modalidades, un fragmento funcional de MeCP2 comprende entre aproximadamente 1 y 10, 5 y 50, 20 y 100 truncamientos de aminoácido con relación a la proteína MeCP2 de longitud completa.

En algunas modalidades, un transgén (por ejemplo, un ácido nucleico recombinante) codifica una variante de proteína MeCP2 (por ejemplo, una variante de isoforma e1 o isoforma e2). Una variante de proteína MeCP2 puede tener entre aproximadamente 50% y aproximadamente 99.9% de identidad a una proteína MeCP2 tipo salvaje (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2). En algunas modalidades, una variante de MeCP2 tiene aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o aproximadamente 99% de identidad con una proteína MeCP2 de tipo salvaje (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2).

miARN y sitios de unión a miARN

La divulgación se basa, en parte, en el reconocimiento que combinar elementos reguladores de miARN (MRE), tal como sitios de unión a miARN (por ejemplo, sitios de unión a miR-122 y sitios de unión a miR-1), con MRE asociados con ciclos de retroalimentación negativa que regulan la expresión de proteína (por ejemplo, sitios de unión a miR-132 para MeCP2), regulan simultáneamente los niveles de expresión de transgén y la expresión de transgén de desorientación en órganos periféricos.

Los miARN y otros ácidos nucleicos pequeños de interferencia regulan la expresión de gen por medio de escisión/degradación de transcripto de ARN objetivo o represión traslacional del ARN mensajero objetivo (miARN). Los miARN son expresados negativamente, típicamente como 19-25 productos finales de ARN no traducidos. Los miARN exhiben su actividad a través de interacciones específicas de secuencia con las regiones no traducidas 3' (UTR) de mRNA objetivos. Estos miARN expresados endógenamente forman precursores de horquilla los cuales son procesados posteriormente en un dúplex de miARN, y además en una molécula simple "madura" de miARN varada. Este miARN maduro guía un complejo de

multiproteína, miRISC, el cual identifica el sitio objetivo, por ejemplo, en las regiones 3' UTR, de mRNA objetivos con base en su complementariedad al miARN maduro.

La siguiente lista no limitante de genes de miARN, y sus homólogos, son útiles en los métodos y composiciones de la divulgación (por ejemplo, para mediar la expresión autorregulada o desorientación de un transgén): hsa-let-7a, hsa-let-7a*, hsa-let-7b, hsa-let-7b*, hsa-let-7c, hsa-let-7c*, hsa-let-7d, hsa-let-7d*, hsa-let-7e, hsa-let-7e*, hsa-let-7f, hsa-let-7f-1*, hsa-let-7f-2*, hsa-let-7g, hsa-let-7g*, hsa-let-7i, hsa-let-7i*, hsa-miR-1, hsa-miR-100, hsa-miR-100*, hsa-miR-101, hsa-miR-101*, hsa-miR-103, hsa-miR-105, hsa-miR-105*, hsa-miR-106a, hsa-miR-106a*, hsa-miR-106b, hsa-miR-106b*, hsa-miR-107, hsa-miR-10a, hsa-miR-10a*, hsa-miR-10b, hsa-miR-10b*, hsa-miR-1178, hsa-miR-1179, hsa-miR-1180, hsa-miR-1181, hsa-miR-1182, hsa-miR-1183, hsa-miR-1184, hsa-miR-1185, hsa-miR-1197, hsa-miR-1200, hsa-miR-1201, hsa-miR-1202, hsa-miR-1203, hsa-miR-1204, hsa-miR-1205, hsa-miR-1206, hsa-miR-1207-3p, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-1208, hsa-miR-122, hsa-miR-122*, hsa-miR-1224-3p, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-1225-3p, hsa-miR-1225-5p, hsa-miR-1226, hsa-miR-1226*, hsa-miR-1227, hsa-miR-1228, hsa-miR-1228*, hsa-miR-1229, hsa-miR-1231, hsa-miR-1233, hsa-miR-1234, hsa-miR-1236, hsa-miR-1237, hsa-miR-1238, hsa-miR-124, hsa-miR-124*, hsa-miR-1243, hsa-miR-1244, hsa-miR-1245, hsa-miR-1246, hsa-miR-1247, hsa-miR-1248, hsa-miR-1249, hsa-miR-1250, hsa-miR-1251, hsa-miR-1252, hsa-miR-1253, hsa-miR-1254, hsa-miR-1255a, hsa-miR-1255b, hsa-miR-1256, hsa-miR-1257, hsa-miR-1258, hsa-miR-1259, hsa-miR-125a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b, hsa-miR-125b-1*, hsa-miR-125b-2*, hsa-miR-126, hsa-miR-126*, hsa-miR-1260, hsa-miR-1261, hsa-miR-1262, hsa-miR-1263, hsa-miR-1264, hsa-miR-1265, hsa-miR-1266, hsa-miR-1267, hsa-miR-1268, hsa-miR-1269, hsa-miR-1270, hsa-miR-1271, hsa-miR-1272, hsa-miR-1273, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-1274a, hsa-miR-1274b, hsa-miR-1275, hsa-miR-127-5p, hsa-miR-1276, hsa-miR-1277, hsa-miR-1278, hsa-miR-1279, hsa-miR-128, hsa-miR-1280, hsa-miR-1281, hsa-miR-1282, hsa-miR-1283,

hsa-miR-1284, hsa-miR-1285, hsa-miR-1286, hsa-miR-1287, hsa-miR-1288, hsa-miR-1289, hsa-miR-129*, hsa-miR-1290, hsa-miR-1291, hsa-miR-1292, hsa-miR-1293, hsa-miR-129-3p, hsa-miR-1294, hsa-miR-1295, hsa-miR-129-5p, hsa-miR-1296, hsa-miR-1297, hsa-miR-1298, hsa-miR-1299, hsa-miR-1300, hsa-miR-1301, 5 hsa-miR-1302, hsa-miR-1303, hsa-miR-1304, hsa-miR-1305, hsa-miR-1306, hsa-miR-1307, hsa-miR-1308, hsa-miR-130a, hsa-miR-130a*, hsa-miR-130b, hsa-miR-130b*, hsa-miR-132, hsa-miR-132*, hsa-miR-1321, hsa-miR-1322, hsa-miR-1323, hsa-miR-1324, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b, hsa-miR-134, hsa-miR-135a, hsa-miR-135a*, hsa-miR-135b, hsa-miR-135b*, hsa-miR-136, hsa-miR-136*, hsa-miR-10 137, hsa-miR-138, hsa-miR-138-1*, hsa-miR-138-2*, hsa-miR-139-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-141, hsa-miR-141*, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-143, hsa-miR-143*, hsa-miR-144, hsa-miR-144*, hsa-miR-145, hsa-miR-145*, hsa-miR-146a, hsa-miR-146a*, hsa-miR-146b-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-147, hsa-miR-147b, hsa-miR-148a, hsa-miR-148a*, 15 hsa-miR-148b, hsa-miR-148b*, hsa-miR-149, hsa-miR-149*, hsa-miR-150, hsa-miR-150*, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-151-5p, hsa-miR-152, hsa-miR-153, hsa-miR-154, hsa-miR-154*, hsa-miR-155, hsa-miR-155*, hsa-miR-15a, hsa-miR-15a*, hsa-miR-15b, hsa-miR-15b*, hsa-miR-16, hsa-miR-16-1*, hsa-miR-16-2*, hsa-miR-17, hsa-miR-17*, hsa-miR-181a, hsa-miR-181a*, hsa-miR-181a-2*, hsa-miR-181b, hsa-20 miR-181c, hsa-miR-181c*, hsa-miR-181d, hsa-miR-182, hsa-miR-182*, hsa-miR-1825, hsa-miR-1826, hsa-miR-1827, hsa-miR-183, hsa-miR-183*, hsa-miR-184, hsa-miR-185, hsa-miR-185*, hsa-miR-186, hsa-miR-186*, hsa-miR-187, hsa-miR-187*, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-18a, hsa-miR-18a*, hsa-miR-18b, hsa-miR-18b*, hsa-miR-190, hsa-miR-190b, hsa-miR-191, hsa-miR-191*, hsa-miR-25 192, hsa-miR-192*, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b, hsa-miR-193b*, hsa-miR-194, hsa-miR-194*, hsa-miR-195, hsa-miR-195*, hsa-miR-196a, hsa-miR-196a*, hsa-miR-196b, hsa-miR-197, hsa-miR-198, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19a, hsa-miR-19a*, hsa-miR-19b, hsa-

miR-19b-1*, hsa-miR-19b-2*, hsa-miR-200a, hsa-miR-200a*, hsa-miR-200b, hsa-miR-200b*, hsa-miR-200c, hsa-miR-200c*, hsa-miR-202, hsa-miR-202*, hsa-miR-203, hsa-miR-204, hsa-miR-205, hsa-miR-206, hsa-miR-208a, hsa-miR-208b, hsa-miR-20a, hsa-miR-20a*, hsa-miR-20b, hsa-miR-20b*, hsa-miR-21, hsa-miR-21*,
5 hsa-miR-210, hsa-miR-211, hsa-miR-212, hsa-miR-214, hsa-miR-214*, hsa-miR-215, hsa-miR-216a, hsa-miR-216b, hsa-miR-217, hsa-miR-218, hsa-miR-218-1*, hsa-miR-218-2*, hsa-miR-219-1-3p, hsa-miR-219-2-3p, hsa-miR-219-5p, hsa-miR-22, hsa-miR-22*, hsa-miR-220a, hsa-miR-220b, hsa-miR-220c, hsa-miR-221, hsa-miR-221*, hsa-miR-222, hsa-miR-222*, hsa-miR-223, hsa-miR-223*, hsa-miR-224,
10 hsa-miR-23a, hsa-miR-23a*, hsa-miR-23b, hsa-miR-23b*, hsa-miR-24, hsa-miR-24-1*, hsa-miR-24-2*, hsa-miR-25, hsa-miR-25*, hsa-miR-26a, hsa-miR-26a-1*, hsa-miR-26a-2*, hsa-miR-26b, hsa-miR-26b*, hsa-miR-27a, hsa-miR-27a*, hsa-miR-27b, hsa-miR-27b*, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-296-5p, hsa-miR-297, hsa-miR-298, hsa-miR-299-3p, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-29a,
15 hsa-miR-29a*, hsa-miR-29b, hsa-miR-29b-1*, hsa-miR-29b-2*, hsa-miR-29c, hsa-miR-29c*, hsa-miR-300, hsa-miR-301a, hsa-miR-301b, hsa-miR-302a, hsa-miR-302a*, hsa-miR-302b, hsa-miR-302b*, hsa-miR-302c, hsa-miR-302c*, hsa-miR-302d, hsa-miR-302d*, hsa-miR-302e, hsa-miR-302f, hsa-miR-30a, hsa-miR-30a*, hsa-miR-30b, hsa-miR-30b*, hsa-miR-30c, hsa-miR-30c-1*, hsa-miR-30c-2*, hsa-miR-30d,
20 hsa-miR-30d*, hsa-miR-30e, hsa-miR-30e*, hsa-miR-31, hsa-miR-31*, hsa-miR-32, hsa-miR-32*, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-320d, hsa-miR-323-3p, hsa-miR-323-5p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-325, hsa-miR-326, hsa-miR-328, hsa-miR-329, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-330-5p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-335, hsa-miR-335*, hsa-miR-337-3p,
25 hsa-miR-337-5p, hsa-miR-338-3p, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-339-3p, hsa-miR-339-5p, hsa-miR-33a, hsa-miR-33a*, hsa-miR-33b, hsa-miR-33b*, hsa-miR-340, hsa-miR-340*, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-345, hsa-miR-346, hsa-miR-34a, hsa-miR-34a*, hsa-miR-34b, hsa-miR-34b*, hsa-miR-34c-3p, hsa-miR-

34c-5p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363, hsa-miR-363*, hsa-miR-365, hsa-miR-367, hsa-miR-367*, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-369-5p, hsa-miR-370, hsa-miR-371-3p, hsa-miR-371-5p, hsa-miR-372, hsa-miR-373, hsa-miR-373*, hsa-miR-374a, hsa-miR-374a*, hsa-miR-374b, hsa-miR-374b*, hsa-miR-375, hsa-miR-376a, hsa-miR-376a*, hsa-miR-376b, hsa-miR-376c, hsa-miR-377, hsa-miR-377*, hsa-miR-378, hsa-miR-378*, hsa-miR-379, hsa-miR-379*, hsa-miR-380, hsa-miR-380*, hsa-miR-381, hsa-miR-382, hsa-miR-383, hsa-miR-384, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-410, hsa-miR-411, hsa-miR-411*, hsa-miR-412, hsa-miR-421, hsa-miR-422a, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-424, hsa-miR-424*, hsa-miR-425, hsa-miR-425*, hsa-miR-429, hsa-miR-431, hsa-miR-431*, hsa-miR-432, hsa-miR-432*, hsa-miR-433, hsa-miR-448, hsa-miR-449a, hsa-miR-449b, hsa-miR-450a, hsa-miR-450b-3p, hsa-miR-450b-5p, hsa-miR-451, hsa-miR-452, hsa-miR-452*, hsa-miR-453, hsa-miR-454, hsa-miR-454*, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-483-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-487a, hsa-miR-487b, hsa-miR-488, hsa-miR-488*, hsa-miR-489, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-491-3p, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-492, hsa-miR-493, hsa-miR-493*, hsa-miR-494, hsa-miR-495, hsa-miR-496, hsa-miR-497, hsa-miR-497*, hsa-miR-498, hsa-miR-499-3p, hsa-miR-499-5p, hsa-miR-500, hsa-miR-500*, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-501-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-503, hsa-miR-504, hsa-miR-505, hsa-miR-505*, hsa-miR-506, hsa-miR-507, hsa-miR-508-3p, hsa-miR-508-5p, hsa-miR-509-3-5p, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-509-5p, hsa-miR-510, hsa-miR-511, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-513a-3p, hsa-miR-513a-5p, hsa-miR-513b, hsa-miR-513c, hsa-miR-514, hsa-miR-515-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-516a-3p, hsa-miR-516a-5p, hsa-miR-516b, hsa-miR-517*, hsa-miR-517a, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a-3p, hsa-miR-518a-5p, hsa-miR-518b, hsa-miR-518c, hsa-miR-518c*, hsa-miR-518d-3p, hsa-miR-518d-5p, hsa-miR-518e, hsa-miR-518e*, hsa-miR-518f, hsa-miR-518f*,

hsa-miR-519a, hsa-miR-519b-3p, hsa-miR-519c-3p, hsa-miR-519d, hsa-miR-519e, hsa-miR-519e*, hsa-miR-520a-3p, hsa-miR-520a-5p, hsa-miR-520b, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-520d-3p, hsa-miR-520d-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-520f, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-521, hsa-miR-522, hsa-miR-523, hsa-miR-524-3p, hsa-miR-524-5p, hsa-miR-525-3p, hsa-miR-525-5p, hsa-miR-526b, hsa-miR-526b*, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-539, hsa-miR-541, hsa-miR-541*, hsa-miR-542-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-543, hsa-miR-544, hsa-miR-545, hsa-miR-545*, hsa-miR-548a-3p, hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-548b-3p, hsa-miR-548b-5p, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-548c-5p, hsa-miR-548d-3p, hsa-miR-548d-5p, hsa-miR-548e, hsa-miR-548f, hsa-miR-548g, hsa-miR-548h, hsa-miR-548i, hsa-miR-548j, hsa-miR-548k, hsa-miR-548l, hsa-miR-548m, hsa-miR-548n, hsa-miR-548o, hsa-miR-548p, hsa-miR-549, hsa-miR-550, hsa-miR-550*, hsa-miR-551a, hsa-miR-551b, hsa-miR-551b*, hsa-miR-552, hsa-miR-553, hsa-miR-554, hsa-miR-555, hsa-miR-556-3p, hsa-miR-556-5p, hsa-miR-557, hsa-miR-558, hsa-miR-559, hsa-miR-561, hsa-miR-562, hsa-miR-563, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-567, hsa-miR-568, hsa-miR-569, hsa-miR-570, hsa-miR-571, hsa-miR-572, hsa-miR-573, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-575, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-576-5p, hsa-miR-577, hsa-miR-578, hsa-miR-579, hsa-miR-580, hsa-miR-581, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-583, hsa-miR-584, hsa-miR-585, hsa-miR-586, hsa-miR-587, hsa-miR-588, hsa-miR-589, hsa-miR-589*, hsa-miR-590-3p, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-591, hsa-miR-592, hsa-miR-593, hsa-miR-593*, hsa-miR-595, hsa-miR-596, hsa-miR-597, hsa-miR-598, hsa-miR-599, hsa-miR-600, hsa-miR-601, hsa-miR-602, hsa-miR-603, hsa-miR-604, hsa-miR-605, hsa-miR-606, hsa-miR-607, hsa-miR-608, hsa-miR-609, hsa-miR-610, hsa-miR-611, hsa-miR-612, hsa-miR-613, hsa-miR-614, hsa-miR-615-3p, hsa-miR-615-5p, hsa-miR-616, hsa-miR-616*, hsa-miR-617, hsa-miR-618, hsa-miR-619, hsa-miR-620, hsa-miR-621, hsa-miR-622, hsa-miR-623, hsa-miR-624, hsa-miR-624*, hsa-miR-625, hsa-miR-625*, hsa-miR-626, hsa-miR-627, hsa-miR-628-3p, hsa-miR-628-5p, hsa-

miR-629, hsa-miR-629*, hsa-miR-630, hsa-miR-631, hsa-miR-632, hsa-miR-633, hsa-miR-634, hsa-miR-635, hsa-miR-636, hsa-miR-637, hsa-miR-638, hsa-miR-639, hsa-miR-640, hsa-miR-641, hsa-miR-642, hsa-miR-643, hsa-miR-644, hsa-miR-645, hsa-miR-646, hsa-miR-647, hsa-miR-648, hsa-miR-649, hsa-miR-650, 5 hsa-miR-651, hsa-miR-652, hsa-miR-653, hsa-miR-654-3p, hsa-miR-654-5p, hsa-miR-655, hsa-miR-656, hsa-miR-657, hsa-miR-658, hsa-miR-659, hsa-miR-660, hsa-miR-661, hsa-miR-662, hsa-miR-663, hsa-miR-663b, hsa-miR-664, hsa-miR-664*, hsa-miR-665, hsa-miR-668, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-675, hsa-miR-7, hsa-miR-708, hsa-miR-708*, hsa-miR-7-1*, hsa-miR-7-2*, hsa-miR-720, 10 hsa-miR-744, hsa-miR-744*, hsa-miR-758, hsa-miR-760, hsa-miR-765, hsa-miR-766, hsa-miR-767-3p, hsa-miR-767-5p, hsa-miR-768-3p, hsa-miR-768-5p, hsa-miR-769-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-770-5p, hsa-miR-802, hsa-miR-873, hsa-miR-874, hsa-miR-875-3p, hsa-miR-875-5p, hsa-miR-876-3p, hsa-miR-876-5p, hsa-miR-877, hsa-miR-877*, hsa-miR-885-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-886-3p, hsa-miR-15 886-5p, hsa-miR-887, hsa-miR-888, hsa-miR-888*, hsa-miR-889, hsa-miR-890, hsa-miR-891a, hsa-miR-891b, hsa-miR-892a, hsa-miR-892b, hsa-miR-9, hsa-miR-9*, hsa-miR-920, hsa-miR-921, hsa-miR-922, hsa-miR-923, hsa-miR-924, hsa-miR-92a, hsa-miR-92a-1*, hsa-miR-92a-2*, hsa-miR-92b, hsa-miR-92b*, hsa-miR-93, hsa-miR-93*, hsa-miR-933, hsa-miR-934, hsa-miR-935, hsa-miR-936, hsa-miR-20 937, hsa-miR-938, hsa-miR-939, hsa-miR-940, hsa-miR-941, hsa-miR-942, hsa-miR-943, hsa-miR-944, hsa-miR-95, hsa-miR-96, hsa-miR-96*, hsa-miR-98, hsa-miR-99a, hsa-miR-99a*, hsa-miR-99b, y hsa-miR-99b*.

En algunas modalidades, uno o más sitios de unión de una construcción como se describe por la divulgación (por ejemplo, ácido nucleico recombinante, 25 vector AAV, rAAV, etc.) desorienta la expresión de transgén de una célula del sistema inmune (por ejemplo, una célula que presenta antígeno (APC)). En algunas modalidades, un miARN que desorienta la expresión de transgén de una célula inmune (por ejemplo, una célula que presenta antígeno) es referido como un miARN

inmune asociado. En algunas modalidades, un miARN inmune asociado es un miARN expresado en células inmunes que exhiben por lo menos un nivel de expresión 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces mayor en una célula inmune en comparación con una célula no inmune (por ejemplo, una célula de control, tal como una célula HeLa, célula HEK293, célula mesenquimal, etc.). En algunas modalidades, la célula del sistema inmune (célula inmune) en la cual el miARN inmune asociado está expresado es una célula B, célula T, célula T asesina, célula T ayudadora, célula T $\gamma\delta$, célula dendrítica, macrófago, monocito, célula endotelial vascular, u otra célula inmune. En algunas modalidades, la célula del sistema inmune es una célula B que expresa uno o más de los siguientes marcadores: B220, BLAST-2 (EBVCS), Bu-1, CD19, CD20 (L26), CD22, CD24, CD27, CD57, CD72, CD79a, CD79b, CD86, chB6, D8/17, FMC7, L26, M17, MUM-1, Pax-5 (BSAP), y PC47H. En algunas modalidades, la célula del sistema inmune es una célula T que expresa uno o más de los siguientes marcadores: ART2, CD1a, CD1d, CD11b (Mac-1), CD134 (OX40), CD150, CD2, CD25 (receptor alfa de interleucina 2), CD3, CD38, CD4, CD45RO, CD5, CD7, CD72, CD8, CRTAM, FOXP3, FT2, GPCA, HLA-DR, HML-1, HT23A, Leu-22, Ly-2, Ly-m22, MICG, MRC OX 8, MRC OX-22, OX40, PD-1 (Muerte programada-1), RT6, TCR (receptor de célula T), Thy-1 (CD90), y TSA-2 (Tímico compartido Ag-2). En algunas modalidades, un miARN inmune asociado se selecciona de: miR-15a, miR-16-1, miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a, miR-21, miR-29a/b/c, miR-30b, miR-31, miR-34a, miR-92a-1, miR-106a, miR-125a/b, miR-142-3p, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-181a, miR-223 and miR-424, miR-221, miR-222, let-7i, miR-148, y miR-152.

Vectores AAV Recombinantes (Vectores rAAV)

Los “vectores AAV recombinantes (rAAV)” de la divulgación están típicamente compuestos de, como mínimo, un transgén y sus secuencias

reguladoras, y repeticiones de terminal invertido (ITR) AAV 5' y 3'. Este vector AAV recombinante el que está empacado en una proteína de cápside y es entregado a una célula objetivo seleccionada. En algunas modalidades, el transgén es una secuencia de ácido nucleico, heteróloga a las secuencias de vector, la cual codifica un polipéptido, proteína, molécula de ARN funcional (por ejemplo, gARN) u otro producto de gen, de interés. La secuencia de codificación de ácido nucleico está operativamente vinculada a componentes reguladores en una forma que permite la transcripción de transgén, traslación, y/o expresión en una célula de un tejido objetivo.

En algunas modalidades, la presente divulgación se relaciona con un vector AAV recombinante (rAAV) que comprende una secuencia de ácido nucleico que incluye un promotor vinculado operablemente a un transgén, en donde el transgén codifica una proteína MeCP2 (Por ejemplo, isoforma e1 de MeCP2). En algunas modalidades, un vector rAAV además comprende secuencias de ácido nucleico que codifican una o más secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV, por ejemplo, ITR de AAV2. En algunas modalidades, un vector rAAV además comprende secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más ITR de AAV seleccionados del grupo que consiste de AAV3, AAV4, AAV5, y AAV6. En algunas modalidades, los ITR son secuencias artificiales que reemplazan la función de ITR, por ejemplo, como se divulga en WO2016/172008.

Las secuencias de AAV del vector típicamente comprenden las secuencias de repetición de terminal invertido 5' y 3' que actúan sobre cis (ver, por ejemplo, B. J. Carter, en "Manual de Parvovirus", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990)). Las secuencias ITR tienen aproximadamente 145 bp en longitud. Preferiblemente, sustancialmente todas las secuencias que codifican los ITR son usadas en la molécula, aunque algún grado de modificación menor de estas secuencias es permitido. La capacidad de modificar estas secuencias ITR está dentro de la habilidad en la materia (Ver, por ejemplo, textos tales como Sambrook

y otros, "Clonación Molecular. Un Manual de Laboratorio", 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1989); y K. Fisher y otros, J. Virol. 70:520-532 (1996)). Un ejemplo de dicha molécula empleada en la presente divulgación es un plásmido que "actúa sobre cis" que contiene el transgén, en el cual la secuencia de transgén seleccionada y los elementos reguladores asociados son flanqueados por las secuencias de ITR AAV 5' y 3'. Las secuencias de ITR AAV pueden ser obtenidas a partir de cualquier AAV conocido, incluyendo tipos de AAV de mamífero actualmente identificados (por ejemplo, secuencias de ITR AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, o AAV6).

Adicional a los elementos principales identificados anteriormente para el vector AAV recombinante, el vector también incluye elementos de control necesarios los cuales están vinculados operablemente al transgén en una forma que permite su transcripción, traslación y/o expresión en una célula transfectada con el vector de plásmido o infectada con el virus producido por la divulgación. Como se usa acá, secuencias "vinculadas operablemente" incluyen secuencias de control de expresión que son contiguas con el gen de interés y secuencias de control de expresión que actúan en trans o a una distancia al gen de control de interés.

Las secuencias de control de expresión incluyen iniciación, terminación, promotor y secuencias mejoradoras de transcripción adecuada; señales de procesamiento de ARN eficientes tales como señales de empalme y poliadenilación (poli A); secuencias que estabilizan mRNA citoplásmico; secuencias que mejoran la eficiencia de traslación (es decir, secuencia de consenso de Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de proteína; y cuando se desea, secuencias que mejoran la secreción del producto codificado. Un gran número de secuencias de control de expresión, incluyendo promotores que son nativos, constitutivos, inducibles y/o específicos de tejido, son conocidas en el arte y pueden ser utilizadas.

Como se usa acá, una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de codificación) y secuencias reguladoras se dice que están vinculadas

“operablemente” cuando ellas están vinculadas covalentemente en una forma tal que ubican la expresión o transcripción de la secuencia de ácido nucleico bajo la influencia o control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias de ácido nucleico sea traducidas en una proteína funcional, se dice que dos

5 secuencias de ADN están vinculadas operablemente si la inducción de un promotor en las secuencias reguladoras 5' resulta en la transcripción de la secuencia de codificación y si la naturaleza del vínculo entre las dos secuencias de ADN no (1) resulta en la introducción de una mutación de cambio de marco, (2) interfiere con la capacidad de la región de promotor de dirigir la transcripción de las secuencias

10 codificadoras, o (3) interfiere con la capacidad del correspondiente transcripto de ARN de ser traducido en una proteína. Así, una región promotora estaría vinculada operablemente a una secuencia de ácido nucleico si la región promotora fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ADN de modo que el transcripto resultante pueda ser traducido en la proteína deseada o polipéptido. De

15 forma similar, dos o más regiones están vinculadas operablemente cuando ellas están vinculadas en una forma tal que su transcripción de un promotor común resulta en la expresión de dos o más proteínas que han sido traducidas en marco. En algunas modalidades, las secuencias de codificación vinculadas operablemente producen una proteína de fusión. En algunas modalidades, las secuencias de

20 codificación vinculadas operablemente producen un ARN funcional (por ejemplo, gran, miARN).

Para proteínas que codifican ácidos nucleicos, generalmente se inserta una secuencia de poliadenilación siguiendo las secuencias de transgén y antes de la secuencia de ITR AAV 3'. Una construcción de rAAV útil en la presente divulgación

25 puede también contener un intrón, deseablemente ubicado entre la secuencia promotora/mejoradora y el transgén. Una secuencia de intrón posible se deriva de SV-40, y es referida como la secuencia de intrón SV-40 T. Otro elemento de vector que puede ser usado es un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES). Una

secuencia IRES es usada para producir más de un polipéptido a partir de un transcripto de gen simple. Una secuencia IRES sería usada para producir una proteína que contiene más de una cadena de polipéptido. Se puede realizar la selección de estos y/u otros elementos de vector, como sea adecuado, y varias de dichas secuencias están disponibles (ver, por ejemplo, Sambrook y otros, y referencias citadas acá en, por ejemplo, páginas 3.18 3.26 y 16.17 16.27 y Ausubel y otros, Protocolos Actuales en Biología Molecular, John Wiley & Sons, Nueva York, 1989). En algunas modalidades, una secuencia de Virus de Enfermedad de Pie y Boca 2A está incluida en la poliproteína; este es un péptido pequeño (aproximadamente 18 aminoácidos de longitud) que ha sido mostrado por mediar la escisión de poliproteínas (Ryan, M D y otros, EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M y otros, J Virología, Noviembre 1996; p. 8124-8127; Furler, S y otros, Terapia de Gen, 2001; 8: 864-873; y Halpin, C y otros, El Diario de Planta, 1999; 4: 453-459). La actividad de escisión de la secuencia 2A ha sido demostrada previamente en sistemas artificiales que incluyen plásmidos y vectores de terapia de gen (AAV y retrovirus) (Ryan, M D y otros, EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M y otros, J Virología, Noviembre 1996; p. 8124-8127; Furler, S y otros, Terapia de Gen, 2001; 8: 864-873; y Halpin, C y otros, El Diario de Planta, 1999; 4: 453-459; de Felipe, P y otros, Terapia de Gen, 1999; 6: 198-208; de Felipe, P y otros, Terapia de Gen Humano, 2000; 11: 1921-1931; y Klump, H y otros, Terapia de Gen, 2001; 8: 811-817).

La naturaleza precisa de las secuencias reguladoras necesarias para la expresión de gen en células huésped puede variar entre especies, tejidos o tipos de célula, pero en general incluirá, como sea necesario, secuencias no transcritas 5' y no traducidas 5' involucradas con la iniciación de la transcripción y traducción respectivamente, tal como una caja TATA, secuencia de tapado, secuencia CAAT, elementos mejoradores, y similares. Especialmente, dichas secuencias reguladoras no transcritas 5' incluirán una región promotora que incluye una secuencia

promotora para control transcripcional del gen operablemente unido. Las secuencias reguladoras pueden también incluir secuencias mejoradoras o secuencias activadoras hacia arriba, como sea deseado. Los vectores de la divulgación pueden opcionalmente incluir secuencias líder 5' o de señal. La
5 selección y el diseño de un vector adecuado está dentro de la capacidad y la discreción del experto en la materia.

Ejemplos de promotores constitutivos incluyen, sin limitación, el promotor LTR de virus de sarcoma Rous retroviral (RSV) (opcionalmente con el mejorador de RSV), el promotor de citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el mejorador de
10 CMV) (ver, por ejemplo, Boshart y otros, *Célula*, 41:521-530 (1985)), el promotor SV40, el promotor de reductasa dihidrofolato, el promotor de β -actina, el promotor de quinasa de fosfoglicerol (PGK), y el promotor EF1 α (Invitrogen). En algunas modalidades, un promotor es un promotor mejorado de β -actina de pollo.

Los promotores inducibles permiten la regulación de la expresión de gen y
15 pueden ser regulados por compuestos suministrados exógenamente, factores ambientales tales como temperatura, o la presencia de un estado fisiológico específico, por ejemplo, fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula, o en células de replicación únicamente. Los promotores inducibles y los sistemas inducibles están disponibles a partir de una variedad de fuentes
20 comerciales, incluyendo, sin limitación, Invitrogen, Clontech y Ariad. Varios otros sistemas han sido descritos y pueden ser seleccionados fácilmente por un experto en la materia. Ejemplos de promotores inducibles regulados por promotores suministrados exógenamente incluyen el promotor de metalotionina (MT) de oveja inducible con zinc, el promotor de virus de tumor mamario de ratón (MMTV)
25 inducible por dexametasona (Dex), el sistema promotor de polimerasa T7 (WO 98/10088); el promotor de insecto de ecdisoma (No y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 93:3346-3351 (1996)), el sistema represor de tetraciclina (Gossen y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89:5547-5551 (1992)), el sistema inducible por

tetraciclina (Gossen y otros, *Ciencia*, 268:1766-1769 (1995), ver también Harvey y otros, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518 (1998)), el sistema inducible por RU486 (Wang y otros, *Natl. Biotech.*, 15:239-243 (1997) y Wang y otros, *Gen Ther.*, 4:432-441 (1997)) y el sistema inducible por rapamicina (Magari y otros, *J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872 (1997)). Otros tipos de promotores inducibles que pueden ser útiles en este contexto son aquellos que son regulados por un estado fisiológico específico, por ejemplo, temperatura, fase aguda un estado de diferenciación particular de la célula, o en células de replicación únicamente.

En otra modalidad, se utilizará el promotor nativo para el transgén. El promotor nativo puede ser preferido cuando es deseable que la expresión del transgén deba imitar la expresión nativa. El promotor nativo puede ser usado cuando la expresión del transgén debe ser regulada temporalmente o desarrolladamente, o en una forma específica de tejido, o en respuesta a estímulo transcripcional específico. Por ejemplo, en algunas modalidades, un promotor nativo es un promotor MeCP2, tal como un promotor de MeCP2 de ratón. En algunas modalidades, un promotor de MeCP2 de ratón es representado por una secuencia definida en la SEQ ID NO: 3. En una modalidad adicional, otros elementos de control de expresión nativos, tales como elementos mejoradores, sitios de poliadenilación o secuencias de consenso de Kozak también pueden ser usados para imitar la expresión nativa.

En algunas modalidades, las secuencias reguladoras imparten capacidades de expresión de gen específicas del tejido. En algunos casos, las secuencias reguladoras específicas del tejido se unen a factores de transcripción específicos de tejido que inducen la transcripción en una forma específica del tejido. Dichas secuencias reguladoras específicas del tejido (por ejemplo, promotores, mejoradores, etc.) son bien conocidas en el arte. Secuencias reguladoras específicas de tejido ejemplares incluyen, pero no se limitan a los siguientes promotores específicos de tejido: un promotor de retinosquisina específico de ojo o

promotor K12, un promotor de globulina de unión a tiroxina (TGB) específico de hígado, un promotor de insulina, un promotor de glucagón, un promotor de somatostatina, un promotor de polipéptido pancreático (PPY), un promotor de sinapsina-1 (Syn), un promotor de quinasa de creatina (MCK), un promotor de desmina mamífera (DES), un promotor de cadena pesada de α -miosina (α -MHC), o un promotor de Troponina T cardíaca (cTnT). Otros promotores ejemplares incluyen promotor Beta-actina, promotor de núcleo de virus de hepatitis B, Sandig y otros, Gen Ther. 3:1002-9 (1996); promotor de alfa-fetoproteína (AFP), Arbuthnot y otros, Hum. Gen Ther., 7:1503-14 (1996), promotor de osteocalcina ósea (Stein y otros, Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997)); promotor de sialoproteína ósea (Chen y otros, J. Bone Miner. Res., 11:654-64 (1996)), promotor CD2 (Hansal y otros, J. Immunol., 161:1063-8 (1998)); promotor de cadena pesada de inmunoglobulina; promotor de cadena α de receptor de célula T, neuronal tal como un promotor de enolasa específica de neurona (NSE) (Andersen y otros, Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)), promotor de gen de cadena liviana de neurofilamento (Piccioli y otros., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 88:5611-5 (1991)), y el promotor de gen vgf específico de neurona (Piccioli y otros, Neurona, 15:373-84 (1995)), entre otros que serán evidentes para el experto en la materia.

En algunas modalidades, uno o más sitios de unión por uno o más miARN son incorporados en un transgén de un vector rAAV, para inhibir la expresión del transgén en uno o más tejidos de un sujeto que alberga el transgén. El experto en la materia apreciará que los sitios de unión pueden ser seleccionados para controlar la expresión de un transgén en una forma específica del tejido. Por ejemplo, los sitios de unión para el miR-122 específico de hígado pueden ser incorporados en un transgén para inhibir la expresión de ese transgén en el hígado. Los sitios objetivo en el mRNA pueden estar en el 5' UTR, el 3' UTR o en la región de codificación. Típicamente, el sitio objetivo está en el 3' UTR del mRNA. Además, el transgén puede estar diseñado de modo que múltiples mRNA regulan el mRNA al

reconocer los mismos o múltiples sitios. La presencia de múltiples sitios de unión a miARN puede resultar en la acción cooperativa de múltiples RISC y suministran inhibición de expresión altamente eficiente. La secuencia de sitio objetivo puede comprender un total de 5-100, 10-60, o más nucleótidos. La secuencia de sitio

5 objetivo puede comprender por lo menos 5 nucleótidos de la secuencia de un sitio de unión a gen específico.

Virus adenoasociados recombinantes (rAAV)

En algunos aspectos, la divulgación suministra AAV aislados. Como se usa

10 acá con respecto a AAV, el término “aislado” se refiere a un AAV que ha sido producido u obtenido artificialmente. Los AAV aislados pueden ser producidos usando métodos recombinantes. Dichos AAV son referidos acá como “AAV recombinantes”. Los AAV recombinantes (rAAV) preferiblemente tienen capacidades de enfoque específico al tejido, de modo que una nucleasa y/o

15 transgén del rAAV será entregado específicamente a uno o más tejidos predeterminados. El cápside de AAV es un elemento importante en la determinación de estas capacidades de enfoque específico al tejido. Así, se puede seleccionar un rAAV que tiene un cápside adecuado para el tejido que es objetivo.

Los métodos para obtener AAV recombinantes que tienen una proteína de

20 cápside deseada son bien conocidos en el arte (Ver, por ejemplo, US 2003/0138772), cuyo contenido se incorpora acá por referencia en su totalidad). Típicamente, los métodos involucran cultivar una célula huésped la cual contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de cápside de AAV; un gen *rep* funcional un vector AAV recombinante compuesto de, repeticiones

25 terminales invertidas (ITR) de AAV y un transgén; y suficientes funciones de ayuda para permitir el empaquetado del vector AAV recombinante en las proteínas cápside de AAV. En algunas modalidades, las proteínas de cápside son proteínas estructurales codificadas por el gen cap de un AAV. Los AAV comprenden tres

proteínas cápside, proteínas virion 1 a 3 (denominadas VP1, VP2 y VP3), todas las cuales son transcritas a partir de un gen cap simple por medio de empalme alternativo.

En algunas modalidades, los pesos moleculares de VP1, VP2 y VP3 son respectivamente aproximadamente 87 kDa, aproximadamente 72 kDa y

5 aproximadamente 62 kDa. En algunas modalidades, con la traducción, las proteínas cápside forman una cubierta de proteína esférica 60-mer alrededor del genoma viral.

En algunas modalidades, las funciones de las proteínas cápside son proteger el genoma viral, entregar el genoma e interactuar con el huésped. En algunos aspectos, las proteínas cápside entregan el genoma viral a un huésped en una
10 forma específica al tejido.

En algunas modalidades, un rAAV descrito por la divulgación comprende una o más proteínas cápside capaces de cruzar la barrera hematoencefálica. En algunas modalidades, la por lo menos una proteína cápside tiene un serotipo seleccionado del grupo que consiste de AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV2.5, AAV6, AAV8, AAVrh8,
15 AAV9, AAVrh10, AAV-B1, AAV9.45A-Cadena (por ejemplo, AAV9.45-AS), AAV9.45Angiopep, AAV9.47-Angiopep, y AAV9.47-AS. En algunas modalidades, la por lo menos una proteína cápside tiene un serotipo AAV-PHP.B, por ejemplo, como se describe en la Patente No. US 9,585,971. En algunas modalidades, una proteína cápside tiene un serotipo descrito en WO2015/127128, WO2016/054554,
20 WO2016/054557, o WO2016/065001.

Los componentes a ser cultivados en la célula huésped para empacar un vector rAAV en un cápside AAV pueden ser provistos a la célula huésped en *trans*. Alternativamente, cualquiera o más de los componentes requeridos (por ejemplo, vector AAV recombinante, secuencias rep, secuencias cap, y/o funciones de ayuda)
25 pueden suministrarse por una célula huésped estable que ha sido modificada para contener uno o más de los componentes requeridos usando métodos conocidos para los expertos en la materia. Más adecuadamente, dicha célula huésped estable contendrá los componentes requeridos bajo el control de un promotor inducible. Sin

embargo, los componentes requeridos pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo. Ejemplos de promotores inducibles y constitutivos son provistos acá, en la discusión de elementos reguladores adecuados para uso con el transgén. En otra alternativa, una célula huésped estable seleccionada puede contener

5 componentes seleccionados bajo el control de un promotor constitutivo y otros compuestos seleccionados bajo el control de uno o más promotores inducibles. Por ejemplo, se puede generar una célula huésped estable, la cual se deriva de células 293 (las cuales contienen funciones de ayuda E1 bajo el control de un promotor constitutivo), pero que contienen las proteínas rep y/o cap bajo el control de

10 promotores inducibles. Otras células huésped estables pueden ser generadas por un experto en la materia.

En algunas modalidades, la presente divulgación se relaciona con una célula huésped que contiene un ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación que codifica una proteína (por ejemplo, proteína MeCP2, tal como

15 isoforma e1 de MeCP2). En algunas modalidades, la presente divulgación se relaciona con una composición que comprende la célula huésped descrita anteriormente. En algunas modalidades, la composición que comprende la célula huésped anterior además comprende un crioprotector.

El vector AAV recombinante, las secuencias rep, las secuencias cap, y las

20 funciones de ayuda requeridas para producir el rAAV de la divulgación pueden ser entregados a la célula huésped de empaque usando cualquier elemento genético adecuado (vector). El elemento genético seleccionado puede ser entregado por cualquier método adecuado, incluyendo aquellos descritos acá. Los métodos usados para construir cualquier modalidad de esta divulgación, son conocidos para

25 los expertos en la materia en manipulación de ácido nucleico e incluyen ingeniería genética, ingeniería recombinante, y técnicas sintéticas. Ver, por ejemplo, Sambrook y otros, Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. De forma similar, los métodos para generar

viriones de rAAV son bien conocidos y la selección de un método adecuado no es una limitación sobre la presente divulgación. Ver, por ejemplo, K. Fisher y otros, J. Virol., 70:520-532 (1993) y la Patente No. US 5,478,745.

En algunas modalidades, los rAAV recombinantes pueden ser producidos usando el método de transfección triple (descritos en detalle en la Patente No. US 6,001,650). Típicamente, los rAAV recombinantes son producidos al transfectar una célula huésped con un vector AAV recombinante (que comprende un transgén) a ser empacado en partículas AAV, un vector de función de ayuda de AAV, y un vector de función de accesorio. Un vector de función de ayuda de AAV soporta la producción eficiente de vector AAV sin generar ningún virión de AAV de tipo salvaje detectable (es decir, viriones de AAV que contienen genes rep y cap funcionales). Ejemplos no limitantes de vectores adecuados para uso con la presente divulgación incluyen pHLP19, descrito en la Patente No. US 6,001,650 y pRep6cap6 descrito en la Patente No. US 6,156,303, la totalidad de ambos incorporados acá por referencia. El vector de función de accesorio codifica las secuencias de nucleótido para funciones virales y/o celulares derivadas de no AAV de las cuales depende AAV para replicación (es decir, "funciones accesorio"). Las funciones accesorio incluyen aquellas funciones requeridas para replicación de AAV, incluyendo, sin limitación, aquellas porciones involucradas en inactivación de transcripción de gen AAV, empalme de mRNA de AAV específico de etapa, replicación de ADN de AAV, síntesis de productos de expresión cap, y ensamble de cápside de AAV. Las funciones accesorio derivadas de viral pueden ser derivadas de cualquiera de los virus de ayuda conocidos tales como adenovirus, herpesvirus (diferentes a virus tipo 1 simplex de herpes), y virus vaccinia.

En algunos aspectos, la divulgación suministra células huésped transfectadas. El término "transfección" es usado para referirse a la captación de ADN extraño por una célula, y una célula ha sido "transfectada" cuando se ha introducido ADN exógeno dentro de la membrana celular. Un número de técnicas

de transfección son generalmente conocidas en el arte. Ver, por ejemplo, Graham y otros (1973) Virología, 52:456, Sambrook y otros (1989) Clonación Molecular, un manual de laboratorio, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Davis y otros (1986) Métodos Básicos en Biología Molecular, Elsevier, y Chu y otros (1981) Gen 5 13:197. Dichas técnicas pueden ser usadas para introducir uno o más ácidos nucleicos exógenos, tales como un vector de integración de nucleótido y otras moléculas de ácido nucleico, en células huésped adecuadas.

Una “célula huésped” se refiere a cualquier célula que alberga, o es capaz de albergar, una sustancia de interés. A menudo una célula huésped es una célula 10 mamífera. Una célula huésped puede ser usada como un receptor de una construcción de ayuda de AAV, un plásmido de minigen AAV, un vector de función accesorio, u otro ADN de transferencia asociado con la producción de AAV recombinantes. El término incluye la progenie de la célula original que ha sido transfectada. Así, una “célula huésped” como se usa acá puede referirse a una 15 célula que ha sido transfectada con una secuencia de ADN exógeno. Se entiende que la progenie de una célula parental simple puede no necesariamente ser completamente idéntica en morfología o en genómica o complemento de ADN total que el padre original, debido a mutación natura, accidental o deliberada.

Como se usa acá, el término “línea celular” se refiere a una población de 20 células capaces de crecimiento y división continua o prolongada *in vitro*. A menudo, las líneas celulares son poblaciones clonales derivadas de una célula progenitora simple. Además, se conoce en el arte que pueden ocurrir cambios espontáneos o inducidos en cariotipo durante el almacenamiento o transferencia de dichas poblaciones clonales. Por lo tanto, las células derivadas de la línea celular referida 25 pueden no precisamente ser idénticas a las células o cultivos ancestrales, y la línea célula referida incluye dichas variantes.

Como se usa acá, los términos “célula recombinante” se refiere a una célula en la cual un segmento de ADN exógeno, tal como segmento de ADN que lleva a la

transcripción de un polipéptido biológicamente activo o producción de un ácido nucleico biológicamente activo tal como un ARN, ha sido introducida.

Como se usa acá, el término “vector” incluye cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, cromosoma artificial, virus, virión, etc., el cual es capaz de replicación cuando se asocia con los elementos de control adecuados y los cuales pueden transferir secuencias de gen entre células. Así, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores virales. En algunas modalidades, se contempla que los vectores útiles son aquellos vectores en los cuales el segmento de ácido nucleico a ser transcrito se ubica bajo el control transcripcional de un promotor. Un “promotor” se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de un gen. Las frases “ubicada operativamente”, “bajo control” o “bajo control transcripción” significan que el promotor está en la correcta ubicación y orientación con relación al ácido nucleico para controlar la iniciación de polimerasa de ARN y la expresión del gen. El término “vector de expresión o construcción” significa cualquier tipo de construcción genética que contiene un ácido nucleico en el cual parte o toda la secuencia de codificación de ácido nucleico es capaz de ser transcrita. En algunas modalidades, la expresión incluye la transcripción del ácido nucleico, por ejemplo, para generar un producto de polipéptido biológicamente activo o ARN funcional (por ejemplo, ARN guía) a partir de un gen transcrito. Los métodos anteriores para empacar vectores recombinantes en cápsides de AAV diseñados para producir los rAAV de la divulgación no pretenden ser limitantes y otros métodos adecuados serán evidentes para el experto en la materia.

25

Métodos de Administración

Las composiciones descritas por la divulgación (por ejemplo, ácidos nucleicos recombinantes, rAAV, composiciones farmacéuticas, etc.) pueden ser

entregadas a un sujeto de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en el arte. Las composiciones (por ejemplo, ácidos nucleicos recombinantes, rAAV, composiciones farmacéuticas, etc.), preferiblemente suspendidas en un portador fisiológicamente compatible (es decir, en una composición), pueden ser

5 administradas a un sujeto, es decir, animal huésped, tal como un humano, ratón, rata, gato, perro, oveja, conejo, caballo, vaca, cabra, cerdo, conejillo de indias, hámster, pollo, pavo, o un primate no humano (por ejemplo, macaco). En algunas modalidades, un animal huésped no incluye un humano. En algunas modalidades, un sujeto es un humano. En algunas modalidades, un sujeto es menor a 1 año de

10 edad, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, u 11 meses.

La entrega de las composiciones a un sujeto mamífero puede ser, por ejemplo, por inyección sistémica (por ejemplo, inyección intravenosa) o inyección intratecal. También se pueden usar métodos adicionales de administración de composiciones al CNS de un sujeto, por ejemplo, inyección intracraneal, inyección

15 intraestriatal, etc. También se pueden usar combinaciones de métodos de administración (por ejemplo, administración tópica e inyección intraestromal).

En algunas modalidades, las composiciones de la divulgación pueden comprender un rAAV solo, o en combinación con uno o más otros virus (por ejemplo, una segunda codificación de rAAV que tiene uno o más transgenes diferentes). En

20 algunas modalidades, una composición comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más rAAV diferentes que cada uno tiene uno o más transgenes diferentes.

En algunas modalidades, una composición además comprende un portador farmacéuticamente aceptable. Portadores adecuados pueden ser seleccionados fácilmente por un experto en la materia en vista de la indicación para la que se dirige

25 la composición. Por ejemplo, un portador adecuado incluye salina, la cual puede ser formulada con una variedad de soluciones amortiguadoras (por ejemplo, salina amortiguada con fosfato). Otros portadores ejemplares incluyen salina estéril, lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, gelatina, dextrano, agar, pectina, aceite de

maní, aceite de sésamo, y agua. La selección del portador no es una limitación de la presente divulgación.

Opcionalmente, las composiciones de la divulgación pueden contener, adicional al ácido nucleico recombinante o rAAV y portadores, otros ingredientes farmacéuticos, tales como conservantes, o estabilizadores químicos. Conservantes
5 ejemplares adecuados incluyen clorobutanol, sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, galato de propilo, los parabenos, etil vainilla, glicerina, fenol, y paraclorofenol. Estabilizantes químicos adecuados incluyen gelatina y albumina.

Las composiciones son administradas en cantidades suficientes para
10 transfectar las células de un tejido deseado (por ejemplo, tejido CNS) y suministrar niveles suficientes de transferencia y expresión de gen sin efectos adversos indeseados. Ejemplos de rutas de administración farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, entrega directa al órgano seleccionado (por ejemplo, entrega intraestromal al ojo), oral, inhalación (incluyendo entrega intranasal o
15 intratraqueal), intraocular, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intratumoral, y otras rutas parentales de administración. Las rutas de administración se pueden combinar, si se desea.

La dosis de viriones de rAAV requerida para lograr un “efecto terapéutico” particular, por ejemplo, las unidades de dosis en copias de genoma/por kilogramo
20 de peso corporal (GC/kg), variarán con base en varios factores incluyendo, pero no limitado a: la ruta de administración de virión de rAAV, el nivel de expresión de gen o ARN requerido para lograr un efecto terapéutico, la enfermedad o desorden específico que es tratado, y la estabilidad del gen o producto de ARN. Un experto en la materia puede determinar fácilmente un rango de dosis de virión de rAAV para
25 tratar un paciente que tiene una enfermedad o desorden particular con base en los factores anteriormente mencionados, así como otros factores.

Una cantidad efectiva de composición (por ejemplo, ácido nucleico recombinante, rAAV, composición farmacéutica, etc.) es una cantidad suficiente

para infectar de forma enfocada a un animal, enfocar un tejido deseado. En algunas modalidades, una cantidad efectiva de un rAAV es una cantidad suficiente para producir un modelo animal transgénico somático estable. La cantidad efectiva dependerá principalmente de factores tales como la especie, edad, peso, salud del sujeto, y el tejido a ser enfocado, y así puede variar entre animal y tejido. Por ejemplo, una cantidad efectiva del rAAV está generalmente en el rango de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 100 ml de solución que contiene de aproximadamente 10^9 a 10^{16} copias de genoma. En algunos casos, una dosis entre 10^{11} a 10^{13} de copias de genoma de rAAV copias es adecuada. en ciertas modalidades, 10^{10} o 10^{11} copias de genoma de rAAV es efectivo para enfocar tejidos CNS (por ejemplo, tejido corneal). En algunos casos, los animales transgénicos estables son producidos por múltiples dosis de un rAAV.

En algunas modalidades, una dosis de la composición es administrada a un sujeto no más de una vez por día calendario (por ejemplo, un periodo de 24 horas).

En algunas modalidades, una dosis de la composición es administrada a un sujeto no más de una vez por 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días calendario. En algunas modalidades, una dosis de la composición es administrada a un sujeto no más de una vez por semana calendario (por ejemplo, 7 días calendario). En algunas modalidades, una dosis de la composición es administrada a un sujeto no más de quincenal (por ejemplo, una vez en un periodo de dos semanas calendario). En algunas modalidades, una dosis de la composición es administrada a un sujeto no más de una vez por mes calendario (por ejemplo, una vez en 30 días calendario). En algunas modalidades, una dosis de la composición es administrada a un sujeto no más de una vez por seis meses calendario. En algunas modalidades, una dosis de la composición es administrada a un sujeto no más de una vez por año calendario (por ejemplo, 365 días o 366 días en un año bisiesto).

En algunas modalidades, las composiciones son formuladas para reducir la agregación de partículas de AAV en la composición, particularmente cuando hay

presentes altas concentraciones de rAAV (por ejemplo, $\sim 10^{13}$ GC/ml o más). Se pueden usar métodos adecuados para reducir la agregación, incluyendo, por ejemplo, adición de tensoactivos, ajuste de pH, ajuste de concentración de sal, etc. (Ver, por ejemplo, Wright FR, y otros, *Terapia Molecular* (2005) 12, 171-178, cuyo contenido se incorpora acá por referencia).

La formulación de excipientes y soluciones portadoras farmacéuticamente aceptables es bien conocida para los expertos en la materia, ya que es el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares descritas acá en una variedad de regímenes de tratamiento.

Típicamente, estas formulaciones pueden contener por lo menos aproximadamente 01% del compuesto activo o más, aunque el porcentaje del ingrediente activo puede, desde luego, variar y puede estar convenientemente entre aproximadamente 1 o 2% y aproximadamente 70% u 80% o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad del compuesto activo en cada composición terapéuticamente útil puede ser preparada en una forma tal que se obtendrá una dosis adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Factores tales como solubilidad, biodisponibilidad, vida media biológica, ruta de administración, vida del producto, así como otras consideraciones farmacológicas serán contemplados por un experto en la materia de preparar dichas formulaciones farmacéuticas, y como tal, una variedad de regímenes de dosificación y tratamiento pueden ser deseables.

En algunas modalidades, las composiciones (por ejemplo, ácidos nucleicos recombinantes, rAAV, composiciones farmacéuticas, etc.) en las composiciones farmacéuticas adecuadamente formuladas divulgadas acá son entregadas directamente al tejido objetivo, por ejemplo, directo al tejido CNS (por ejemplo, cerebro, médula espinal, etc.). Sin embargo, en ciertas circunstancias puede ser deseable entregar de forma separada o adicional las composiciones por otra ruta, por ejemplo, de forma subcutánea, intraopacréatica, intranasal, parenteral,

intravenosa, intramuscular, intratecal, y oralmente, intraperitoneal, o por inhalación.

En algunas modalidades, las modalidades de administración como se describen en las Patentes No. US 5,543,158; 5,641,515 y 5,399,363 (cada una específicamente incorporada acá por referencia en su totalidad) pueden ser usadas para entregar

5 rAAV. En algunas modalidades, un modo de administración preferido es por inyección intravenosa.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Las dispersiones
10 también pueden ser preparadas en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. En varios casos la forma es estéril y fluida en la medida que exista fácil uso de jeringa. Esta debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y
15 almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y propilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por
20 ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser provocada por varios agentes antibacteriales y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En varios
25 casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada por el uso de las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para la administración de una solución acuosa inyectable, por ejemplo, la solución puede ser amortiguada adecuadamente, si es necesario, y el diluyente líquido primero produce isotónico con suficiente salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraperitoneal. En esta conexión, se puede emplear un medio acuoso estéril adecuado. Por ejemplo, una dosis puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónico y se puede bien sea adicionar a 1000 ml de fluido hipodermocclisis o inyectar en el sitio de infusión propuesto (ver, por ejemplo, “Ciencias Farmacéuticas de Remington”, 15ª Edición, páginas 1035-1038, y 1570-1580). Alguna variación en dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo de la condición del huésped. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis adecuada para el huésped individual.

Las soluciones estériles inyectables son preparadas al incorporar las composiciones (por ejemplo, ácidos nucleicos recombinantes, rAAV, composiciones farmacéuticas, etc.) en la cantidad requerida en el solvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados acá, como sea requerido, seguido por esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones son preparadas al incorporar los varios ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos indicados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada y estéril de los mismos.

Las composiciones (por ejemplo, ácidos nucleicos recombinantes, rAAV, composiciones farmacéuticas, etc.) divulgadas acá pueden también ser formuladas en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyen las

sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y los cuales se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico y fosfórico, o dichos ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres pueden también derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos, y dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Con la formulación, las soluciones serán administradas en una forma compatible con la formulación de dosificación y en dicha cantidad como es terapéuticamente efectiva. Las formulaciones son fácilmente administradas en una variedad de formas de dosificación, tales como, soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco, y similares.

Como se usa acá, “portador” incluye cualquier y otros los solventes, medio de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacteriales y antifúngicos, agentes de retraso isotónico y de absorción, amortiguadores, soluciones portadoras, suspensiones, coloides, y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en el arte. También se pueden incorporar ingredientes complementariamente activos en las composiciones. La frase “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa alérgica o similar cuando son administradas a un huésped.

Vehículos de entrega tales como liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas de lípido, vesículas, y similares, pueden ser usados para la introducción de las composiciones de la presente divulgación en células huésped adecuadas. En particular, los transgenes entregados por vector rAAV pueden ser formulados para entrega bien sea encapsulados en una partícula de lípido, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, o una nanopartícula o similares.

Dichas formulaciones pueden ser preferidas para la introducción de formulaciones farmacéuticamente aceptables de los ácidos nucleicos o las

construcciones de rAAV divulgadas acá. La formación y uso de liposomas es generalmente conocido para un experto en la materia. Recientemente, se desarrollaron liposomas con estabilidad mejorada de suero y tiempos de circulación mejores (Patente No. US 5,741,516). Además, varios métodos de liposoma y preparaciones similares a liposoma como portadores potenciales de fármaco han sido descritos (Patentes No. US 5,567,434; 5,552,157; 5,565,213; 5,738,868 y 5,795,587).

Los liposomas han sido usados exitosamente con un número de tipos de célula que son normalmente resistentes a transfección por otros procedimientos. Adicionalmente, los liposomas son libres de las restricciones de longitud de ADN que son típicas de sistemas de entregas de base viral. Los liposomas han sido usados efectivamente para introducir genes, fármacos, agentes radioterapéuticos, virus, factores de transcripción y efectores alostéricos en una variedad de líneas celulares cultivadas y animales. Adicionalmente, se han completado varias pruebas clínicas exitosas que examinan la efectividad de la entrega de fármacos mediada por liposoma.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que son dispersos en un medio acuoso y espontáneamente forman vesículas de bicapa concéntricas multilamelar (también denominados vesículas multilamelares (MLV). Las MLV generalmente tienen diámetros de 25 nm a 4 µm. La sonicación de MLV resulta en la formación de vesículas unilamelares (SUV) con diámetros en el rango de 200 a 500 nm, que contienen una solución acuosa en el núcleo.

Alternativamente, se pueden usar formulaciones de nanocápsula del rAAV. Las nanocápsulas pueden generalmente atrapar sustancias en una forma estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debido a sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (con tamaño de aproximadamente 0.1 µm) deben ser diseñadas usando polímeros capaces de ser degradados *in vivo*. Se

contemplan para uso nanopartículas biodegradables de polialquil-cianoacrilato que cumplen con estos requerimientos.

Métodos para tratar síndrome de Rett

5 En algunos aspectos, la divulgación se relaciona con composiciones y métodos para tratar síndrome de Rett. El síndrome de Rett es un desorden neurológico genético causado por una o más pérdidas de mutaciones de función en el gen *MeCP2*, por ejemplo, como se describe en Suter y otros, J. Autismo Dev Disord. 2014 Mar; 44(3): 703-711. En algunas modalidades, un sujeto que tiene
10 síndrome de Rett tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más pérdida de mutaciones de función en el gen *MeCP2*.

 Como se usa acá, los términos “tratamiento”, “tratar”, y “terapia” se refieren a tratamiento terapéutico y manipulaciones profilácticas o preventivas. Los términos además incluyen aliviar síntomas existentes, prevenir síntomas adicionales, aliviar
15 o prevenir las causas subyacentes de síntomas, prevenir o revertir las causas de los síntomas, por ejemplo, síntomas asociados con una enfermedad causada por una pérdida de mutación de función, por ejemplo, síndrome de Rett. Así, los términos denotan que se ha conferido un resultado beneficioso en un sujeto con un desorden (por ejemplo, síndrome de Rett), o con el potencial de desarrollar dicho
20 desorden. Adicionalmente, el término “tratamiento” se define como la aplicación o administración de un agente (por ejemplo, agente terapéutico o una composición terapéutica) a un sujeto, o un tejido aislado o línea celular de un sujeto, que puede tener una enfermedad, un síntoma de enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad, con el propósito de curar, sanar, aliviar, alterar, remediar, mejorar, o
25 afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

 Los agentes terapéuticos o composiciones terapéuticas pueden incluir un compuesto en una forma farmacéuticamente aceptable que previene y/o reduce los

síntomas de una enfermedad particular (por ejemplo, síndrome de Rett). Por ejemplo, una composición terapéutica puede ser una composición farmacéutica que previene y/o reduce los síntomas del síndrome de Rett. Se contempla que la composición terapéutica de la presente invención se suministrará en cualquier forma adecuada. La forma de la composición terapéutica dependerá de un número de factores, incluyendo el modo de administración como se describe acá. La composición terapéutica puede contener diluyentes, adyuvantes y excipientes, entre otros ingredientes como se describe acá.

10

EJEMPLO

Ejemplo 1: Análisis de expresión de gen de isoforma e1 de MeCP2 humano in vitro

Aproximadamente 80% de los casos de Rett son causados por mutaciones en el gen de enlace X que codifica la proteína de unión a CpG de metilo 2 (MeCP2), un regulador epigenético ampliamente expresado que es expresado en niveles altos en neuronas maduras. La mayoría de los pacientes de Rett portan un alelo normal y mutante de MeCP2. La enfermedad resulta de la inactivación aleatoria del cromosoma X donde ~50% de las neuronas son deficientes en MeCP2 debido a la inactivación del alelo normal, mientras que en el otro ~50% de las neuronas el alelo mutante está silenciado y se retiene la expresión normal de MeCP2 de tipo salvaje. La heterogeneidad de deficiencia de MeCP2 en el CNS tiene implicaciones importantes para el desarrollo de acercamientos de terapia de gen para síndrome de Rett. En modelos de ratón con Rett, se ha observado reversibilidad de fenotipos neurológicos después de la restauración de la expresión de MeCP2 normal en adultos. En estos experimentos transgénicos, la expresión de MeCP2 restaurada fue impulsada desde su locus genómico nativo y se logró la activación en la mayoría de células en el cerebro. Sin embargo, la transferencia de gen somático aún tiene que replicar cualquiera de estos éxitos.

Generalmente, el MeCP2 tiene una ventana muy estrecha de niveles de seguros de expresión, ya que los pacientes con una duplicación del locus MeCP2 típicamente presentan desarrollo retrasado motor y cognitivo así como discapacidad intelectual severa. Los experimentos en modelos de ratón transgénicos corroboran esta noción, ya que la expresión ectópica de MeCP2 es tóxica en animales de tipo salvaje, pero segura y parcialmente efectiva en aliviar fenotipos de enfermedad de ratones deficientes en MeCP2 cuando la expresión de transgén comienza durante el desarrollo embrionario. Notablemente, el gen MeCP2 es alternativamente empalmado para generar dos proteínas con diferentes terminales N, designados como MeCP2-e1 y MeCP-e2. Los pacientes con duplicación de locus MeCP2 sobreexpresan ambas isoformas de MeCP2. Por lo tanto, los síntomas en pacientes con duplicación de locus MeCP2 y resultados en ratones transgénicos pueden ser explicados mediante la sobreexpresión de la isoforma de MeCP-e2 y la sincronización de la expresión de transgén durante el desarrollo.

Experimentos terapéuticos previos de AAV9-MeCP2-e1 se han enfocado en la entrega intravascular (IV) o intracerebroventricular (ICV) neonatal y en algunos casos se ha encontrado toxicidad letal de hígado y atrofia de extremidades posteriores. Además, la edad de los ratones tratados en dichos experimentos no necesariamente corresponde con aquella probablemente a ser implementada en la mayoría de pacientes con Rett, los cuales presuntamente serán tratados después del apareamiento de los síntomas (6-18 meses). En humanos, la fase primaria de sinaptogénesis ocurre en los primeros 2 años y coincide con un aumento rápido en metilación de ADN no CG en neuronas, así como el comienzo de síntomas en pacientes Rett. En ratones, la sinaptogénesis ocurre entre 2 y 4 semanas de edad. Por lo tanto, es crítico examinar la eficacia y la toxicidad potencial de entrega de gen AAV-MeCP2 en etapas de desarrollo relevantes más allá del día postnatal 0-1. Adicionalmente, una limitación importante a implementar entrega de gen AAV sistémica para tratar desordenes de CNS es la transducción de órganos diferentes

al cerebro, tal como hígado, el cual es el órgano con el mayor tropismo de AAV en el cuerpo.

Se desarrolló una serie de vectores AAV-MeCP2 nuevos que eliminan la expresión de gen en órganos periféricos y también autorregulan la sobreexpresión de MeCP2. Generalmente, el mRNA de MeCP2 porta un UTR 3' corto (1.8kb) o largo (~10kb), con este último siendo la expresión de isoforma preferencial en el cerebro. Las construcciones de mRNA de MeCP2 descritas en este ejemplo comprenden una secuencia de codificación de proteína isoforma e1 de MeCP2 y varios elementos reguladores de miARN (MRE). Se observó que la traducción de MeCP2 en el CNS es regulada por miR-132 a través de un mecanismo homeostático que involucra cambios en niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en respuesta a la expresión de MeCP2 (Figura 1A). Con base en este mecanismo una serie de vectores AAV-MeCP2 con números en aumento de los MRE de miR-132 (por ejemplo, sitios de unión a miR-132) acoplados a un número fijo de MRE para miR-1 y miR-122 (por ejemplo, sitios de unión a 3x-miR-1 y 3x-miR-122) para desenfocar la expresión de gen AAV de músculo esquelético e hígado (Figura 1B).

Se llevaron a cabo una serie de experimentos *in vitro*. Brevemente, células HEK293T fueron transfectadas con 30000 gc/célula de AAV2-MeCP2 por cuatro días. Las Figuras 2A-2B muestran la expresión efectiva de AAV2-MeCP2 en células HEK293T, como se mide por Western Blot (Figura 2A) y ensayo de expresión de proteína normalizada (Figura 2B). La Figura 2C muestra un perfil de toxicidad de células 293T transducidas con AAV2-MeCP2 por cuatro días a una dosis de 30000 gc/célula.

Un estudio de respuesta de dosis en neuronas corticales primarias de ratón mostraron efectos comparables sobre supervivencia celular para vectores AAV-GFP y AAV-MeCP2 (Figura 3A), indicando que la expresión de MeCP2 humano etiquetado con myc de un promotor corto de MeCP2 de ratón (-223 a +56) no es

tóxico para las neuronas primarias en el cultivo. Adicionalmente, se observó que los niveles de proteína MeCP2-myc fueron inversamente proporcionales al número de MRE miR-132 (por ejemplo, sitios de unión a miR-132) presentes en el transcripto MeCP2-myc (Figura 3B). La Figura 3C muestra la expresión de miR-132 en
5 respuesta a AAV2-MeCP2 cinco días después de la infección con AAV.

Ejemplo 2: Análisis de expresión de gen de isoforma e1 de MeCP2 humano en ratones tipo salvaje después de la entrega sistémica de AAV-MeCP2

Para extender las observaciones *in vitro* que demuestran la capacidad de
10 titular los niveles de MeCP2 mediante la inserción de secuencias objetivo de miR-132 descritas en el Ejemplo 1, ratones tipo salvaje postnatales de 1 día fueron inyectados por medio de la vena facial (por ejemplo, inyección intracraneal) con AAV que codifica la isoforma e1 de MeCP2 que contiene 0, 1x, 2x, o 3x secuencias objetivo de miR-132. El análisis de expresión de gen de tejido de cerebro indicó que
15 los niveles de MeCP2 son inversamente proporcionales al número de secuencias objetivo miR132 (Figuras 4A-4C).

En algunas modalidades, la administración sistémica de algunos serotipos de AAV puede transducir tejidos fuera del sistema nervioso central, y se ha observado que la expresión elevada de MeCP2 en tejidos de hígado, cardíacos y esqueléticos
20 está asociada con consecuencias fisiológicas perjudiciales. Para minimizar la transducción de MeCP2 en corazón e hígado, los vectores AAV-MeCP2 descritos por la divulgación contienen por lo menos una secuencia objetivo miR-1 (por ejemplo, 3x-miR-1) y por lo menos una miR-122 (por ejemplo, 3x-miR-122) (por ejemplo, sitios de unión) para desenfocar la expresión de MeCP2 del corazón y el
25 hígado, respectivamente. Se realizó análisis qRT-PCR usando cebadores contra MeCP2 e2 humano (el cual fue indetectable), y MeCP2 e1 y e2 de ratón (los cuales no cambiaron). El análisis de expresión de gen de tejido de corazón e hígado a partir de animales de tipo salvaje indicó que el MeCP2 es efectivamente desenfocado del

corazón y el hígado, como se evidencia mediante la expresión sustancialmente reducida en comparación con el cerebro (Figura 4A y Figura 5).

Ejemplo 3: Eficacia y seguridad terapéutica de vectores autorreguladores de AAV-

5 *MeCP2*

Se examinó la eficacia y la seguridad terapéutica de vectores AAV-MeCP2-e1 en ratones. En algunas modalidades, se usó proteína cápside de AAV-PHP.B, ya que esta cápside tiene eficiencia de transducción neuronal mejorada. Ratones Mecp2-nulo ($Mecp2^{tm1.1Ave/J}$; Macho^{-/-} y hembra^{+/-}) en 4 semanas de edad fueron
10 tratados mediante administración sistémica de vectores AAV-PHP.B-MeCP2-e1 que portan diferentes casetes MRE (por ejemplo, en dosis de vector de 1E11, 3E11, 1E12 vg/ratón) y el peso corporal y los puntajes fenotípicos son monitoreados cada dos semanas. Como controles, se usaron ratones MeCP2/Mecp2^{tm1.1Ave} inyectados con vehículo y ratones tipo salvaje. Un subconjunto de ratones en cada cohorte
15 (n=8; 4 machos y 4 hembras) son sacrificados a 8 semanas después de la inyección y se cuantificó la expresión de MeCP2 por western blot y se comparó entre los grupos. Se evaluó la eficiencia de transducción en el cerebro mediante manchado doble de inmunofluorescencia para MeCP2 y neuronas (usando el marcador neuronal NeuN) se realizó cuantificación de neuronas transducidas (MeCP2+,
20 NeuN+) en córtex, cuerpo estriado, tálamo, hipocampo y cerebelo. Los niveles de PSD-95 fueron evaluados por western blot e inmunomanchado de secciones de cerebro; PSD-95 es una proteína de andamio clave en maduración sináptica cuyos niveles se disminuyen en cerebros de ratones MeCP2-nulos.

Para realizar análisis de biodistribución de vector, el ADN genómico es
25 aislado de diferentes regiones del CNS y órganos periféricos y es analizado por PCR digital. Otro subconjunto de animales en cada cohorte (n=16; 8 machos y 8 hembras) es usado para análisis de supervivencia y longitudinal de comportamiento (por ejemplo, campo abierto; interacción social) y desempeño motor (por ejemplo,

rotarod, caminata de cuadrícula) así como pletismografía completa de cuerpo para evaluar los patrones de respiración y característica de apnea de ratones MeCP2-nulo. Los estudios de punto final son los mismos que a 8 semanas después del tratamiento. También se evaluó la seguridad de los vectores en ratones tipo salvaje en un estudio de escalación de dosis usando dosis idénticas a las indicadas anteriormente con puntos finales en 7, 30, 90 y 180 días para evaluar el CNS y tejidos periféricos para evidencia de toxicidad. También se evaluó la biodistribución de vector AAV y expresión de MeCP2.

10 *Ejemplo 4: Caracterización de cambios en el genoma/transcriptoma de neuronas transducidas después de transferencia de gen AAV-MeCP2 en diferentes etapas de desarrollo de sistema nervioso*

Un aspecto clave en el desarrollo de un enfoque de terapia de gen segura y efectiva para Rett es caracterizar en detalle el impacto de la expresión *de novo* de MeCP2 en el entorno epigenético y el perfil transcriptómico de neuronas transducidas. Para este propósito, se producen vectores AAV-PHP.B-MeCP2-e1 que llevan un casete IRES-GFP, y se permite el aislamiento de células GFP⁺ del cerebro, cerebelo y médula espinal por FACS o microdissección de captura por láser seguido por secuenciación de bisulfito de genoma completo (MetilC-Seq), ARN-seq pequeño (microARN), y ARN-Seq (mARN y ARN no codificados). Los machos MeCP2^{-y}, las hembras MeCP2^{-/+} y los controles de tipo salvaje (machos y hembras) recibieron una inyección sistémica de AAV-PHP.B-MeCP2-e1-IRES-GFP, vector de control (sin cADN de MeCP2) y vehículo en el día 1, 7, 14, y 28, así como a 12 semanas de edad en una dosis óptima. Los ratones (n=8, 4 machos y 4 hembras) fueron sacrificados a 1 o 3 meses después de la inyección para evaluar los parámetros indicados anteriormente. La información sobre microARN que se sobreexpresaron en respuesta a la expresión de MeCP2 es usada para establecer

capas adicionales de regulación de expresión de gen adicional a aquella con base en miR-132.

Ejemplo 5: Contribución de isoformas de MeCP2 para éxito terapéutico o comienzo de síntomas neurológicos como una función de intervención en diferentes etapas de desarrollo

Se ha observado que la expresión de MeCP2 de 1.6 a 6 veces por encima de los niveles fisiológicamente normales causa síntomas neurológicos en pacientes con duplicación de locus de MeCP2 (~2 veces por encima de lo normal) y modelos de ratón transgénicos. El otro punto común entre pacientes y modelos de ratón transgénicos es que ambos sobreexpresan la isoforma MeCP2-e2, la cual a diferencia de la isoforma e1 parece ser tóxica para las neuronas primarias en el cultivo. En algunas modalidades, este efecto tóxico es eliminado por la co-expresión de FoxG1, el cual es otro gen donde las mutaciones están asociadas con el síndrome de Rett. En algunas modalidades, la co-expresión de FoxG1 con MeCP2 es un mecanismo adicional para controlar los efectos secundarios asociados con la sobreexpresión de MeCP2. Experimentos terapéuticos, de seguridad y epigenómicos/transcriptómicos con vectores AAV-PHP.B que codifican MeCP-e1, MeCP2-e2, MeCP2-e2 y FoxG1, o FoxG1 solo, fueron realizados en machos MeCP2^{-/-}, hembras MeCP2^{+/-} y controles tipo salvaje que coinciden en edad.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2019/0014840
Recibo: 21-124511
Fecha: 13/12/2021

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 614653
CUS: 1243332882

Patente PCT
VECTORES AAV AUTO REGULADORES PARA LA EXPRESION SEGURA DE MECP2 EN SIDROME DE RETT

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 169,680	\$ 169,680
TOTAL					\$ 169,680