

ÁCIDO NUCLEICO INHIBIDOR DIRIGIDO A LA EXPRESIÓN DE ALFA SINUCLEÍNA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. Nro. 63/591,879, presentada el 20 de octubre de 2023, la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. Nro. 63/565,101, presentada el 14 de marzo de 2024, y la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. Nro. 63/696,066, presentada el 18 de septiembre de 2024, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE

[0002] El contenido del listado de secuencias electrónico (065830.21WO1; tamaño: 338,301 bytes; y fecha de creación: 11 de octubre de 2024) se incorpora en la presente solicitud como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] Las sinucleinopatías son enfermedades o trastornos neurodegenerativos caracterizados por inclusiones neuronales y/o gliales. Patológicamente, las sinucleinopatías se pueden dividir en dos grupos principales de enfermedades: enfermedades o trastornos de cuerpos de Lewy y atrofia multisistémica (MSA, por sus siglas en inglés). Las enfermedades y los trastornos de cuerpos de Lewy se caracterizan por la agregación de α -sinucleína, e incluyen la enfermedad de Parkinson, la demencia por enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, distrofia neuroaxonal infantil, distrofia neuroaxonal atípica, distonía-parkinsonismo de inicio en la edad adulta, parkinsonismo autosómico recesivo de inicio temprano, neurodegeneración asociada a POLG, tipo C1 de Niemann-Pick y enfermedad de Krabbe (Koga et al. Molecular Neurodegeneration (2021) 16:83).

[0004] La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo progresivo relacionado con la edad. La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la acumulación anormal de agregados de proteína α -sinucleína mal plegada en diversas regiones del cerebro. La pérdida neuronal dopaminérgica en la sustancia negra es un sello patológico de la enfermedad de Parkinson (Lee et al. Neuroimmunol. Neuroinflammation (2021) 8: 222-44; y Koga et al. Molecular Neurodegeneration (2021) 16:83).

[0005] Se han utilizado diferentes tratamientos para la enfermedad de Parkinson sintomática, tales como la terapia de reemplazo de dopamina, para tratar los síntomas motores asociados con la enfermedad de Parkinson. En la etapa temprana de la

enfermedad, los síntomas motores generalmente se pueden controlar bien con medicamentos para la sintomatología. A medida que avanza la enfermedad de Parkinson, dichos tratamientos se vuelven menos efectivos y se asocian con efectos secundarios debilitantes (p. ej., disquinesia), lo que lleva a un empeoramiento del funcionamiento y la calidad de vida (Poewe et al., Nat. Rev. Dis. Primers 3, 17013 (2017)).

[0006] Se ha propuesto que diferentes ARN inhibidores disminuyen la expresión de α -sinucleína (ver, por ejemplo, McCormack et al., PLoS One. 11 de agosto de 2010; 5(8): e12122; Kim et al., Front. Neurol. 31 de enero de 2017; 8:13; Alarcón-Arís et al., Mol. Ther. 7 de febrero de 2018; 26(2): 550-567; Bohn y Sapru, Patente Estadounidense Nro. 8,389,487; y Menon et al., Brain Communications, volumen 3, número 4, 2021, fcab247, [hypertext://doi.org/10.1093/braincomms/fcab247](https://doi.org/10.1093/braincomms/fcab247)).

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCION

[0007] La presente invención presenta construcciones de polinucleótidos que comprenden secuencias que se dirigen al ARNm de α -sinucleína. Las construcciones de polinucleótidos incluyen polinucleótidos de ARN inhibidores que comprenden una secuencia que se dirige al ARNm de α -sinucleína, tal como pri-microARN (pri-miARN), pre-microARN (pre-miARN), ARN de horquilla corta (ARNsh), microARN (miARN) y opcionalmente miARN modificado. Las construcciones que comprenden secuencias que se dirigen al ARNm de α -sinucleína y/o secuencias codificantes se pueden utilizar, por ejemplo, en métodos para inhibir la expresión de α -sinucleína y/o tratar una enfermedad o trastorno de sinucleinopatía.

[0008] Una secuencia "dirigida" al ARNm de α -sinucleína es capaz de hibridarse con una secuencia diana de ARNm de α -sinucleína sustancialmente complementaria. Las secuencias diana del ARNm de alfa-sinucleína descritas en el presente documento incluyen las de cualquiera de las SEQ ID NO: 129-135 y el complemento de cualquiera de las SEQ ID NO: 32-62.

[0009] La referencia a polinucleótido de ARN "inhibidor" indica que el polinucleótido comprende una secuencia que se dirige a un ARNm que puede inhibir la actividad del ARNm. La inhibición de la actividad del ARNm produce una disminución de la expresión de proteína del ARNm objetivo. El ARN inhibidor incluye, por ejemplo, miARN y precursores de miARN tales como pre-miARN, ARNsh y pri-miARN.

[0010] Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención describe un polinucleótido de ARN que comprende una secuencia de ARN que se dirige a ARNm de α -sinucleína. El polinucleótido de ARN comprende una secuencia de ARN de direccionamiento que tiene

una identidad de secuencia de por lo menos 90 % con la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 32-62.

[0011] Un segundo aspecto de la presente invención se dirige a una dupla de ARN inhibidor opcionalmente modificado que comprende (a) una hebra guía capaz de hibridar con la secuencia diana de cualquiera de SEQ ID NOs: 129-135; y (b) una secuencia pasajera sustancialmente complementaria; donde uno o más nucleótidos de la hebra guía y la hebra pasajera son ARN opcionalmente modificado.

[0012] Un tercer aspecto de la presente invención se dirige a un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polinucleótido de ARN que comprende una secuencia de direccionamiento a ARNm de α -sinucleína.

[0013] Un cuarto aspecto de la presente invención se dirige a un casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polinucleótido de ARN que comprende una secuencia de direccionamiento a ARNm de α -sinucleína y uno o más elementos de control de expresión operativamente unidos a la secuencia de ácido nucleico codificante.

[0014] Un quinto aspecto de la presente invención se dirige a ácido nucleico de vector viral recombinante que comprende (a) un casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polinucleótido de ARN que comprende una secuencia de direccionamiento a ARNm de α -sinucleína y uno o más elementos de control de expresión operativamente unidos a la secuencia de ácido nucleico codificante y (b) elementos virales 5' y/o 3' que proporcionan empaquetado y/o replicación viral.

[0015] Un sexto aspecto de la presente invención se dirige a un vehículo de suministro que comprende un vector viral o no viral y (a) un polinucleótido de ARN que comprende una secuencia que se dirige a ARNm de α -sinucleína; (b) una dupla de ARN inhibidor opcionalmente modificado que se dirige a ARNm de α -sinucleína; o (c) un polinucleótido, casete de expresión, o ácido nucleico viral recombinante que comprende una secuencia que codifica para un polinucleótido de ARN que comprende una secuencia de direccionamiento a ARNm de α -sinucleína.

[0016] Un séptimo aspecto de la presente invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende (a) un polinucleótido de ARN que comprende una secuencia que se dirige a ARNm de α -sinucleína, (b) una dupla de ARN inhibidor opcionalmente modificado que se dirige a ARNm de α -sinucleína, (c) un polinucleótido, casete de expresión, o ácido nucleico viral recombinante que comprende una secuencia que codifica para una secuencia de direccionamiento a ARNm de α -sinucleína o (d) un vehículo de suministro que comprende (a), (b) o (c); y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0017] Un octavo aspecto de la presente invención se dirige a un método para reducir la expresión de α -sinucleína y/o tratar una enfermedad o un trastorno de sinucleinopatía en un sujeto, que comprende la administración de: (a) un polinucleótido de ARN que comprende una secuencia que se dirige a ARNm de α -sinucleína, (b) una dupla de ARN inhibidor opcionalmente modificado que se dirige a ARNm de α -sinucleína, (c) un polinucleótido, casete de expresión, o ácido nucleico viral recombinante que comprende una secuencia que codifica para una secuencia de direccionamiento a ARNm de α -sinucleína o (d) un vehículo de suministro que comprende (a), (b) o (c) y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0018] Un noveno aspecto de la presente invención se dirige a un método de tratamiento de una enfermedad o un trastorno asociado con baja dopamina que comprende la administración de: (a) un polinucleótido de ARN que comprende una secuencia que se dirige a ARNm de α -sinucleína, (b) una dupla de ARN inhibidor opcionalmente modificado que se dirige a ARNm de α -sinucleína, (c) un polinucleótido, casete de expresión, o ácido nucleico viral recombinante que comprende una secuencia que codifica para una secuencia de direccionamiento a ARNm de α -sinucleína o (d) un vehículo de suministro que comprende (a), (b) o (c) y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[0019] Aspectos adicionales de la presente invención incluyen (a) un polinucleótido de ARN que comprende una secuencia que se dirige a ARNm de α -sinucleína, (b) una dupla de ARN inhibidor opcionalmente modificado que se dirige a ARNm de α -sinucleína, (c) un polinucleótido, casete de expresión, o ácido nucleico viral recombinante que comprende una secuencia que codifica para una secuencia de direccionamiento a ARNm de α -sinucleína o (d) un vehículo de suministro que comprende (a), (b) o (c) y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, para el uso en medicina, para reducir α -sinucleína, o tratar una enfermedad o un trastorno de sinucleinopatía; y uso de (a), (b), (c), o (d) en la preparación de un medicamento (por ejemplo, para el uso en medicina, para reducir α -sinucleína o tratar una enfermedad o un trastorno de sinucleinopatía).

[0020] Otras características y ventajas de la presente invención son evidentes a partir de descripciones adicionales proporcionadas en este documento, que incluyen diferentes ejemplos. Los ejemplos proporcionados ilustran diferentes componentes y metodología útiles para la puesta en práctica de la presente invención. Dichos ejemplos no limitan la invención reivindicada. Sobre la base de la presente divulgación, el experto en la técnica puede identificar y emplear otros componentes y metodología útiles para la puesta en práctica de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0021] La FIG. 1 ilustra la capacidad de diferentes ARN interferentes pequeños (ARNsi) para reducir la expresión del gen humano que codifica la α -sinucleína (SCNA) en células HEK293. Los ARNsi se proporcionaron en concentraciones de 1 nM, 10 nM o 100 nM. GAPDH se refiere a gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

[0022] La FIG. 2A, FIG. 2B y FIG. 2C ilustran el porcentaje de supervivencia de células HEK293 a las que se les administró una cantidad diferente de ARNsi. La FIG. 2A muestra resultados usando 1 nM. La FIG. 2B muestra resultados usando 10 nM. La FIG. 2C muestra resultados usando 100 nM. GAPDH se refiere a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

[0023] La FIG. 3 ilustra la capacidad de diferentes ARNsi para inhibir la expresión de una proteína de fusión de α -sinucleína-GFP en células HEK293. La actividad graficada fue proteína fluorescente verde (GFP)/vinculina normalizada para el control sin tratamiento. Los controles proporcionados fueron siGLO, un control desordenado (control sin direccionamiento con fluorescencia roja); desajuste11 (control sin direccionamiento); y condiciones sin tratamiento.

[0024] La FIG. 4A y la FIG. 4B ilustran el impacto de diferentes ARNsi que se dirigen a la expresión de SNCA, sobre genes relacionados en células HEK293. La FIG. 4A ilustra la expresión de SNCB (gen que codifica β -sinucleína) en concentraciones de ARNsi de 1 nM, 10 nM o 100 nM. La FIG. 4B ilustra la expresión de SNCG (gen que codifica γ -sinucleína) en concentraciones de ARNsi de 1 nM, 10 nM o 100 nM. GAPDH se refiere a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

[0025] La FIG. 5 ilustra la capacidad de diferentes ARNsi para inhibir la expresión en células SH-SY5Y, en diferentes concentraciones.

[0026] La FIG. 6 es un gráfico que muestra la expresión diferencial (DE, por sus siglas en inglés) de genes resultantes de diferentes ARNsi.

[0027] La FIG. 7 ilustra la capacidad de diferentes pre-miARN para reducir la señal de GFP normalizada (como una medida de la expresión de SCNA) en comparación con pCC41. Los pre-miARN se muestran con una designación de miR. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando ANOVA bidireccional con análisis de comparación múltiple de Dunnett.

[0028] La FIG. 8A y la FIG. 8B ilustran la capacidad de diferentes vectores de rAAV que comprenden ácido nucleico que codifica pre-miARN para inhibir la expresión de α -sinucleína y la agregación de α -sinucleína en dos multiplicidades diferentes de infecciones. La FIG. 8A ilustra la α -sinucleína humana normalizada a AAV- α -sinucleína (AAV- α -syn). La FIG. 8B ilustra la intensidad normalizada de pS129 a AAV- α -sinucleína.

La intensidad de pS129 es una medida de la agregación de α -sinucleína. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando ANOVA bidireccional contra AAV- α Syn.

[0029] Las FIGS. 9A-9D ilustran la capacidad de diferentes vectores de rAAV que comprenden ácido nucleico que codifica pre-miARN, para inhibir la expresión de α -sinucleína. La FIG. 9A ilustra el cambio en pliegues con respecto a la α -sinucleína humana + mis11. La FIG. 9B ilustra la inhibición de la producción de α -sinucleína humana. La FIG. 9C ilustra la reducción en la α -sinucleína mutante (A53T). La FIG. 9D ilustra el efecto sobre la expresión de α -sinucleína de ratón. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando ANOVA de unidireccional con comparación múltiple de Dunnett.

[0030] Las FIGS. 10A-10D ilustran la biodistribución de miARN y la inhibición de la α -sinucleína murina. La FIG. 10A ilustra la biodistribución en la sustancia negra (SN) y el cuerpo estriado (Str). La FIG. 10B ilustra la expresión de SNCA murino (mSCNA) en la SN y el Str. La FIG. 10C ilustra la expresión de mSCNA en la sustancia negra. La FIG. 10D ilustra la expresión de mSCNA en el cuerpo estriado.

[0031] La FIG. 11 ilustra los niveles de hebras guía y pasajera de vectores de rAAV.

[0032] La FIG. 12 ilustra el efecto de diferentes dosis sobre el peso corporal de ratones tratados con α Syn. Se administró a los ratones una dosis de 7,5e9 vg/SN de α Syn humana (AAV1/2-A53T α Syn) para inducir la pérdida neuronal mediada por α -sinucleína. Los animales de tratamiento recibieron dosis de 5e7, 5e8 o 5e9 genomas de vector (vg) de rAAV-miR5. A los controles se les administró diluyente o mis11 (construcción sentido erróneo) a 5e9 vg + α Syn. Estadísticas: ANOVA unidireccional ordinario con análisis post-hoc de Tukey.

[0033] Las FIGS. 13A y 13B ilustran la distribución de rAAV-miR5 en la sustancia negra. Los animales de tratamiento recibieron dosis de 5e7, 5e8 o 5e8 genomas de vector (vg) de rAAV-miR5. A los controles se les administró diluyente o mis11 (construcción de sentido erróneo) a 5e9 vg + α Syn. La presencia del vector en la sustancia negra se evaluó utilizando cebadores específicos diseñados sobre la base de las secuencias de poliA de BgH y RbG. El vector AAV1/2-A53T α Syn tiene una poliA de BgH; rAAV-miR5 y rAAV-CAG-mis11 tienen una poliA de RbG. La FIG. 13A ilustra la medición de poliA de BgH. La FIG. 13B ilustra la medición de poliA de RbG.

[0034] La FIG. 14 ilustra la capacidad de rAAV-miR5 para bloquear por disminución α Syn, medida por qRT-PCR. Los animales de tratamiento recibieron dosis de 5e7, 5e8 o 5e8 genomas de vector (vg) de rAAV-miR5. A los controles se les administró diluyente o mis11 (construcción de sentido erróneo) a 5e9 vg + α Syn. Las estadísticas se realizaron mediante ANOVA unidireccional ordinario con prueba de comparación múltiple de Tukey.

**p<0,01, *p<0,05.

[0035] La FIG. 15 ilustra la capacidad de rAAV-miR5 para bloquear por disminución α Syn en la corteza, medida mediante el ensayo JESS. Los animales de tratamiento recibieron dosis de $5e7$, $5e8$ o $5e9$ genomas de vector (vg) de rAAV-miR5. A los controles se les administró diluyente o mis11 (construcción de sentido erróneo) a $5e9$ vg + α Syn. ANOVA unidireccional ordinario, comparación múltiple de Tukey. *** $p < 0,001$. Comparación realizada con control negativo + AST α Syn.

[0036] La FIG. 16 ilustra la capacidad de rAAV-miR5 para inhibir la pérdida de dopamina causada por A53T α Syn. Los animales de tratamiento recibieron dosis de $5e7$, $5e8$ o $5e9$ genomas de vector (vg) de rAAV-miR5. A los controles se les administró diluyente o mis11 (construcción de sentido erróneo) a $5e9$ vg + α Syn. Los datos representan un número absoluto. ANOVA unidireccional ordinario y prueba post hoc de Tukey realizados en valores de escala logarítmica de los puntos de datos. Comparación realizada con control negativo + AST α Syn. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

[0037] La FIG. 17 ilustra la capacidad de rAAV-miR5 para inhibir la pérdida de dopamina causada por α Syn A53T. Los animales de tratamiento recibieron dosis de genomas de vector de rAAV-miR5 (vg) en dosis de $5e7$, $5e8$ o $5e9$. A los controles se les administró diluyente o mis11 (construcción de sentido erróneo) a $5e9$ vg + α Syn. ANOVA unidireccional ordinario y comparación múltiple de Tukey. Comparación realizada con control negativo + AST α Syn. **** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

[0038] La FIG. 18 ilustra el procesamiento de microARN determinado por secuenciación de ARN pequeño después de la administración de rAAV-miR5. G/P se refiere a la relación guía/pasajero.

[0039] La FIG. 19 resume los resultados de la secuenciación de ARN pequeño. La maquinaria de miARN endógena no fue perturbada por la sobreexpresión de rAAV-miR5. Los animales de tratamiento recibieron dosis de genomas de vector rAAV-miR5 (vg) en dosis de $5e7$, $5e8$ o $5e9$. En la dosis más alta, $5e9$ vg, el miARN madurado exógeno fue el 1 % del conjunto total de miARN endógeno. Las dosis media y baja $5e8$ y $5e7$ vg dieron como resultado miARN exógeno de $< 0,1$ % del conjunto total de miARN endógeno. El grupo tratado con diluyente, el grupo de control negativo, no tenía miARN.

[0040] La FIG. 20 ilustra la capacidad de rAAV-miR5 para reducir significativamente los niveles de ARNm de SNCA humano en una dosis de $5e9$ vg/SN, medida mediante RT-qPCR de ARNm de SNCA humano en la SN en comparación con el grupo al que se le inyectó diluyente en ratones hembra SNCA-OVX. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Los datos se representan gráficamente como medias individuales (símbolos) y grupales $\pm$ SEM (barras).

[0041] Las FIGS. 21A y 21B ilustran la biodistribución de los genomas del vector y la expresión de miR5, respectivamente, en la sustancia negra de monos verdes africanos ("AGM") dos meses después de la administración de rAAV-miR5. El eje X representa tres dosis probadas de rAAV-miR5 (3e8 vg, 3e9 vg y 3e10 vg por sustancia negra), y el eje Y representa el número de copias (CN) de genomas de vector/ μ g de ADN (FIG. 21A) o CN de miARN miR5/ μ g de ARN (FIG. 21B). El análisis de expresión de miARN mostró una distribución dependiente de la dosis de rAAV-miR5 en la sustancia negra.

[0042] La FIG. 21C ilustra la expresión relativa de ARNm de SNCA por grupo de dosificación de AGM. El eje X representa los dos grupos de control (diluyente y mis11) así como las tres dosis de rAAV-miR5 que se administraron (3e8 vg, 3e9 vg y 3e10 vg por sustancia negra). El eje Y representa el cambio de pliegues en relación con el grupo de diluyente. Para todos los grupos, n = 2 AGM. Mis11 se refiere a un miARN no dirigido expresado bajo un promotor sintético EF-1 α .

[0043] La FIG. 21D muestra el análisis inmunohistoquímico (IHC) de la intensidad de la proteína α -sinucleína citoplasmática (también denominada en este documento α -Syn) en neuronas dopaminérgicas (DA) positivas para tirosina hidroxilasa (TH) de la sustancia negra, lo que indica una reducción dependiente de la dosis mediada por rAAV-miR5 de la proteína α -Syn citoplasmática. Cada grupo tenía 2 AGM (n=2/grupo) analizados, y cada punto de datos representa una neurona DA analizada (2000-2500 células totales/grupo) de una sección que contiene SN. El eje X representa el Grupo 1 (diluyente), el Grupo 2 (mis11), el Grupo 3 (rAAV-miR5 administrado a 3e8 vg por sustancia negra), el Grupo 4 (rAAV-miR5 administrado a 3e9 vg por sustancia negra) y el Grupo 5 (rAAV-miR5 administrado a 3e10 vg por sustancia negra). El eje Y representa la intensidad de α -Syn. Cada punto de datos representa la media de valores por mono, donde se recogieron 2 punciones de tejido para el análisis. Las barras de error representan SEM.

[0044] Las FIGS. 22A, 22B y 22C proporcionan representaciones gráficas del análisis de biodistribución del número de copias del genoma del vector (CN), informado como CN por microgramo de ADN genómico, en dosis individuales de 3e10 vg/SN (FIG. 21A), 3e9 vg/SN (FIG. 21B) y 3e8 vg/SN (FIG. 21C). El CN se determinó utilizando una sonda de cebador dirigida a una secuencia única de globina poliA de conejo. El eje X representa los ganglios basales y las estructuras cerebrales adyacentes, mientras que el eje Y representa el CN/ μ g de ADN. Hay un aumento dependiente de la dosis de rAAV-miR5 en la sustancia negra y una distribución relativamente baja a moderada en regiones cerebrales adyacentes conectadas anatómicamente de estructuras de ganglios basales tales como el núcleo subtalámico y el globo pálido. El análisis de biodistribución de otras regiones cerebrales de los ganglios basales y las estructuras corticales muestra que la

distribución de rAAV-miR5 está contenida principalmente dentro de la región objetivo. Cada grupo tenía 2 AGM ($n = 2/\text{grupo}$), y cada punto de datos representa la media de valores por animal (2 punciones/SN).

[0045] La FIG. 22D representa un perfil de bloqueo por disminución del ARNm de SNCA global en regiones cerebrales críticas por rAAV-miR5. El análisis RT-qPCR del ARNm de SNCA demostró una reducción dependiente de la dosis del ARNm de SNCA en SN (en $>50\%$ en una dosis de 3×10^{10} vg/SN) en comparación con el grupo de control (incluye animales tratados con diluyente y el grupo de control mis11 para tener en cuenta la variabilidad basal del nivel endógeno de SNCA) a los 2 meses posteriores a la necropsia. En línea con el análisis de biodistribución y el análisis de expresión de miARN, el bloqueo por disminución de la expresión del gen objetivo está contenido en SN y partes de las estructuras de los ganglios basales conectadas anatómicamente. Cada grupo tuvo 2 AGM ($n = 2/\text{grupo}$), y cada punto de datos representa la media de valores por punción por animal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0046] La presente invención presenta construcciones de polinucleótidos de ARN que comprenden secuencias que se dirigen a ARNm de α -sinucleína y ácido nucleico codificante. Las construcciones de polinucleótidos de ARN incluyen polinucleótidos de ARN inhibidor que comprende una secuencia que se dirige a ARNm de α -sinucleína, tal como pri-miARN, pre-miARN, ARNsh, miARN y miARN opcionalmente modificado.

[0047] En ciertas formas de realización, el polinucleótido de ARN inhibidor es una dupla de ARN inhibidor. La referencia a una "dupla de ARN inhibidor" indica un ARN bicatenario que comprende una hebra guía que se dirige a una región diana de ARN y una hebra pasajera. La hebra pasajera es suficientemente complementaria a la hebra guía para hibridar en condiciones fisiológicas. La hebra guía en asociación con un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés) puede inhibir la actividad del ARN diana. En el caso de una diana de ARNm, por ejemplo, se puede inhibir la expresión de proteínas del ARNm diana.

[0048] Las duplas de ARN inhibidores, tales como el miARN, se pueden producir, por ejemplo, a través de la expresión génica que produce pri-miARN, pre-miARN o ARNsh, seguida de biogénesis; y por síntesis química.

[0049] Los andamiajes de pri-miARN se pueden incrustar con secuencias guía y pasajeras para producir pri-miARN. Las hebras guía se pueden seleccionar para dirigirse a diferentes tipos de secuencias o regiones de ARN, tales como 5' UTR, 3' UTR o ARNm. Se pueden incrustar diferentes secuencias pasajeras en un andamiaje de pri-miARN para

una secuencia guía dada. La hebra pasajera se puede optimizar para un andamiaje particular y para proporcionar suficiente complementariedad a la hebra guía para hibridar en condiciones fisiológicas.

[0050] Las construcciones que comprenden una secuencia dirigida al ARNm de α -sinucleína se pueden utilizar, por ejemplo, en ARN inhibidor o para producir ARN inhibidor, donde el ARN inhibidor puede inhibir la expresión de α -sinucleína y/o tratar una enfermedad o trastorno de sinucleinopatía. La inhibición de la expresión de α -sinucleína se puede llevar a cabo, por ejemplo, con fines terapéuticos y de investigación. Los fines de investigación incluyen examinar el impacto de la inhibición de la expresión de α -sinucleína en un modelo animal.

[0051] La referencia a "sujeto" indica un mamífero, tal como un ser humano; un primate no humano, tal como un simio, un gibón, un gorila, un chimpancé, un orangután o un macaco; un animal doméstico, como un perro o un gato; un animal de granja, como un ave de corral, un pato, un caballo, una vaca, una cabra, una oveja o un cerdo; y un animal de experimentación, tal como un ratón, una rata, un conejo o un cobayo. Un sujeto preferido es un ser humano.

[0052] En ciertas formas de realización, el ARN inhibidor que se dirige al ARNm de la α -sinucleína se evalúa utilizando ratones transgénicos que expresan la α -sinucleína mutante A53T humana. (Ver, por ejemplo, Menon et al., Brain Communications, Volumen 3, Número 4, 2021, fcab247, [hypertext://doi.org/10.1093/braincomms/fcab247](https://doi.org/10.1093/braincomms/fcab247), incorporado en la presente solicitud como referencia en su totalidad).

[0053] La referencia a un porcentaje de "idéntico", "identidad" y terminología similar se refiere a dos secuencias que tienen una alineación máxima en un área particular. El área proporcionada se refiere a la secuencia de referencia indicada. Por ejemplo, la secuencia "idéntica" o la "identidad" con respecto a una secuencia de direccionamiento se puede calcular determinando el número de nucleótidos idénticos en secuencias alineadas para proporcionar la identidad máxima, y dividiendo por el número total de nucleótidos en la secuencia de direccionamiento y multiplicando por 100. Las diferencias entre secuencias alineadas pueden incluir una o más deleciones, sustituciones y/o adiciones.

[0054] La referencia a un porcentaje de identidad o de idéntico con respecto a una o más secuencias de referencia y un lenguaje similar a lo largo de la memoria descriptiva que proporciona un porcentaje de identidad o de idéntico indicado con respecto a una o más secuencias de referencia proporcionan el porcentaje o rango de porcentaje indicado independientemente de cada una de las secuencias referenciadas. Al determinar el porcentaje de identidad o de idéntico, el ARN y el ADN correspondiente se consideran iguales, a menos que se indique lo contrario (por ejemplo, haciendo referencia a la

molécula como ADN o ARN). El ARN correspondiente para el ADN proporciona uracilo en lugar de timina, y la cadena principal de ribosa, en lugar de la cadena principal de desoxirribosa.

[0055] Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a diferentes formas de ácido nucleico y oligonucleótidos, que incluyen ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), a menos que se indique lo contrario. Al discutir los ácidos nucleicos, una secuencia o estructura de un polinucleótido particular se puede describir en el presente documento de acuerdo con la convención de proporcionar la secuencia en la dirección 5' a 3'.

[0056] En ciertas formas de realización, los ácidos nucleicos incluyen polinucleótidos naturales, sintéticos e intencionalmente modificados o alterados. A menos que el contexto indique lo contrario, los ácidos nucleicos pueden ser simples, dobles o triples, lineales o circulares, y pueden tener cualquier longitud.

[0057] De acuerdo con ciertas formas de realización, el polinucleótido es una molécula de ADN monocatenario (ADNss) o bicatenario (ADNds). De acuerdo con ciertas formas de realización, la molécula de ADNds es un minicírculo, un nanoplásmido, un ADN de dupla lineal abierto o un ADN de dupla lineal de extremos cerrados (CELiD/ceDNA/ADN doggybone). De acuerdo con ciertas formas de realización, la molécula de ADNss es un ADN circular cerrado o lineal abierto.

[0058] Un "transgén" se refiere a un ácido nucleico que está destinado a una célula o ha sido introducido en una célula y unido operativamente a un promotor. Los transgenes incluyen ácido nucleico que codifica una secuencia de polinucleótido heterólogo y/o un promotor heterólogo.

[0059]] En ciertas formas de realización, las construcciones de polinucleótidos codificantes están "reducidas en CpG" o "agotadas en CpG". En ciertas formas de realización, las regiones que están "reducidas en CpG" o "agotadas en CpG" son aquellas que están fuera de las secuencias de pri-miARN o pre-miARN. "Reducidas en CpG" o "agotadas en CpG" se refieren a (i) una secuencia de nucleótidos en la que uno o más de los dinucleótidos CpG (o motivos) se eliminan de una secuencia de ácido nucleico de referencia; y/o (ii) el porcentaje de CpG en un polinucleótido al que se hace referencia es del 0 % al 10 %. En diferentes formas de realización, el porcentaje de CpG es del 0 al 5 %, 0 %, alrededor de 0,5 %, alrededor de 1,0 %, alrededor de 2,0 %, alrededor de 3,0 %, alrededor de 4,0 %, alrededor de 5,0 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 % o alrededor de 10 %.

[0060] En ciertas formas de realización, los motivos CpG se reducen en las regiones no traducidas (UTR) 5' y/o 3', secuencias de relleno, promotor, mejorador, señal de poliadenilación, ITR 5' y/o 3' y/o intrones.

[0061] Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen la referencia plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0062] El término conjuntivo "y/o" entre múltiples elementos enumerados abarca tanto opciones individuales como combinadas. Por ejemplo, cuando dos elementos están unidos por "y/o", una primera opción se refiere a la aplicabilidad de la primera opción sin la segunda, una segunda opción se refiere a la aplicabilidad de la segunda opción sin la primera, y una tercera opción se refiere a la aplicabilidad de la primera y la segunda opciones juntas. Se entiende que cualquiera de las opciones cae dentro del significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término "y/o". La aplicabilidad concurrente de más de una de las opciones también se entiende que cae dentro del significado del término "y/o".

[0063] A menos que se indique lo contrario mediante el contexto empleado, los términos "o" e "y" tienen el mismo significado que "y/o" cuando se aplican a diferentes miembros alternativos de un listado.

[0064] La referencia a términos tales como "que incluye", "por ejemplo", "p. ej.", "tal como", seguidos de diferentes miembros o ejemplos, son descripciones abiertas donde los miembros o ejemplos enumerados son ilustrativos, y se pueden proporcionar o utilizar otros miembros o ejemplos.

[0065] Los términos "polipéptido", "proteína" y "péptido" se pueden utilizar indistintamente para referirse a una secuencia de aminoácidos sin tener en cuenta la función. Los polipéptidos y péptidos contienen por lo menos dos aminoácidos, mientras que las proteínas contienen por lo menos alrededor de 10 aminoácidos. Los aminoácidos proporcionados incluyen aminoácidos de origen natural y aminoácidos proporcionados por modificación celular.

[0066] La referencia a "comprende", y variaciones tales como "comprenden" y "que comprende/n", utilizadas con respecto a un elemento o grupo de elementos es abierta y no excluye elementos o pasos de método adicionales no mencionados. Términos tales como "que incluye", "que contiene" y "caracterizado por" son sinónimos de "que comprende". En los diferentes aspectos y formas de realización descritos en este documento, la referencia a un término abierto tal como "que comprende" puede reemplazarse por "que consiste" o "que consiste esencialmente en".

[0067] La referencia a “que consiste en” excluye cualquier elemento, paso o ingrediente no especificado en los elementos de la reivindicación enumerados, donde dicho elemento, paso o ingrediente está relacionado con la invención reivindicada.

[0068] La referencia a “que consiste esencialmente en” limita el alcance de una reivindicación a los materiales o pasos especificados y aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la invención reivindicada.

[0069] El término “alrededor de” se refiere a un valor dentro del 10 % del parámetro subyacente (es decir, más o menos el 10 %). Por ejemplo, “alrededor de 1:10” incluye 1,1:10,1 o 0,9:9,9, y “alrededor de 5 horas” incluye 4,5 horas o 5,5 horas. El término “alrededor de” al comienzo de una cadena de valores modifica cada uno de los valores en 10 %. En ciertas formas de realización, el término “alrededor de” se refiere a un valor dentro del 10 % del parámetro subyacente.

[0070] Todos los valores numéricos o rangos numéricos incluyen números enteros dentro de dichos rangos y fracciones de los valores o los números enteros dentro de los rangos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, a modo de ilustración, la referencia a una reducción del 95 % o más incluye 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, así como 95,1 %, 95,2 %, 95,3 %, 95,4 %, 95,5 %, etc., 96,1 %, 96,2 %, 96,3 %, 96,4 %, 96,5 %, etc., y la referencia a un rango numérico, tal como “1-4”, incluye 1, 2, 3, 4, así como 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, etc. Como ilustración adicional, “1 a 4 semanas” incluye 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 días.

[0071] Además, la referencia a un rango numérico, tal como “0,01 a 10”, incluye 0,011, 0,012, 0,013, etc., así como 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, etc. Por ejemplo, una dosificación de alrededor de “0,01 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg” de peso corporal de un sujeto incluye 0,011 mg/kg, 0,012 mg/kg, 0,013 mg/kg, 0,014 mg/kg, 0,015 mg/kg, etc., así como 9,5 mg/kg, 9,6 mg/kg, 9,7 mg/kg, 9,8 mg/kg, 9,9 mg/kg, etc.

[0072] La referencia a un número entero “más (mayor) o menos de” incluye números mayores o menores que el número de referencia, respectivamente. Así, por ejemplo, la referencia a más de 2 incluye 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más; y la administración “dos o más” veces incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más veces.

[0073] Se citan o se describen diversas referencias, incluidos artículos y publicaciones de patentes, en los antecedentes y a lo largo de la memoria descriptiva. Cada una de estas referencias se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Ninguna de las referencias se admite como técnica anterior con respecto a ninguna invención divulgada o reivindicada. En algunos casos, se indican referencias particulares que se incorporan como referencia aquí para resaltar la incorporación.

[0074] Las definiciones proporcionadas aquí, incluidas las de la presente sección y otras secciones de la solicitud se aplican a lo largo de la presente solicitud.

[0075] A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención.

[0076] La descripción se ha dividido en diversas secciones y párrafos, y proporciona ejemplos de diversas formas de realización. Estas separaciones no deben considerarse una desconexión de la sustancia de un párrafo o sección o forma de realización, de la sustancia de otro párrafo o sección o forma de realización. Las descripciones proporcionadas tienen una amplia aplicación y abarcan todas las combinaciones de las diversas secciones, párrafos y oraciones que se pueden contemplar. La discusión de cualquier forma de realización tiene la intención de ser solo ejemplar y no pretende sugerir que el alcance de la divulgación, incluidas las reivindicaciones (a menos que se indique lo contrario en las reivindicaciones), se limita a estos ejemplos.

[0077] La presente invención se divulga en general en el presente documento utilizando un lenguaje afirmativo para describir las numerosas formas de realización de la presente invención. La presente invención también incluye específicamente formas de realización en las que se excluye un objeto de asunto particular, en su totalidad o en parte, tal como sustancias o materiales, pasos y condiciones de método, protocolos o procedimientos. Por ejemplo, en ciertas formas de realización de la presente invención, se excluyen materiales y/o pasos de método. Por lo tanto, aunque la presente invención no se expresa generalmente en el presente documento en términos de lo que la presente invención no incluye, las formas de realización que no están expresamente excluidas en la presente invención, sin embargo, son divulgadas en el presente documento.

I. Polinucleótidos de ARN dirigidos al ARNm de α -sinucleína

[0078] Diferentes regiones diana de ARNm de α -sinucleína son proporcionadas, por ejemplo, por cualquiera de SEQ ID NOs: 129-135 y el complemento inverso de cualquiera de SEQ ID NOs: 32-62. Los polinucleótidos de ARN que se dirigen a una región diana particular comprenden una secuencia sustancialmente complementaria a la región diana. Las secuencias complementarias sustanciales comprenden una región de por lo menos 10 nucleótidos que son por lo menos 70 % complementarios, por lo menos 80 % complementarios, por lo menos 90 % complementarios, o 100 % complementarios. El grado de complementariedad se determina en función de las secuencias alineadas para la máxima complementariedad. Las diferencias entre secuencias complementarias

incluyen adición, delección y bases no complementarias. Preferentemente, las secuencias complementarias sustanciales pueden hibridarse entre sí en condiciones fisiológicas.

[0079] En ciertas formas de realización, las secuencias complementarias sustanciales comprenden una región de 10-25 nucleótidos, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos, que cuando se alinean para una complementariedad máxima, son perfectamente complementarios, por lo menos 70 % complementarios, por lo menos 80 % complementarios o por lo menos 90 % complementarios.

[0080] En ciertas formas de realización, las secuencias complementarias sustanciales comprenden una región de 10-25 nucleótidos, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos, que cuando se alinean para una complementariedad máxima son perfectamente complementarios, excepto diferencias de 1, 2 o 3 nucleótidos.

[0081] En ciertas formas de realización, la construcción que comprende una secuencia de direccionamiento de ARNm de α -sinucleína es una dupla de ARN inhibidor, pri-miARN, pre-miARN o shARN. La secuencia de direccionamiento de ARNm de α -sinucleína presente en estas construcciones proporciona una secuencia de hebra guía capaz de hibridar con ARNm de α -sinucleína. Dichas construcciones también comprenden una secuencia pasajera sustancialmente complementaria a la secuencia guía. El grado de complementariedad de la secuencia guía con la secuencia pasajera puede variar, por ejemplo, teniendo en cuenta la complementariedad suficiente para hibridar y utilizar en un andamiaje particular. En ciertas formas de realización, la secuencia guía y la secuencia pasajera, cuando se alinean para lograr la máxima complementariedad, son perfectamente complementarias o tienen 1, 2, 3 o 4 desajustes de nucleótidos con respecto a la complementariedad perfecta. Cada desajuste puede ser independientemente una base no complementaria, una adición y/o una delección.

[0082] En ciertas formas de realización, el polinucleótido de ARN comprende una secuencia de direccionamiento que comprende: (1) una región por lo menos 81 %, por lo menos 82 %, por lo menos 83 %, por lo menos 84 %, por lo menos 85 %, por lo menos 86 %, por lo menos 87 %, por lo menos 88 %, por lo menos 89 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de ARN de cualquiera de SEQ ID NOs: 32-62 o 94-100; (2) una secuencia que difiere de cualquiera de SEQ ID NOs: 32-62 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos; o (4) una secuencia que difiere de cualquiera de SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99 o SEQ ID NO: 100 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos. En ciertas formas de realización, las diferencias de nucleótidos son sustituciones.

[0083] Diferentes combinaciones de secuencias guía y semilla se proporcionan en la Tabla 1.

Tabla 1

Guía SEQ ID NO:	Secuencia guía	Semilla SEQ ID NO:	Secuencia semilla
34	UUUGUCACUUGCUCUUUGG	108	UUGUCAC
36	AUAGAGAACACCCUCUUUU	109	UAGAGAA
37	UAGAGAACACCCUCUUUUUG	110	AGAGAAC
38	UCCUUUUUGACAAAGCCAG	111	CCUUUUU
39	UUUUGACAAAGCCAGUGGC	112	UUUGACA
41	UCCUCCAACAUUUGUACT	113	CCUCCAA
42	AUUUGUCACUUGCUCUUUG	114	UUUGUCA

[0084] En ciertas formas de realización la secuencia de ARN de direccionamiento comprende:

- a) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 34 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 108;
- b) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 36 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 109;
- c) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 37 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 110;
- d) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 38 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 111;
- e) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 39 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 112;
- f) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 41 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 113; y
- g) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 42 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 114. En ciertas formas de realización para (a)-(g), cualquier diferencia de nucleótidos, si están presentes, son sustituciones.

[0085] En ciertas formas de realización, la secuencia guía comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de direccionamiento, y el polinucleótido de ARN además comprende una secuencia pasajera sustancialmente complementaria a la guía.

[0086] En ciertas formas de realización, las secuencias pasajera y guía se proporcionan en una combinación indicada en la Tabla 2, donde la hebra guía comprende, consiste esencialmente en, o consiste en las secuencias de direccionamiento indicadas, y las

secuencias pasajeras comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en las secuencias indicadas o una secuencia que difiere de la secuencia indicada por 1, 2, 3 sustituciones de nucleótidos.

[0087] Tabla 2

Guía		Pasajera	
SEQ ID NO:		SEQ ID NO:	
94	UUUGUCACUUGCUCUUUGGUC	101	GACCAAAGAGCAAGUGACAAA
95	AUAGAGAACACCCUCUUUUGU	102	ACAAAAGAGGGUGUUCUCUAU
96	UAGAGAACACCCUCUUUUGUC	103	GACAAAAGAGGGUGUUCUCUA
97	UCCUUUUUGACAAAGCCAGUG	104	CACUGGCUUUGUCAAAAAGGA
98	UUUUGACAAAGCCAGUGGCUG	105	CAGCCACUGGCUUUGUCAAAA
99	UCCUCCAACAUUUGUCACUUG	106	CAAGUGACAAAUGUUGGAGGA
100	AUUUGUCACUUGCUCUUUGGU	107	ACCAAAGAGCAAGUGACAAAU

[0088] En ciertas formas de realización, la combinación de hebra pasajera codificante y hebra guía proporcionada en la Tabla 2, está presente en una dupla de ARN inhibidor, pri-miARN, pre-miARN, o ARNsh.

[0089] I.A. Dupla de ARN inhibidor.

[0090] Una dupla de ARN inhibidor puede inhibir la actividad del ARNm junto con el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). La referencia a RISC incluye proteínas asociadas, tales como la proteína argonaute central (AGO). Sin limitarse a ninguna teoría particular, la hebra guía se carga en un RISC y se hibrida con el ARNm diana, donde la hibridación se inicia en la región semilla, ubicada en n-2 a aproximadamente n-8 del extremo 5' de la hebra guía.

[0091] En ciertas formas de realización, la región semilla es perfectamente complementaria a su diana de ARNm, o diferente de la complementariedad perfecta por 1 nucleótido.

[0092] Preferentemente, la hebra pasajera es descartada por el RISC y es degradada. En diferentes formas de realización, la relación entre la hebra guía y la hebra pasajera es de alrededor de 25:1, alrededor de 15:1 o alrededor de 10:1.

[0093] De acuerdo con el grado de complementariedad y la ubicación de las regiones no complementarias, el RISC asociado con la hebra guía puede provocar la escisión del ARNm o la represión de la traducción (Ver, por ejemplo, Lam et al., Mol. Ther. Nucleic Acids. (2015) 4(9):e252 y Kobayashi et al., ACS Omega. (2022) 7 (2): 2398-2410, cada una de las cuales se incorpora por la presente como referencia en su totalidad).

[0094] En ciertas formas de realización, la hebra guía y la hebra pasajera tienen independientemente de 18 a 25 nucleótidos de longitud, y cada una comprende un saliente 3' de 1 a 5 nucleótidos. En otras formas de realización, cada saliente tiene 1, 2, 3 o 4 nucleótidos. En otras formas de realización, cada hebra guía y hebra pasajera tiene independientemente 20, 21, 22 o 23 nucleótidos; y cada saliente tiene 2 o 3 nucleótidos. En otras formas de realización, cada hebra guía y pasajera tiene 21, 22 o 23 nucleótidos y cada saliente tiene 2 nucleótidos.

[0095] I.B. miARN

[0096] El suministro de duplas de ARN inhibidor a un sujeto se facilita utilizando construcciones precursoras tales como pri-miARN, pre-miARN y ARNsh. Estas diferentes construcciones comprenden una estructura de tallo-bucle, una secuencia de hebra guía y una secuencia de hebra de pasajera; y hacen uso de mecanismos de biogénesis de miARN intracelulares para formar una dupla de ARN inhibidor. Dichas construcciones se pueden proporcionar, por ejemplo, utilizando transgenes que codifican para ARN inhibidor.

[0097] La producción y el procesamiento de miARN que ocurre de manera natural implica la transcripción de pri-miARN a partir de un gen de miARN y la escisión de las regiones 3' y 5' mediada por drosha-DGCR8, para formar pre-miARN. El pre-miARN resultante contiene un tallo con salientes de nucleótidos en los extremos 3' y un tallo-bucle apical (ver, por ejemplo, Jin et al., Mol. Cell. 7 de mayo de 2020; 78 (3): 423-433, incorporado en la presente como referencia en su totalidad).

[0098] Pri-miARN comprende una secuencia flanqueante 5', una secuencia guía/pasajera, un bucle apical, una secuencia guía/pasajera y una secuencia flanqueante 3'. La secuencia de la hebra guía puede estar o bien 5' o 3' del bucle. Cuando la secuencia de la hebra guía está en 5' del bucle, la secuencia de la hebra pasajera está en 3' del bucle apical; y cuando la secuencia de la hebra guía está en 3' del bucle, la secuencia de la hebra pasajera está en 5' del bucle.

[0099] Las regiones flanqueantes 5' y 3' forman parte de una región de tallo y comprenden además regiones monocatenarias. La longitud de las regiones flanqueantes puede variar independientemente. En ciertas formas de realización, las regiones flanqueantes 5' y 3' de pri-miARN tienen cada una por lo menos 20 nucleótidos, por lo menos 50 nucleótidos o por lo menos 100 nucleótidos.

[00100] Un andamio/andamiaje de pri-miARN se refiere a regiones de pri-miARN que excluyen secuencias guía y pasajeras. Un andamio puede servir como vehículo de suministro para la biogénesis de diferentes duplas de ARN inhibidores, donde las secuencias de hebra guía y pasajera están incrustadas en el andamio.

[00101] Los andamios capaces de incorporar secuencias de hebra guía y pasajera pueden ser a base de pri-miARN de origen natural, modificación de un miARN de origen natural, o pueden diseñarse artificialmente teniendo en cuenta las características del pri-miARN (ver, p. ej., Xie *et al.*, Mol. Ther. (2020) 28 (2): 422-430; Fowler *et al.*, Nucleic Acids Research (2016), 44 (5): e48; Roden *et al.*, (2017) Genome Res. 27 (3): 374-384; Jin *et al.*, (2020) Mol. Cell. 7; 78 (3): 423-433; y Fang y Bartel Genes. Mol Cell. (2015) 60 (1): 131-145; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad).

[00102] Las consideraciones de diseño de los andamios de pri-miARN incluyen la longitud del tallo, el tamaño del bucle y la presencia de motivos particulares que pueden mejorar la biogénesis y/o el ARN inhibidor. Los tallos de pri-miARN pueden contener diferentes estructuras, tales como oscilaciones G-U o U-G, desajustes de pares de bases individuales, protuberancias y desajustes de pares de bases múltiples.

[00103] En ciertas formas de realización, el andamio de pri-miARN comprende en el tallo basal un motivo UG en el brazo 5' en una posición -14 o -13 con respecto al sitio de escisión 5' de drosha; y/o un CNNC en el brazo 3' entre las posiciones +14 y +18 con respecto al sitio de escisión 3' de drosha.

[00104] En ciertas formas de realización, el andamio de pri-miARN es un andamio miR-1, miR-26, miR16-1, miR-30, miR-33, mi-R101, miR-64, miR-122, miR-125, miR-135, miR-155, miR-155 mejorado (eSIBR), o miR-451 (Patente U. S. Nro. 10,457,940; Miniarikova *et al.*, Mol. Ther. Nucleic Acids (2016) Mar 22; 5 (3): e297; Fowler *et al.*, Nucleic Acids Research (2016), 44 (5): e48; Xie *et al.*, Molecular Therapy (2020) 28: 2 422-430; Fang y Bartel Molecular Cell (2015) 60, 131-145; Roden *et al.* (2017) Genome Res. 27, 374-384; y Calloni y Bonatto, Human Gene Therapy Methods (2015) 25(5):162-174).

[00105] En ciertas formas de realización, el pri-miARN comprende un motivo GHG desajustado en el brazo 3' del tallo.

[00106] En ciertas formas de realización, la longitud del tallo de pri-miARN es 33, 34, 35, 36, 37, 38, o 39 nucleótidos.

[00107] En ciertas formas de realización la longitud del tallo de pri-miARN es 34, 35, o 36 nucleótidos.

[00108] En ciertas formas de realización, el bucle apical de pri-miARN es de 3 a 23 nucleótidos. En una forma de realización adicional, el bucle es de 10 a 23 nucleótidos. En ciertas formas de realización, las hebras guía y pasajera no se extienden en el bucle. En ciertas formas de realización, la guía y/o pasajera se extienden en el bucle.

[00109] En ciertas formas de realización, el pri-miARN comprende una cubierta 5' 7-metil guanilato (m7G).

[00110] En ciertas formas de realización, el pri-miARN comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 115-121; o una secuencia que difiere de cualquiera de las SEQ ID NO: 115-121 en 0, 1, 2, 3 o 4 nucleótidos. Las diferencias de nucleótidos se pueden introducir en diferentes ubicaciones teniendo en cuenta la orientación proporcionada en el presente documento, por ejemplo, diferentes características del andamiaje del pri-miARN, complementariedad de la guía con el objetivo, complementariedad de la hebra pasajera con la hebra guía y ajuste para andamiajes particulares.

[00111] El pre-miARN producido por escisión de pri-miARN de drosha se exporta desde el núcleo hasta el citoplasma, donde es escindido por dicer para producir una dupla de ARN inhibidor. La referencia a "pre-miARN" indica que el polinucleótido de ARN, tal como los que comprenden hebras guía y pasajera descriptos en este documento, se puede escindir mediante dicer para producir una dupla de ARN inhibidor.

[00112] En ciertas formas de realización, la dupla de ARN inhibidor producida por dicer comprende una hebra guía y una pasajera, cada una de alrededor de 22 nucleótidos de longitud, donde cada hebra contiene un saliente de nucleótido de 2 bases en cada extremo 3' (Fang y Bartel (2015) Molecular Cell, 60: 131-145).

[00113] En ciertas formas de realización, el pre-miARN comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 122-128; o una secuencia que difiere de cualquiera de las SEQ ID NO: 122-128 por 0, 1, 2, 3 o 4 nucleótidos. Las diferencias de nucleótidos se pueden introducir en diferentes ubicaciones, tales como la secuencia guía, la secuencia de bucle y/o la secuencia pasajera.

[00114] En ciertas formas de realización, el pri-miARN se introduce en una célula utilizando un transgén que comprende una secuencia que codifica para la secuencia del pri-miARN. La biogénesis del pri-miARN conduce a la producción de una dupla de ARN inhibidor. Los casetes de expresión que comprenden el transgén se pueden introducir en una célula utilizando vehículos de suministro virales o no virales.

[00115] En ciertas formas de realización, el ARNsh se introduce en una célula utilizando un transgén que comprende una secuencia que codifica para la secuencia del ARNsh. El ARNsh es similar en estructura y función al pre-miARN. El ARNsh comprende una dupla de ARN que comprende brazos sustancialmente complementarios y un bucle, donde el ARNsh se puede exportar desde el núcleo hasta el citoplasma y ser escindido por dicer

para formar una dupla de ARN inhibidor (Aguiar et al., Transl. Neurodegener. (2017) 27 de noviembre; 6:30).

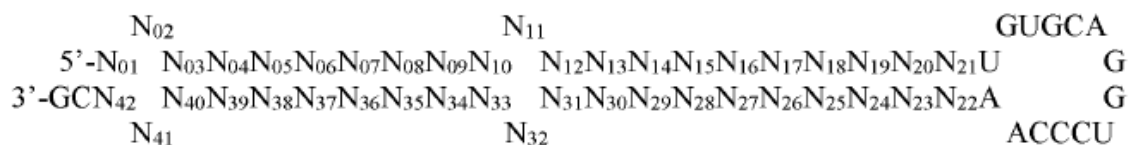
[00116] I.C. Andamios

[00117] En ciertas formas de realización, el andamio de pri-miARN es un andamio S155, S155e, S26, S126 o S33. El andamio S155 corresponde al andamio miR155, y se utilizó para miR3, miR5, miR6, miR7, miR8, miR10 y miR11, descritos en los Ejemplos a continuación. El andamio S155e corresponde a un andamio miR155 mejorado (ver Fowler et al., Nucleic Acids Research (2016), 44 (5): e48). El andamio S33 corresponde al andamio presente en miR33 (ver Xie et al., Molecular Therapy (2020) 28: 2 422-430 2020). El andamio S126 es un andamio artificial producido utilizando el andamio miR26 como punto de partida. Los diferentes andamios se pueden utilizar para incorporar diferentes hebras guía y pasajeras.

[00118] En ciertas formas de realización, el andamio S126 se puede utilizar para incorporar diferentes hebras guía y pasajeras, donde el andamio comprende SEQ ID NO: 186

N₀₁N₀₂N₀₃N₀₄N₀₅N₀₆N₀₇N₀₈N₀₉N₁₀N₁₁N₁₂N₁₃N₁₄N₁₅N₁₆N₁₇N₁₈N₁₉N₂₀N₂₁UGUGCAGGUCCCA
N₂₂N₂₃N₂₄N₂₅N₂₆N₂₇N₂₈N₂₉N₃₀N₃₁N₃₂N₃₃N₃₄N₃₅N₃₆N₃₇N₃₈N₃₉N₄₀N₄₁N₄₂CG, donde N₀₁ a N₄₂ son ribonucleótidos, N₀₁ es complementario a N₄₂, N₀₂ no es complementario a N₄₁, N₀₃-N₁₀ es complementario a N₃₃-N₄₀, N₁₁ no es complementario a N₃₂, y N₁₂-N₂₁ son complementarios a N₂₂-N₃₁. En ciertas formas de realización, la hebra pasajera es proporcionada por N₀₁-N₂₁U, donde una secuencia de direccionamiento puede insertarse en N₀₁-N₂₁; y la hebra guía es proporcionada por N₂₃-N₄₂G. El ADN correspondiente puede usarse para codificar la secuencia de ARN.

[00119] En ciertas formas de realización, la secuencia de ARN que comprende SEQ ID NO: 186 tiene la siguiente estructura:



[00120] En diferentes formas de realización, la secuencia de ARN que comprende SEQ ID NO: 186 puede ser cortada por Dicer; o puede ser cortada por Drosha y Dicer.

[00121] En ciertas formas de realización dirigidas a una secuencia de ARN que comprende SEQ ID NO: 186, la secuencia de ARN además comprende una región flanqueante 5' y una región flanqueante 3', donde el polinucleótido comprende la secuencia de ARN de SEQ ID NO: 187:

GUGGCCGN₀₁N₀₂N₀₃N₀₄N₀₅N₀₆N₀₇N₀₈N₀₉N₁₀N₁₁N₁₂N₁₃N₁₄N₁₅N₁₆N₁₇N₁₈N₁₉N₂₀N₂₁UGUGCA
GGUCCCAN₂₂N₂₃N₂₄N₂₅N₂₆N₂₇N₂₈N₂₉N₃₀N₃₁N₃₂N₃₃N₃₄N₃₅N₃₆N₃₇N₃₈N₃₉N₄₀N₄₁N₄₂CGGGGA
CGC, donde N₀₁ a N₄₂ son ribonucleótidos, N₀₁ es complementario a N₄₂, N₀₂ no es complementario a N₄₁, N₀₃-N₁₀ es complementario a N₃₃-N₄₀, N₁₁ no es complementario a N₃₂, y N₁₂-N₂₁ es complementario a N₂₂-N₃₁. El correspondiente ADN puede usarse para codificar la secuencia de ARN.

[00122] En ciertas formas de realización, el polinucleótido de ARN inhibidor que se dirige a α -sinucleína está incrustado en un andamio S126 que comprende SEQ ID NOs: 186 o 187, donde (1) la hebra guía comprende la secuencia de SEQ ID NO: 95 y la hebra pasajera comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 189-197; o (2) la hebra guía comprende la secuencia de SEQ ID NO: 97 y la hebra pasajera comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 198-206. Las Tablas 3 y 4 ilustran combinaciones de pasajeras para las hebras guías de SEQ ID NO: 95 y SEQ ID NO: 97. Los nucleótidos que se muestran en negritas se ubican en una protuberancia creada por nucleótidos no complementarios.

[00123] Tabla 3

Hebra guía de SEQ ID: 95	
Hebra pasajera SEQ ID NO:	Secuencia de hebra pasajera
189	ACAAAAGAGG A UGUUCU CAU
190	ACAAAAGAGG U UGUUCU CAU
191	ACAAAAGAGG C UGUUCU CAU
192	ACAAAAGAGG A UGUUCU CAU
193	ACAAAAGAGG U UGUUCU CAU
194	ACAAAAGAGG C UGUUCU CAU
195	ACAAAAGAGG A UGUUCU CAU
196	ACAAAAGAGG U UGUUCU CAU
197	ACAAAAGAGG C TGUUCU CAU

[00124] Tabla 4

Hebra guía de SEQ ID: 97	
Hebra pasajera SEQ ID NO:	Secuencia de hebra pasajera
198	CACUGGCUUU A UCAAAAA UGA
199	CACUGGCUUU U UCAAAAA UGA
200	CACUGGCUUU C UCAAAAA UGA
201	CACUGGCUUU A UCAAAAA AGA
202	CACUGGCUUU U UCAAAAA AGA
203	CACUGGCUUU C UCAAAAA AGA
204	CACUGGCUUU A UCAAAAA CGA
205	CACUGGCUUU U UCAAAAA CGA
206	CACUGGCUUU C UCAAAAA CGA

[00125] En ciertas formas de realización, la combinación de hebra pasajera y hebra guía proporcionada en las Tablas 3 y 4 está presente en una dupla de pri-miARN, pre-miARN, ARNsh o ARN inhibidor. Los ejemplos de pre-miARN que comprenden las combinaciones de secuencias de la Tabla 3 en un andamio S126 se proporcionan en las SEQ ID NO: 207-215, y los ejemplos de pre-miARN que comprenden las combinaciones de secuencias de la Tabla 4 en un andamio S126 se proporcionan mediante las SEQ ID NO: 216-224. Los ejemplos de mayor longitud de pri-miARN que comprenden las combinaciones de secuencias de la Tabla 3 en un andamio S126 se proporcionan mediante las versiones de ARN (cadena principal de ribosa, y U en lugar de T) de las SEQ ID NO: 243-251. Ejemplos de mayor longitud de pri-miARN que comprenden las combinaciones de secuencias de la Tabla 4 en un andamio S126 son proporcionados por las versiones de ARN (cadena principal de ribosa, y U en lugar de T), de SEQ ID NOs: 252-260.

[00126] I. D. ARN inhibidor modificado

[00127] Una alternativa para proporcionar una dupla de ARN inhibidor a través de la expresión y biogénesis de transgenes es la administración directa de la dupla de ARN inhibidor. La administración directa puede facilitarse utilizando ARN modificado. Las duplas de ARN inhibidor modificado pueden producirse, por ejemplo, modificando uno o más nucleótidos de una dupla de ARN inhibidor. Pueden realizarse modificaciones a una dupla de ARN inhibidor para, por ejemplo, mejorar la farmacocinética, aumentar la actividad, suprimir la activación inmunitaria innata, mejorar el direccionamiento y reducir la toxicidad fuera del objetivo.

[00128] Se pueden realizar modificaciones al ARN inhibidor en diferentes posiciones, tales como el extremo 5', el extremo 3', resto azúcar, grupo fosfato y nucleobase. Se pueden realizar diversas modificaciones diferentes que permitan o faciliten la hibridación de Watson-Crick con actividad de ARN inhibidor y diana. Las referencias que describen diferentes modificaciones y plantillas de modificación incluyen Hu et al., Sig Transduct Target Ther., (2020) 5, 101; Varley y Desautiers (2021) RSC Adv., 11, 2415; Alterman et al., Nature Biotechnology (2019) 37: 884-894; Publicación de Patente Internacional Nro. WO 2021/252649; y Publicación de Patente de EE. UU. Nro. 2022/125823; cada una de las cuales se incorpora por la presente como referencia en su totalidad.

[00129] En ciertas formas de realización, el ARN inhibidor comprende una o más modificaciones seleccionadas de: un imitador de fosfato 5' (p. ej., 5-(E)-vinilfosfato, 5'-metileno fosfonato, 5'-(R)-metil fosfato, 5'-(S)-metil fosfato, 5'(R)-MeOCH₃ fosfato, 5'-(S)-metil-F fosfato, 5 desoxi-5'-morfolino-2'O-metil uridina, y fosforotioato); modificación de fosfato interno (p. ej., Rp fosforotioato, Sp fosforotioato, fosforoditioato, metoxifosfonato,

feniletil fosfato, unión 2'-5' fosfato y unión de amida); una o más modificaciones de nucleobases (p. ej., 5'-nitroindol, pseudouridina, 2'-tiouridina, N6'-metiladenosina, 5'-metilcitidina, 5'-fluro-2'deoxiuridina, N-etilpiperidina 7'-EAA triazol adenina modificada, N-etilpiperidina 6'-triazol adenina modificada, 6'-fenilpirrolocitosina, o 2',4'-difluorotoluil ribonucleótido); modificación de azúcar (p. ej., 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo, 2'-deoxi-2'-fluro, 2'-O-(p-oxazol-2-il)bencilo, (2'S)-2-deoxi-2'-C-metil, (2'R)-2-deoxi-2'-C-metilo, 2'-arabino-fluro, 2'O-bencilo, 2'O-metil-4-piridina, ácido nucleico bloqueado, (s)-cET-BNA, triciclo-ADN, PMO, ácido nucleico desbloqueado, ácido glicol nucleico, alritol y ácido nucleico); y grupo de conjugación (p. ej., grupo lipófilo, grupo hidrófilo, colesterol, GalNAc, docosaheptaenoico, o docosaheptaenoico con un grupo cabeza fosfocolina).

[00130] En ciertas formas de realización, por lo menos 50 %, por lo menos 60 % por lo menos 70 % por lo menos 90 % o 100 % de los nucleótidos están modificados.

[00131] En ciertas formas de realización, la dupla de ARN inhibidor es una dupla de ARN inhibidor divalente modificado. En otras formas de realización, la dupla de ARN inhibidor divalente modificado está completamente estabilizada químicamente y comprende uno o más de 2'-OMe, 2'-F, fosforotioato, fosfodiéster y 5' vinilfosfonato (ver, por ejemplo, Alterman et al., Nature Biotechnology (2019) 37: 884-894, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad).

[00132] El ARN modificado se puede producir utilizando diferentes técnicas, tales como la síntesis por pasos del ARN, y/o modificando una secuencia de ARN producida. La propia secuencia de ARN producida se puede elaborar, por ejemplo, mediante la síntesis por pasos o utilizando ácido nucleico codificante.

II. Ácido nucleico codificante de polinucleótidos de ARN que comprenden una secuencia de direccionamiento

[00133] Los polinucleótidos de ARN que comprenden una secuencia de direccionamiento se pueden producir a partir de un polinucleótido utilizando una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polinucleótido de ARN. Con respecto a un polinucleótido de ARN, una secuencia de ácido nucleico codificante proporciona la misma secuencia que el polinucleótido de ARN correspondiente, donde, si el ácido nucleico codificante es ADN, el ADN tendría la nucleobase timina en lugar de uracilo, y desoxirribosa, en lugar de ribosa. El polinucleótido de ARN se produce a partir de una hebra plantilla, complementaria a la hebra codificante. La hebra codificante puede, por ejemplo, estar provista de la plantilla, y/o utilizarse para producir la hebra plantilla.

[00134] Un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polinucleótido de ARN puede comprender componentes adicionales tales como

aquellos que facilitan la producción del polinucleótido de ARN, que facilitan el suministro del polinucleótido como un vector viral, y/o proporcionan actividad adicional. Se puede proporcionar actividad adicional, por ejemplo, mediante la codificación para proteínas y/o la codificación para secuencias que proporcionan uno o más ARN inhibidores adicionales.

[00135] Las secuencias que proporcionan ARN inhibidores adicionales pueden ser iguales o diferentes, y pueden dirigirse al mismo objetivo o a un objetivo diferente. Los ejemplos de diferentes configuraciones incluyen la codificación para dos o más pri-miARN de la misma secuencia; la codificación para dos o más pri-mARN que tienen la misma hebra guía, pero diferentes andamiajes; y/o la codificación para dos o más pri-miARN con diferentes hebras guía. Las diferentes hebras guía pueden dirigirse al mismo objetivo, por ejemplo, el mismo ARNm; o diferentes objetivos, por ejemplo, diferentes ARNm. En ciertas formas de realización, el polinucleótido codifica para 1, 2, 3, 4 o 5 pri-miARN, donde cada uno puede ser igual o diferente.

[00136] Los mismos tipos de configuraciones de codificación que proporcionan pri-mARN se pueden utilizar para un polinucleótido que codifica ARNsh. En ciertas formas de realización, el polinucleótido codifica para 1, 2, 3, 4 o 5 ARNsh, donde cada uno puede ser igual o diferente.

[00137] La producción de polinucleótidos de ARN que comprenden una secuencia de direccionamiento se facilita utilizando casetes de expresión. El casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polinucleótido de ARN y uno o más elementos de control de expresión unidos operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polinucleótido de ARN. El casete de expresión puede comprender, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica para diferentes polinucleótidos de ARN (por ejemplo, diferentes pri-miARN o ARNsh), que son iguales o diferentes, donde los diferentes polinucleótidos pueden unirse operativamente a los mismos o diferentes elementos de expresión. Por ejemplo, el mismo promotor puede unirse a una secuencia de ácido nucleico que proporciona múltiples pri-miARN, o dos o más pri-miARN están unidos operativamente a diferentes promotores.

[00138] En ciertas formas de realización, el polinucleótido que codifica para un polinucleótido de ARN comprende una secuencia (1) por lo menos 81 %, por lo menos 82 %, por lo menos 83 %, por lo menos 84 %, por lo menos 85 %, por lo menos 86 %, por lo menos 87 %, por lo menos 88 %, por lo menos 89 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 136-142; (2) comprende por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17, por lo menos 18, o por lo menos 19

nucleótidos contiguos de cualquiera de SEQ ID NOs: 136-142; y/o (3) comprende una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, o SEQ ID NO: 142, por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos.

[00139] Diferentes combinaciones de secuencias diana codificantes de ADN y semilla se proporcionan en la Tabla 5.

Tabla 5

Guía SEQ ID NO:	Secuencia guía	Semilla SEQ ID NO:	Secuencia semilla
136	TTTGTCACCTTGCTCTTTGGTC	143	TTGTCAC
137	ATAGAGAACACCCTCTTTTGT	144	TAGAGAA
138	TAGAGAACACCCTCTTTTGTC	145	AGAGAAC
139	TCCTTTTGTGACAAAGCCAGTG	146	CCTTTTT
140	TTTGACAAAGCCAGTGGCTG	147	TTTGACA
141	TCCTCCAACATTTGTCACCTTG	148	CCTCCAA
142	ATTTGTCACCTTGCTCTTTGGT	149	TTTGTCA

[00140] En ciertas formas de realización, la secuencia diana de ADN codificante comprende:

- a) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 136 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 143;
- b) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 137 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 144;
- c) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 138 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 145;
- d) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 139 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 146;
- e) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 140 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 147;
- f) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 141 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 148; y
- g) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 142 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 149. En ciertas formas de realización para (a)-(g), cualquier diferencia de nucleótidos, si se presentan, son sustituciones.

[00141] En ciertas formas de realización, la secuencia de direccionamiento es una secuencia de hebra guía, y el polinucleótido además comprende una secuencia que codifica para una secuencia pasajera sustancialmente complementaria a la secuencia de direccionamiento.

[00142] En ciertas formas de realización, las secuencias guías y pasajeras codificantes se proporcionan en una combinación indicada en las Tablas 6-8, donde la secuencia de hebra guía codificante comprende, consiste esencialmente en, o consiste en las secuencias indicadas; y la secuencia pasajera codificante comprende, consiste esencialmente en, o consiste en las secuencias indicadas o una secuencia que difiere de la secuencia indicada por 1, 2, o 3 nucleótidos.

[00143] Tabla 6

Guía		Pasajera	
SEQ ID NO:		SEQ ID NO:	
136	TTTGTCACCTTGCTCTTTGGTC	150	GACCAAAGAGCAAGTGACAAA
137	ATAGAGAACACCCTCTTTTGT	151	ACAAAAGAGGGTGTTCTCTAT
138	TAGAGAACACCCTCTTTTGT	152	GACAAAAGAGGGTGTTCTCTA
139	TCCTTTTTTGACAAAGCCAGTG	153	CACTGGCTTTGTCAAAAAGGA
140	TTTTGACAAAGCCAGTGGCTG	154	CAGCCACTGGCTTTGTCAAAA
141	TCCTCCAACATTTGTCACTTG	155	CAAGTGACAAATGTTGGAGGA
142	ATTTGTCACTTGCTCTTTGGT	156	ACCAAAGAGCAAGTGACAAAT

[00144] Tabla 7

Hebra guía de SEQ ID: 137	
Hebra pasajera SEQ ID NO:	Secuencia de hebra pasajera
261	ACAAAAGAGG A TGTTCTC C AT
262	ACAAAAGAGG T TGTTCTC C AT
263	ACAAAAGAGG C TGTTCTC C AT
264	ACAAAAGAGG A TGTTCTC A AT
265	ACAAAAGAGG T TGTTCTC A AT
266	ACAAAAGAGG C TGTTCTC A AT
267	ACAAAAGAGG A TGTTCTC G AT
268	ACAAAAGAGG T TGTTCTC G AT
269	ACAAAAGAGG C TGTTCTC G AT

[00145] Tabla 8

Hebra guía de SEQ ID: 139	
Hebra pasajera SEQ ID NO:	Secuencia de hebra pasajera
270	CACTGGCTTT A TCAAAA T GA
271	CACTGGCTTT T TCAAAA T GA
272	CACTGGCTTT C TCAAAA T GA
273	CACTGGCTTT A TCAAAA A GA
274	CACTGGCTTT T TCAAAA A GA
275	CACTGGCTTT C TCAAAA A GA
276	CACTGGCTTT A TCAAAA C GA
277	CACTGGCTTT T TCAAAA C GA
278	CACTGGCTTT C TCAAAA C GA

[00146] En ciertas formas de realización, la combinación de hebra pasajera y hebra guía codificante es como se proporciona en las Tablas 6, 7 o 8, y el polinucleótido codifica para un pri-miARN, pre-miARN, o ARNsh.

[00147] En ciertas formas de realización, el polinucleótido que codifica para un polinucleótido de ARN comprende una secuencia (1) por lo menos 81 %, por lo menos 82 %, por lo menos 83 %, por lo menos 84 %, por lo menos 85 %, por lo menos 86 %, por lo menos 87 %, por lo menos 88 %, por lo menos 89 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 157-163; (2) comprende por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17, por lo menos 18, o por lo menos 19 nucleótidos contiguos de cualquiera de SEQ ID NOs: 157-163; y/o (3) comprende una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, o SEQ ID NO: 163 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos.

[00148] En ciertas formas de realización, el polinucleótido comprende o codifica una secuencia (1) por lo menos 81 %, por lo menos 82 %, por lo menos 83 %, por lo menos 84 %, por lo menos 85 %, por lo menos 86 %, por lo menos 87 %, por lo menos 88 %, por lo menos 89 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 225-260; (2) por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17, por lo menos 18, o por lo menos 19 nucleótidos contiguos de cualquiera de SEQ ID NO: 225-260; y/o (2) comprende una secuencia que difiere de cualquiera de SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241, y SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258, SEQ ID NO: 259, y SEQ ID NO: 260 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos.

[00149] En ciertas formas de realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica para un pre-miARN o pri-miARN, donde el polinucleótido comprende una combinación de guía/pasajera proporcionada en la Tabla 6 y (1) comprende una secuencia por lo menos 81 %, por lo menos 82 %, por lo menos 83 %, por lo menos 84

%, por lo menos 85 %, por lo menos 86 %, por lo menos 87 %, por lo menos 88 %, por lo menos 89 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 157-163; y/o (2) comprende una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, o SEQ ID NO: 163 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos; donde las secuencias (que incluyen porcentaje de identidad o diferencias) se sustentan en las siguientes combinaciones de ADN codificante para guía/pasajera/Pre-miARN: SEQ ID NOs: 136/150/157; SEQ ID NOs: 137/151/158; SEQ ID NOs: 138/152/159; SEQ ID NOs: 139/153/160; SEQ ID NOs: 140/154/161; SEQ ID NOs: 141/155/162; y SEQ ID NOs: 142/156/163.

[00150] En ciertas formas de realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica para un pre-miARN o pri-miARN, donde el polinucleótido comprende una combinación de guía/pasajera proporcionada en la Tabla 7 y (1) comprende una secuencia por lo menos 81 %, por lo menos 82 %, por lo menos 83 %, por lo menos 84 %, por lo menos 85 %, por lo menos 86 %, por lo menos 87 %, por lo menos 88 %, por lo menos 89 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 225-233; y/o (2) comprende una secuencia que difiere de cualquiera de SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 232, y SEQ ID NO: 233 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos; donde la secuencias (que incluyen porcentaje de identidad o diferencias) se sustentan en las siguientes combinaciones de ADN codificante para guía/pasajera/Pre-miARN: SEQ ID NOs: 137/261/225; SEQ ID NOs: 137/262/226; SEQ ID NOs: 137/263/227; SEQ ID NOs: 137/264/228; SEQ ID NOs: 137/265/229; SEQ ID NOs: 137/266/230; SEQ ID NOs: 137/267/231; SEQ ID NOs: 137/268/232; y SEQ ID NOs: 137/269/233.

[00151] En ciertas formas de realización, el polinucleótido codifica para un polinucleótido de pre-miARN o pri-miARN, donde el polinucleótido comprende una combinación de guía/pasajera proporcionada en la Tabla 8 y (1) comprende una secuencia por lo menos 81 %, por lo menos 82 %, por lo menos 83 %, por lo menos 84 %, por lo menos 85 %, por lo menos 86 %, por lo menos 87 %, por lo menos 88 %, por lo menos 89 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 234-242; y/o (2)

comprende una secuencia que difiere de cualquiera de SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241, y SEQ ID NO: 242 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos; donde la secuencias (que incluyen porcentaje de identidad o diferencias) se sustentan en las siguientes combinaciones de ADN codificante para guía/pasajera/Pre-miARN: SEQ ID NOs: 139/270/234; SEQ ID NOs: 139/271/235; SEQ ID NOs: 139/272/236; SEQ ID NOs: 139/273/237; SEQ ID NOs: 139/274/238; SEQ ID NOs: 139/275/239; SEQ ID NOs: 139/276/240; SEQ ID NOs: 139/277/241; y SEQ ID NOs: 139/278/242.

[00152] En ciertas formas de realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica para ARN inhibidor que se dirige a ARNm de α -sinucleína y además comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor neurotrófico derivado de célula glial (GDNF). La referencia a GDNF incluye la longitud completa o madura y variantes de la misma. GDNF es un potente factor neurotrópico para las neuronas dopaminérgicas. La secuencia de aminoácidos para un GDNF de longitud completa se proporciona en SEQ ID NO: 188, donde los aminoácidos 1-19 proporcionan una secuencia de señal (ver, por ejemplo, protocolo de transferencia de hipertexto://www.uniprot.org/uniprotkb/P39905/entry, y protocolo de transferencia de hipertexto://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000505.1). En ciertas formas de realización, el GDNF comprende una secuencia con una identidad de secuencia de por lo menos el 95 %, por lo menos el 96 %, por lo menos el 97 %, por lo menos el 98 %, por lo menos el 99 % o el 100 % con SEQ ID NO: 188 (longitud completa), o con los aminoácidos 20-211 de SEQ ID NO: 188 (madura). En otras formas de realización, el GDNF maduro comprende además una secuencia de señal heteróloga. Se proporcionan ejemplos de diferentes secuencias de señal, por ejemplo, en las Publicaciones de Patentes Internacionales Nros. WO2022155665 y WO2022165027, ambas incorporadas en el presente documento como referencia en su totalidad.

[00153] II.A. Elementos de casetes de expresión

[00154] Un casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polinucleótido unido operativamente a un elemento de control de la expresión. Los casetes de expresión descritos en el presente documento comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica para un polinucleótido de ARN que se dirige al ARNm de α -sinucleína junto con una o más secuencias reguladoras, y también pueden comprender secuencias adicionales, tales como una secuencia de relleno, y secuencias de codificación adicionales, tales como secuencias de polipéptidos y polinucleótidos de ARN adicionales.

[00155] Un "elemento de control de la expresión" influye en la expresión de una secuencia a la que está unido operativamente. Los elementos de control de la expresión de proteína pueden afectar, por ejemplo, la transcripción, la traducción, el empalme y la estabilidad del mensaje. Los elementos de control de la expresión que afectan la producción de polinucleótidos de ARN pueden afectar, por ejemplo, el nivel de transcripción.

[00156] Los elementos de control de la expresión se ubican típicamente en 5' ("corriente ascendente") o 3' ("corriente descendente") de un ácido nucleico transcrito. Los elementos de control de expresión también pueden estar ubicados dentro de una transcripción que codifica una proteína (por ejemplo, en un intrón). Los elementos de control de expresión pueden estar ubicados adyacentes o a una distancia respecto de la secuencia transcrita. Pueden estar presentes uno o más elementos de control de expresión. Los ejemplos de elementos de control de expresión incluyen un promotor, un mejorador, un intrón, una señal de poliadenilación, una secuencia Kozak, elementos reguladores postranscripción y una secuencia de terminación.

[00157] Un promotor es una región de ADN donde se inicia la transcripción. En general, el ácido nucleico transcrito se encuentra en 3' de una secuencia promotora. En ciertas formas de realización, una secuencia promotora está unida a un mejorador. Los mejoradores son regiones de ADN que aumentan la transcripción del promotor. Los mejoradores pueden estar adyacentes a un promotor o pueden estar distales. Típicamente, los mejoradores se encuentran corriente ascendente de un promotor, pero pueden estar ubicados corriente descendente o dentro de una secuencia promotora.

[00158] Los elementos de control de expresión, tales como un promotor y un mejorador, pueden elegirse para impulsar preferentemente la expresión en una célula o tipo de tejido particular. Los elementos de control de la expresión suelen estar activos en determinadas células, tejidos u órganos porque son reconocidos por proteínas activadoras de la transcripción u otros reguladores de la transcripción, lo que permite su actividad en un tipo de célula, tejido u órgano (ver, por ejemplo, Green, M. y Sambrook, J. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4.^a edición, vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York; y Ausubel et al., (2010) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons, Nueva York).

[00159] La incorporación de elementos reguladores específicos de tejido en construcciones de expresión proporciona por lo menos un tropismo tisular parcial para la expresión del polinucleótido de ARN codificado. La referencia a un promotor o mejorador específico para un tipo de célula o tejido particular indica que el promotor o mejorador proporciona niveles más altos de expresión y/o secreción en la célula o tipo de tejido

indicado. Los ejemplos de promotores específicos del SNC incluyen: promotores específicos de neuronas tales como NSE (enolasa neuronal específica), sinapsina o NeuN, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF- β), proteína de unión a metil-CpG 2 (MeCP2), proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII), receptor de glutamato metabotrópico 2 (mGluR2), neurofilamento ligero (NFL) o pesado (NFH), minigén de β -globina n β 2, preproencefalina (PPE), encefalina (Enk) y promotores del transportador de aminoácidos excitatorios 2 (EAAT2); promotores específicos de astrocitos tales como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y los promotores EAAT2; promotores específicos de oligodendrocitos, tales como la proteína básica de mielina (MBP)/glicoproteína asociada a la mielina y el promotor del factor de transcripción de oligodendrocitos 2; promotores específicos de neuronas/hipotálamo, tales como el promotor de proopiomelanocortina (POMC) (ver, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE. UU. Nro. 2021/214749, y Adeno-Associated Virus Vectors (2019), Ed. Castle., 1.^a edición, Springer, Nueva York, NY.; ambos se incorporan por la presente como referencia en su totalidad).

[00160] Los elementos de control de la expresión también incluyen promotores ubicuos o promiscuos y promotores/mejoradores capaces de impulsar la expresión de polinucleótidos en muchos tipos de células diferentes. Dichos elementos incluyen las secuencias de promotor/mejorador temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), las secuencias de promotor/mejorador del virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PKG), CAG (compuesto del mejorador de CMV, el promotor de beta actina de pollo (CBA) y el intrón de beta globina de conejo) (véase, por ejemplo, Boshart et al., (1985) Cell, 41: 521-530), el promotor SV40, el promotor de la dihidrofolato reductasa y el promotor de b-actina citoplasmática.

[00161] Los promotores adicionales incluyen el promotor de superóxido dismutasa 1 (SOD1), el promotor U6, H1, el promotor LTR del virus del tumor mamario de ratón, el promotor tardío principal del adenovirus (Ad MLP), el promotor del virus del herpes simple (HSV), el promotor SFFV, el promotor de insulina de rata, el promotor TBG, el promotor de desmina y promotores específicos de músculo similares, promotores sintéticos, promotores híbridos y promotores con especificidad de múltiples tejidos.

[00162] En ciertas formas de realización, el promotor es un promotor EF-1 α (véase, por ejemplo, Wang et al., J. Cell Mol. Med. (2017) 21 (11): 3044-3054, incorporado en la presente como referencia en su totalidad) y/o comprende, consiste o consiste esencialmente en una identidad de secuencia de por lo menos el 95 %, por lo menos el 97 %, por lo menos el 99 % o el 100 % con SEQ ID NO: 184.

[00163] Los elementos de control de la expresión también pueden afectar la expresión de una manera que es regulable por una señal o estímulos que aumentan o disminuyen la expresión. Un elemento regulable que aumenta la expresión de ácido nucleico transcrito en respuesta a una señal o a estímulos también se denomina "elemento inducible" (es decir, es inducido por una señal). Típicamente, la cantidad de aumento o disminución conferida por dichos elementos es proporcional a la cantidad de señal o estímulos presentes. Ejemplos particulares incluyen el promotor de metalotionina (MT) de oveja inducible por zinc; el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por hormonas esteroideas; el sistema promotor de la polimerasa T7 (Publicación de Patente Internacional Nro. WO1998/10088); el sistema reprimible por tetraciclina (Gossen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551 (1992)); el sistema inducible por tetraciclina (Gossen et al., Science 268: 1766-1769 (1995)); ver también Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 512-518 (1998)); el sistema inducible por RU486 (Wang et al., Nat. Biotech. 15: 239-243 (1997), y Wang et al., Gene Ther. 4: 432-441 (1997)); y el sistema inducible por rapamicina (Magari et al., J. Clin. Invest. 100: 2865-2872 (1997)); y Rivera et al., Nat. Medicine. 2: 1028-1032 (1996)). Otros ejemplos de elementos de control regulables incluyen aquellos regulados por un estado fisiológico específico tal como la temperatura, la fase aguda o el desarrollo.

[00164] En ciertas formas de realización, el casete de expresión comprende además uno o más intrones. Se puede utilizar una diversidad de intrones diferentes. Los ejemplos de intrones que se pueden utilizar incluyen el intrón de β -globina de conejo con donante de empalme/aceptor de empalme, el intrón SV40 con donante de empalme/aceptor de empalme, intrones de β -globina humana, intrón 2 del gen de la hemoglobina beta humana, hFIX int1 (intrón 1 del gen del factor IX de coagulación humano), CBA-rHHB (intrón sintético derivado de la fusión del intrón 1 del gen de la beta-actina de pollo y el intrón 2 de la hemoglobina beta de conejo), CBA (intrón 1 del gen de la beta-actina de pollo), hGH (intrón 1 del gen de la hormona de crecimiento humana), hFIX sint (intrón sintético derivado de diferentes porciones del gen del factor IX de coagulación humano y presente en el vector pLIVE, Mirus Bio, Madison, WI); intrón sintético de la subunidad beta de la hemoglobina humana (HBB2), y HBB2 optimizado; e intrones quiméricos tales como los intrones formados por el donante de empalme 5' del primer intrón de β -globina humana y la ramificación y el sitio aceptor 3' del intrón que se encuentra entre el líder y el cuerpo de la región variable de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina. (Buck et al., Int. J. Mol. Sci. (2020), 21, 4197; Ronzitti et al. Mol. Ther. Methods Clin Dev. (2016) 20 de julio; 3: 16049; y el intrón HBB-IGG proporcionado por el vector pCMVNT™).

[00165] En ciertas formas de realización, el ácido nucleico que codifica para un polinucleótido de ARN que comprende una secuencia de direccionamiento, un pri-miARN o un ARNsh se posiciona dentro de un intrón.

[00166] En ciertas formas de realización, el casete de expresión comprende un elemento regulador postranscripción. Los elementos reguladores postranscripción tales como el elemento regulador postranscripción Woodchuck (WPRE) y el elemento regulador de la hepatitis B pueden aumentar la expresión génica (Buck et al., *Int. J. Mol. Sci.* (2020), 21, 4197).

[00167] Las secuencias de señal de poliadenilación proporcionan la formación de una cola de poliA, que facilita la exportación nuclear, la traducción y/o la estabilidad del ARNm, y también puede estar involucrada en la terminación de la transcripción. Ejemplos de secuencias de señal de poliadenilación incluyen la señal de poliadenilación tardía de SV40, la secuencia de señal de poliA de la hormona de crecimiento bovina (bGHpA), poliA sintética, pA de β -globina de ratón, pA de β -globina de conejo (RbG) y pA a base de H4 (Buck et al., *Int. J. Mol. Sci.* (2020), 21, 4197).

[00168] En ciertas formas de realización, el casete de expresión comprende una secuencia de consenso Kozak o una variación de la misma. Las secuencias de consenso Kozak desempeñan un rol en la iniciación de la traducción. La secuencia de consenso Kozak y las variaciones se proporcionan, por ejemplo, en McClements et al., (2021) *Molecular vision*, 27, 233-242.

[00169] En ciertas formas de realización, el casete de expresión comprende un promotor corriente ascendente y una señal de poliadenilación corriente descendente, operativamente ligada a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polinucleótido de ARN.

[00170] En ciertas formas de realización, el casete de expresión comprende, 5' a 3', operativamente unidos a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polinucleótido de ARN, un promotor o promotor/mejorador, un intrón, la secuencia de ácido nucleico que codifica el polinucleótido de ARN, y una señal de poliadenilación.

[00171] En ciertas formas de realización, el casete de expresión comprende además una secuencia que codifica el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDFN). La(s) secuencia(s) que codifican GDFN pueden estar operativamente unidas al promotor que codifica para el polinucleótido de ARN que comprende una secuencia de direccionamiento de α -sinucleína, o a un promotor separado. En una forma de realización adicional, el casete de expresión comprende ácido nucleico que codifica para GDNF operativamente unido al promotor que codifica para el polinucleótido de ARN que comprende una secuencia de direccionamiento de α -sinucleína, donde la secuencia que

codifica GDNF está corriente ascendente de la secuencia que codifica el polinucleótido de ARN.

[00172] En ciertas formas de realización, los casetes de expresión comprenden además una secuencia diana de ARNm, que, en formas de realización adicionales, se incorpora en la UTR 3' del casete de expresión. Una secuencia diana de miARN es reconocida por miARN presente en células o tejidos particulares, lo que conduce a la degradación de las transcripciones de ARNm. En función de la presencia de ciertos miARN en células particulares, la incorporación de una secuencia diana de miARN se puede utilizar para reducir la expresión en ciertos tipos de células o tejidos. Se pueden utilizar múltiples repeticiones en tándem de secuencias diana de miARN para aumentar la degradación (Geisler et al., (2016) World Journal of Experimental Medicine 6 (2): 37-54).

[00173] En ciertas formas de realización, el casete de expresión, sin incluir la secuencia que codifica para un pri-miARN o ARNsh, contiene cualquiera de 0-5, 0-10, 0-15, 0-50, o 0-100 CpGs; 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 CpGs; y/o contiene 0 % a 5 %, 0 %, alrededor de 0,5 %, alrededor de 1,0 %, alrededor de 2,0 %, alrededor de 3,0 %, alrededor de 4,0 %, o alrededor de 5,0 % CpGs.

[00174] II.B. Ácido nucleico de vector viral recombinante

[00175] El ácido nucleico viral recombinante de polinucleótido contiene elementos virales 5' y/o 3' que proporcionan el empaquetamiento y replicación virales, y pueden proporcionar actividades adicionales tales como actividad promotora, integración del genoma o concatemerización episomal. Los elementos 5' y 3' se ubican generalmente en el extremo terminal 5' y 3' del ácido nucleico viral recombinante, o cerca de este, y pueden ser versiones naturales o modificadas de secuencias naturales. Los ejemplos de elementos 5' y 3' incluyen ITR de adenovirus, ITR de virus adenoasociados y secuencia de empaquetamiento; y repeticiones terminales largas (LTR) 5' y 3' de retrovirus y secuencia de empaquetamiento (Naso et al., (2017) BioDrugs, 31 (4), 317-334; Bulcha et al., (2021) Sig. Transduct. Target Ther. 6: 53 (2021); y Liu y Seol (2020) BMB Reports; 53 (11): 565-575).

[00176] El término "recombinante", como modificador de ácido nucleico o vector, indica una combinación de elementos que no se produce en la naturaleza. Por ejemplo, un ácido nucleico de vector viral recombinante proporciona elementos virales 5' y/o 3' junto con un casete de expresión que contiene uno o más elementos no asociados de forma natural con los elementos virales 5' y/o 3'. De forma similar, un vector viral, tal como un vector de rAAV, puede contener una cápside natural o modificada, que encapsida el ácido nucleico de vector viral recombinante.

[00177] Los polinucleótidos, casetes de expresión y ácidos nucleicos de vectores virales son compatibles con el vector viral particular. Por ejemplo, se puede producir rAAV que comprende ADNss o ADNds, se pueden producir vectores de adenovirus que comprenden ADNds, y se pueden producir vectores de retrovirus que comprenden ARNss.

[00178] En ciertas formas de realización, el ácido nucleico de vector viral, fuera de la región codificante de pri-miARN o ARNsh, contiene cualquiera de 0-5, 0-10, 0-15, 0-50, 0-100, o 0 a 150 CpGs; 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 CpGs; y/o 0 % a 10 %, 0 %, alrededor de 0,5 %, alrededor de 1,0 %, alrededor de 2,0 %, alrededor de 3,0 %, alrededor de 4,0 %, alrededor de 5,0 % CpGs, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 % o alrededor de 10 % CpGs.

III. Vectores virales

[00179] En ciertas formas de realización, el vehículo de suministro de genes es un vector viral. Los vectores virales comprenden una cápside de proteína que encapsida el ácido nucleico viral recombinante, y pueden suministrar el ácido nucleico a células o tejidos. De acuerdo con el vector particular, el vector viral puede comprender además una envoltura viral. Los ejemplos de vectores virales que se pueden utilizar incluyen vectores de adenovirus, rAAV, vectores de retrovirus y vectores de herpes simple.

[00180] Existen diferentes serotipos dentro de diferentes tipos de virus. Los diferentes serotipos pueden proporcionar diferentes actividades, tales como tropismo celular o tisular y probabilidad de generar una respuesta inmunitaria del huésped. El término "serotipo" se refiere ampliamente tanto a virus serológicamente distintos, como a virus no serológicamente distintos, que pueden estar dentro de un subgrupo o una variante de un serotipo dado. La distinción serológica se puede determinar en función de la falta de reactividad cruzada entre anticuerpos a una cápside en comparación con otra cápside. Tales diferencias de reactividad cruzada se deben generalmente a diferencias en las secuencias de proteínas de la cápside/determinantes antigénicos (por ejemplo, debido a diferencias en las secuencias de VP1, VP2 y/o VP3 de los serotipos de AAV).

[00181] A medida que se descubren más aislados de virus de origen natural o se generan mutantes de la cápside, puede haber o no haber diferencias serológicas con cualquiera de los serotipos existentes en la actualidad. Por lo tanto, en los casos en los que el nuevo virus no tiene ninguna diferencia serológica, este nuevo virus sería un subgrupo o una variante del serotipo correspondiente.

[00182] III.A. Vectores de adenovirus

[00183] Los adenovirus son virus de ADN bicatenario sin envoltura. Los vectores de adenovirus recombinantes comprenden ácido nucleico de adenovirus recombinante que carece de una o más proteínas implicadas en la replicación viral, y comprenden además una cápside adenoviral. Los vectores de adenovirus recombinantes se pueden producir con contenido de diferentes cantidades de ADN adenoviral. El genoma de Ad está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) de tipo horquilla que varían en longitud de 30 a 371 pb en sus extremos terminales. Las ITR sirven como estructuras autocebantes que promueven la replicación de ADN independiente de primasa. No es necesario que las repeticiones invertidas 5' y 3' sean repeticiones invertidas exactas. Se requiere una señal de empaquetamiento ubicada en el brazo izquierdo del genoma, para el empaquetamiento del genoma viral (Liu y Seol (2020) BMB Reports; 53 (11): 565-575; y Bulcha et al., (2021) Sig. Transduct. Target Ther. 6:53).

[00184] En ciertas formas de realización, el vector de adenovirus recombinante es un vector de tercera generación, también denominado "sin tripa" o "dependiente de auxiliar". Los vectores sin tripa pueden producirse a partir de ácido nucleico adenoviral recombinante, en el que todas o sustancialmente todas las secuencias virales, excepto las ITR y la señal de empaquetamiento, no están presentes. Los vectores adenovirales si tripa son vectores de alta capacidad capaces de alojar hasta alrededor de 36 kb de inserción de ADN. El ácido nucleico adenoviral recombinante preferido tiene alrededor de 27 kb a alrededor de 37 kb. Se pueden añadir secuencias de relleno al ácido nucleico adenoviral recombinante para aumentar el tamaño del ácido nucleico y la incorporación de la cápside. Las secuencias de relleno preferidas evitan las secuencias codificantes, las secuencias repetitivas, las secuencias de recombinación y las secuencias inmunogénicas (Liu y Seol (2020) BMB Reports; 53 (11): 565-575; Bulcha et al. (2021) Sig. Transduct. Target Ther. 6: 53; y Sandig et al., PNAS (2000) 97 (3): 1002-1007, cada uno de los cuales se incorpora en la presente solicitud como referencia en su totalidad).

[00185] En ciertas formas de realización, los vectores de adenovirus recombinantes se pueden producir sobre la base de serotipos humanos raros o serotipos de chimpancé. El uso de serotipos humanos raros y de chimpancé puede ser útil para reducir la respuesta inmunitaria del huésped contra los vectores de adenovirus recombinantes debido a la inmunidad preexistente (Guo et al., (2018) Human vaccines & immunotherapeutics, 14 (7): 1679-1685, y Bulcha et al., (2021) Sig. Transduct. Target Ther. 6:53).

[00186] Los vectores de adenovirus se pueden producir suministrando proteínas virales necesarias para la producción de vectores en trans utilizando, por ejemplo, virus

auxiliares o plásmidos y líneas celulares apropiados (Liu y Seol (2020) BMB Reports; 53 (11): 565-575; y Bulcha et al. (2021) Sig. Transduct. Target Ther. 6:53).

[00187] III.B. Vectores AAV

[00188] Un vector viral adenoasociado recombinante (también denominado en este documento “rAAV”) es a base del virus adenoasociado. El virus adenoasociado es un virus de ADN monocatenario que contiene un genoma de 4,7 kb flanqueado por ITR de 145 nt en ambos extremos del genoma. La actividad de ITR es importante para el autocebado y el empaquetamiento, y también puede proporcionar actividad adicional, tal como la actividad de promotor. Las ITR 5' y 3' de rAAV pueden variar en tamaño, y las repeticiones invertidas 5' y 3' no necesitan ser repeticiones invertidas exactas.

[00189] Un vector de rAAV contiene ácido nucleico recombinante de AAV y una cápside viral. El ácido nucleico recombinante de rAAV carece de secuencia(s) que codifican para una o más proteínas de AAV implicadas en la replicación viral. En ciertas formas de realización, el vector de rAAV contiene una ITR 5' y/o 3' de AAV junto con una inserción de ADN. En ciertas formas de realización, el ácido nucleico de rAAV comprende una ITR 5' y/o una ITR 3' seleccionadas independientemente de las ITR 5' y 3' proporcionadas en las ITR de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.10, AAVrh.74 y AAV3B. En otras formas de realización, están presentes las ITR 5' y 3', y ambas ITR son del mismo genoma de serotipo.

[00190] En otras formas de realización, la ITR 5' comprende una secuencia con una identidad de secuencia de por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % con SEQ ID NO: 182, y la ITR 3' comprende independientemente una secuencia con una identidad de secuencia de por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % con SEQ ID NO: 183.

[00191] En ciertas formas de realización, el ácido nucleico de rAAV es por lo menos de alrededor de 2,5 kb. Si es necesario, la secuencia de relleno puede usarse para aumentar el tamaño del ácido nucleico de rAAV y la eficiencia de empaquetamiento. En diferentes formas de realización, el ácido nucleico de rAAV que incluye el relleno es 4-5,2 kb, 3,0-5,5 kb, 4,0-5,0 kb, 4,3-4,8 kb, alrededor de 4,2 kb, alrededor de 4,3 kb, alrededor de 4,4 kb alrededor de 4,5 kb, alrededor de 4,6 kb, o alrededor de 4,7 kb. Las secuencias de relleno preferidas evitan las secuencias codificantes, las secuencias repetitivas, las secuencias de recombinación, y las secuencias inmunogénicas.

[00192] En ciertas formas de realización, el rAAV es un vector viral adenoasociado autocomplementario (scAAV) o un vector viral adenoasociado de horquilla corta (shAAV). El scAAV y el shAAV proporcionan un ácido nucleico viral adenoasociado recombinante

bicatenario que se puede incorporar en la cápside del AAV. El scAAV y el shAAV comprenden repeticiones diméricas invertidas que proporcionan ADN bicatenario intramolecular. El scAAV se puede producir mutando un sitio de resolución terminal de ITR de modo que Rep no pueda mellar el sitio de resolución terminal. El shAAV puede utilizar una horquilla corta para producir el dsAAV. El scAAV y el shAAV, al ser ADN bicatenario, proporcionan una ventaja al evitar el paso de síntesis de ADN requerido para el ácido nucleico de rAAV monocatenario cuando ingresa en una célula. Una posible desventaja del scAAV y el shAAV es que el tamaño de las inserciones de ADN que se pueden incorporar se reduce aproximadamente a la mitad en comparación con el ácido nucleico de rAAV monocatenario. (Patente de EE. UU. Nro. 10,457,940; Xie et al., Mol Ther. (2017) 7 de junio; 25 (6): 1363-1374; y McCarty Mol. Ther. (2008), 16 (10): 1648-1656; cada una de las cuales se incorpora por la presente como referencia en su totalidad).

[00193] Las cápsides de AAV de origen natural contienen las proteínas virales VP1, VP2 y VP3 en una relación de alrededor de 1:1:10. Los vectores de AAV se pueden producir cuando las tres proteínas virales son a base de un serotipo particular, o cuando una, dos o las tres proteínas virales son a base de diferentes serotipos.

[00194] La cápside y el ácido nucleico de AAV recombinantes pueden ser a base del mismo serotipo (o subgrupo o variante), o pueden ser diferentes entre sí. En ciertas formas de realización, un ácido nucleico de rAAV tiene el mismo genoma de serotipo (por ejemplo, ITR) que la proteína de la cápside encapsidante.

[00195] En diferentes formas de realización, la cápside de rAAV comprende una proteína que tiene una secuencia por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 86 %, por lo menos 87 %, por lo menos 88 %, por lo menos 89 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 %, por lo menos 99,1 %, por lo menos 99,2 %, por lo menos 99,3 %, por lo menos por lo menos 99,4 %, por lo menos 99,5 %, por lo menos 99,9 % o 100 % idéntica a una VP1, VP2 o VP3 de cualquiera de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.74, AAV3B, AAV-2i8, AAVrh.10, AAVrh.8, AAVHSC, AAV-B1, AAV-AS, o AAV1/rh.10; o VP1 de SEQ ID NO: 164 o SEQ ID NO: 167.

[00196] En ciertas formas de realización, las cápsides de AAV comprenden VP1, VP2 y VP3, donde cada una de manera independiente tiene una identidad de secuencia de por lo menos 80 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 % o 100 % a una VP1, VP2 o VP3 de cualquiera de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.74, AAV3B, AAV-2i8, AAVrh.10, AAVrh.8, AAVHSC, AAV-B1,

AAV-AS, AAV1/rh.10; o VP1 de SEQ ID NO: 164 o SEQ ID NO: 167; así como sus variantes (p. ej., variantes de cápside, tales como inserciones, adiciones, sustituciones y deleciones de aminoácidos) (ver, p. ej., Patentes de EE. UU. Nros. 9,909,142 y 9,840,719 que divulgan RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 y RHM15-6; Publicación de Patente U. S. Nro. 2013/0059732 y Patente de EE. UU. Nro. 9,169,299, que divulgan LK01, LK02, y LK03; y Patente de EE. UU. Nro. 11,110,153; cuyas divulgaciones se incorporan en este documento en su totalidad).

[00197] En ciertas formas de realización, la cápside comprende VP1 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 164; VP2 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 165; y VP3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 166.

[00198] En ciertas formas de realización, la cápside de AAV puede cruzar la barrera hematoencefálica, y proporcionar expresión en el SNC. Ejemplos de dichas cápsides de AAV y el diseño de cápsides de AAV capaces de proporcionar la expresión en el SNC se proporcionan en Chen *et al.*, (2021) J. Control. Release 333, 129-138 (p. ej., AAV9, AAV-PHP-B, AAV-PHP.eB, AAVrh.10, AAVrh.8, AAVHSC, AAV-B1, AAV-AS, y AAV1/rh.10), Patente de EE. UU. Nro. 9,585,971, y Goertsen *et al.*, (2022) Nat. Neurosci. 25, 106-115 (2022).

[00199] El genoma del AAV contiene dos genes principales: *rep* y *cap*. La transcripción del gen *rep* se inicia a partir de dos promotores diferentes, lo que da como resultado la producción de proteínas no estructurales denominadas Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40. Las proteínas rep funcionan en la replicación y/o encapsidación del genoma. El gen *cap* codifica proteínas estructurales que forman la cápside (VP1, VP2 y VP3); una proteína activadora del ensamblaje no estructural (APP), que realiza funciones relacionadas con el ensamblaje de la cápside; y la proteína accesoria asociada a la membrana, que puede estar asociada con las fases de producción del ciclo de replicación (Maurer y Weitzman (2020) Hum. Gene Ther. 31 (9-10): 499-511, incorporado en la presente solicitud como referencia en su totalidad).

[00200] El AAV requiere funciones de virus auxiliares para completar su ciclo de replicación. Las funciones de virus auxiliares pueden ser suministradas por diferentes virus en líneas celulares permisivas. Las líneas celulares permisivas son líneas celulares capaces de soportar la replicación viral. Los ejemplos de virus auxiliares para AAV incluyen adenovirus, HSV-1, HPV-16 y HboV1 que se pueden usar junto con, por ejemplo, células de primates permisivas; y baculovirus que se pueden usar junto con, por ejemplo, células de insectos permisivas tales como sf9 (Maurer y Weitzman Hum. Gene Ther. (2020) 31 (9-10): 499-511, y Meier et al., (2020), Viruses 19; 12 (6): 662, ambas de los cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad).

[00201] El AAV recombinante se puede producir suministrando proteínas virales necesarias para la producción del vector en trans utilizando, por ejemplo, virus auxiliares o plásmidos y líneas celulares apropiados. En ciertas formas de realización, el rAAV se produce utilizando un plásmido genómico del vector rAAV. El plásmido comprende aquella porción del ácido nucleico de rAAV que finalmente se empaqueta o encapsida para formar un vector viral (por ejemplo, rAAV). La “estructura principal del plásmido” contiene elementos importantes para la propagación y la producción de virus recombinantes. A excepción de los posibles restos de clonación de 3' ITR y/o 5' ITR, la estructura principal del plásmido no está empaquetada ni encapsulada en partículas virales.

[00202] El plásmido del genoma del vector puede contener regiones tales como un origen de replicación y un marcador seleccionable. Los sitios adicionales que pueden estar presentes incluyen sitios de clonación.

[00203] El AAV recombinante se puede producir a partir de diferentes tipos de líneas celulares, incluidas HeLa, A549, BHK, Vero y HEK293, o derivados de las mismas. En ciertas formas de realización, se usan células HEK293 (número de acceso a la Colección Americana de Cultivos Tipo ATCC CRL1573). Otras líneas de células huéspedes apropiadas para la producción de vectores rAAV se describen, por ejemplo, en Robert et al. (2017) *Biotechnol. J.* (2017) 12 (3), 1600193; y la Solicitud Internacional Nro. PCT/US2017/024951, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento en su totalidad.

[00204] El AAV recombinante se puede cultivar en una diversidad de condiciones diferentes adecuadas para proporcionar crecimiento celular y expresión génica. Las referencias que describen la fabricación de rAAV incluyen Clément y Grieger (2016) *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 16; 3: 16002; Robert et al., (2017) *Biotechnol. J.* 12 (3), 1600193; y *Adeno-Associated Virus Vectors* (2019), Ed. Castle., 1ª edición, Springer, Nueva York, N. Y.; cada uno de los cuales se incorpora por la presente como referencia en su totalidad.

[00205] En ciertas formas de realización, las funciones auxiliares de AAV se introducen en la célula huésped transfectando la célula huésped con una construcción auxiliar de AAV, o bien antes o simultáneamente con la transfección de un vector de expresión de AAV. Una célula huésped que tiene funciones auxiliares de AAV puede denominarse “célula auxiliar” o “célula auxiliar de empaquetamiento”. Las construcciones auxiliares de AAV se utilizan a veces para proporcionar por lo menos una expresión transitoria de genes *rep* y/o *cap* de AAV para complementar las funciones de AAV faltantes necesarias para la transducción productiva de AAV. Las construcciones auxiliares de AAV a menudo

carecen de ITR de AAV y no pueden replicarse ni empaquetarse. Estas construcciones pueden estar, por ejemplo, en forma de plásmido, fago, transposón, cósmido, virus o virión. Se han descrito varias construcciones auxiliares de AAV, tales como los plásmidos de pAAV/Ad y pIM29+45 de uso común que codifican productos de expresión tanto de *rep* como de *cap*. Se conocen otros vectores que codifican productos de expresión de *rep* y/o *cap*. Se pueden producir AAV recombinantes, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE. UU. Nro. 9,408,904; y en las Solicitudes Internacionales Nros. PCT/US2017/025396 y PCT/US2016/064414, cuyas divulgaciones se incorporan en su totalidad en el presente documento.

[00206] En ciertas formas de realización, un vector de rAAV se produce mediante una célula de producción de rAAV que comprende la actividad del virus auxiliar rAAV. El genoma de la célula de producción de rAAV comprende el ácido nucleico de rAAV, el gen *rep* y el gen *cap*.

[00207] En ciertas formas de realización, un vector rAAV se produce cultivando una célula permisiva de rAAV que comprende un plásmido del genoma de AAV, donde la célula permisiva de rAAV comprende además los genes *rep* y *cap* proporcionados ya sea como parte del genoma celular y/o por uno o más plásmidos separados; y la actividad del virus auxiliar ya sea como parte del genoma celular y/o proporcionada por uno o más plásmidos separados. En otras formas de realización, (a) la línea celular permisiva de rAAV es una célula de empaquetamiento, donde el genoma de la célula de empaquetamiento comprende el gen *cap* y el gen *rep*; (b) el gen *rep*, el gen *cap* y la actividad auxiliar se proporcionan a partir del mismo plásmido; o (c) el gen *rep* y el gen *cap* son proporcionados por un plásmido *rep/cap* y la actividad auxiliar es proporcionada por un plásmido auxiliar.

[00208] En ciertas formas de realización que implican el uso de funciones auxiliares de HSV, las funciones auxiliares son proporcionadas por genes que codifican para por lo menos UL5, UL8, UL52 e ICP8.

[00209] En ciertas formas de realización que implican el uso de funciones auxiliares de adenovirus, las funciones auxiliares son proporcionadas por genes que codifican para por lo menos E1A, E1B19K, E1B55K, E2A, E4orf6 y VA ARN. En ciertas formas de realización, las funciones de E1, E2A y VR ARN son proporcionadas por un plásmido auxiliar, donde las funciones auxiliares adicionales son proporcionadas por una cepa huésped.

[00210] En ciertas formas de realización, el vector de rAAV se obtiene produciendo rAAV utilizando los métodos descritos en este documento y purificando el rAAV. La purificación de rAAV se puede realizar utilizando técnicas como la purificación en función

de gradientes, la purificación en función de columnas y métodos combinados (ver, por ejemplo, Ayuso et al., Curr Gene Ther. (2010) 10 (6): 423-36, que se incorpora en la presente solicitud como referencia en su totalidad)

[00211] III.C. Vectores de retrovirus

[00212] Los retrovirus son virus de ARN monocatenario envueltos que comprenden LTR 5' y 3', y una secuencia de empaquetamiento de señal ubicada justo fuera de la LTR. Diferentes tipos de vectores de retrovirus pueden contener diferentes cantidades de genoma viral. En ciertas formas de realización, el vector de retrovirus es un vector lentiviral a base de HIV, que conserva todas las secuencias que actúan en cis necesarias para el empaquetamiento de ARN viral, la transcripción inversa y la integración de ADN proviral, mientras que elimina todos los genes codificantes de proteínas de HIV. Los vectores lentivirales tienen una capacidad de empaquetamiento de hasta alrededor de 9 kb. Si es necesario, se puede utilizar una secuencia de relleno para aumentar el tamaño del ácido nucleico del rAAV y la eficiencia de empaquetamiento. Se pueden producir vectores lentivirales suministrando las proteínas virales necesarias para la producción del vector en trans utilizando plásmidos y líneas celulares adecuados (Bulcha et al., (2021) Sig. Transduct. Target Ther. 6:53).

[00213] III.D. Vectores de parvovirus adicionales

[00214] En ciertas formas de realización, el vector es a base de un virus parvovirus, distinto de AAV, tal como un *Erythroparvovirus*, *Protoparvovirus*, o *Tetraparvovirus*. Los miembros del *Erythroparvovirus* (por ejemplo, el parvovirus humano B19) tienen típicamente un tamaño de genoma de alrededor de 5,6 kb y, por lo tanto, se espera que los vectores recombinantes a base de un *Erythroparvovirus* alojen una carga útil recombinante más grande que un vector de AAV. *Protoparvovirus* y *Tetraparvovirus* tienen una capacidad genómica de alrededor de 5,3 kb y, por lo tanto, también se espera que los vectores recombinantes a base de estos virus alojen una carga útil recombinante más grande que un vector de AAV.

[00215] Se describen ejemplos de cápsides de *Erythroparvovirus* en las Publicaciones de Patentes Internacionales Números WO2023/220043, WO2023/220035 y WO2023/220040, que se incorporan en su totalidad en la presente solicitud como referencia.

[00216] Se describen ejemplos de cápsides de *Protoparvovirus* y *Tetraparvovirus* en la Publicación de Patente Internacional Número WO2022/140683, que se incorpora en su totalidad a la presente solicitud como referencia.

IV. Vectores no virales

[00217] En ciertas formas de realización, el vehículo de suministro de genes es un vector no viral. Los vectores no virales preferidos son nanopartículas. Se puede emplear una diversidad de nanopartículas diferentes, incluidas nanopartículas lipídicas (LNP), nanopartículas poliméricas, nanopartículas de polímeros lipídicos (LPNP), nanopartículas a base de proteínas y péptidos, dendrímeros de ADN y nanoportadores a base de ADN, nanotubos de carbono, micropartículas, microcápsulas, nanopartículas inorgánicas, nanopartículas de jaula de péptidos y exosomas (ver, por ejemplo, Riley and Vermerris *Nanomaterials* (2017) 201, 7, 94; Thomas *et al.*, *Molecules* (2019), 24, 3744; Bochicchio *et al.*, (2021), 13, 198; Munagala *et al.*, *Cancer Letters* (2021), 505, 58; Fu *et al.*, (2020) *NanoImpact* 20, 100261; Neshat *et al.* (2020) *Current Opin. Biotechnol.* 66:1-10; Ouranidis *et al.*, (2022) *Biomedicines*, 10, 50; and Qin *et al.*, *Signal Transduct Target Ther.* (2022) May 21;7(1):166, cada una de las cuales se incorpora en la presente solicitud como referencia en su totalidad).

[00218] Si se desea, una nanopartícula puede dirigirse a un tipo de célula utilizando, por ejemplo, ligandos de direccionamiento que reconocen un receptor de célula diana. Los ejemplos de ligandos de direccionamiento incluyen carbohidratos (por ejemplo, galactosa, manosa, glucosa y galactomanano), ligandos endógenos (por ejemplo, ácido fólico y transferrina), anticuerpos y proteínas/péptidos (por ejemplo, RGD, factor de crecimiento epidérmico y lipoproteína de baja densidad) y péptidos (por ejemplo, Teo *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2016), 98, 41).

[00219] Las nanopartículas se pueden utilizar para suministrar ARN inhibidor o construcciones de polinucleótidos codificantes a una célula. En diferentes formas de realización, las nanopartículas pueden suministrar compuestos terapéuticos adicionales; y se proporcionan uno o más compuestos adicionales en diferentes nanopartículas. La referencia al compuesto incluye moléculas pequeñas y moléculas grandes (por ejemplo, proteínas terapéuticas y anticuerpos).

[00220] La producción de diferentes nanopartículas y la incorporación de ácido nucleico y otros compuestos es bien conocida en la técnica. Los ejemplos de publicaciones que ilustran la incorporación de ácido nucleico en una nanopartícula particular, tal como una LPNP y una LNP, incluyen Teo *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2016) 98, 41; Bochicchio *et al.*, *Pharmaceutics* (2021) 13, 198; Mahzabin y Das, *IJPSR* (2021) 12(1), 65; y Teixeira *et al.*, (2017) *Prog. Lipid Res.* Oct; 68: 1-11 (cada uno de las cuales se incorpora por la presente como referencia en su totalidad). Los factores que pueden afectar la incorporación de moléculas pequeñas en una nanopartícula incluyen la hidrofobicidad y la presencia de una fracción ionizable (ver, por ejemplo, Nii e Ishii

International Journal of Pharmaceutics (2005) 298, 198; y Chen et al., Journal of Controlled Release (2018) 286, 46).

IV.A. Sistemas de suministro a base de lípidos

[00221] Los sistemas de suministro a base de lípidos incluyen el uso de un lípido como componente. Los ejemplos de sistemas de suministro a base de lípidos incluyen liposomas, LNP, micelas y vesículas extracelulares.

[00222] Una "nanopartícula lipídica" o "LNP" se refiere a una vesícula a base de lípidos útil para el suministro de moléculas de ácido nucleico y que tiene dimensiones en la nanoescala. En diferentes formas de realización, la nanopartícula tiene un tamaño de alrededor de 10 nm a alrededor de 1000 nm, de alrededor de 50 nm a alrededor de 500 nm, o de alrededor de 50 nm a alrededor de 200 nm.

[00223] El ADN tiene carga negativa. Por lo tanto, puede ser beneficioso que la LNP comprenda un lípido catiónico tal como, por ejemplo, un amino lípido. Se describen amino lípidos ejemplares en las Patentes de EE. UU. Números 9,352,042, 9,220,683, 9,186,325, 9,139,554, 9,126,966, 9,018,187, 8,999,351, 8,722,082, 8,642,076, 8,569,256, 8,466,122 y 7,745,651 y en las Publicaciones de Patentes de EE. UU. Números 2016/0213785, 2016/0199485, 2015/0265708, 2014/0288146, 2013/0123338, 2013/0116307, 2013/0064894, 2012/0172411 y 2010/0117125, todas las cuales se incorporan aquí en su totalidad. En ciertas formas de realización, la LNP comprende aminolípidos descritos en la Patente de EE. UU. Nro. 9,512,073, que se incorpora aquí en su totalidad.

[00224] Los términos "lípido catiónico" y "amino lípido" se utilizan indistintamente en el presente documento para incluir lípidos y sales de los mismos que tienen una, dos, tres o más cadenas de ácidos grasos o de alquilo grasos y un grupo amino valorable según el pH (por ejemplo, un grupo alquilamino o dialquilamino). El lípido catiónico es típicamente protonado (es decir, cargado positivamente) a un pH inferior al pKa del lípido catiónico, y es sustancialmente neutro a un pH superior al pKa. El lípido catiónico también puede ser lípido catiónico valorable. En ciertas formas de realización, los lípidos catiónicos comprenden un grupo amina terciaria protonable (por ejemplo, valorable según el pH); cadenas de alquilo C18, donde cada cadena de alquilo puede tener independientemente uno o más enlaces dobles, uno o más enlaces triples; y uniones de éter, éster o cetal entre el grupo de cabeza y las cadenas de alquilo.

[00225] Los lípidos catiónicos incluyen 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilineniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-di- γ -linoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (γ -DLenDMA), 2,2-dilinoleil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (Dlin-K-C2-DMA, también conocido como Dlin-C2K-DMA, XTC2, y C2K), 2,2-

dilinoleil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (Dlin-K-DMA), dilinoleilmetil-3-dimetilaminopropionato (Dlin-M-C2-DMA, también conocido como MC2), (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato (Dlin-M-C3-DMA, también conocido como MC3), sus sales y sus mezclas. Otros lípidos catiónicos además incluyen 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DODMA), 2,2-dilinoleil-4-(3-dimetilaminopropil)-[1,3]-dioxolano (Dlin-K-C3-DMA), 2,2-dilinoleil-4-(3-dimetilaminobutil)-[1,3]-dioxolano (Dlin-K-C4-DMA), Dlen-C2K-DMA, γ -Dlen-C2K-DMA, y (Dlin-MP-DMA) (también conocido como 1-B11).

[00226] Aún otros lípidos catiónicos incluyen 2,2-dilinoleil-5-dimetilaminometil-[1,3]-dioxano (Dlin-K6-DMA), 2,2-dilinoleil-4-N-metilpepiazino-[1,3]-dioxolano (Dlin-K-MPZ), 1,2-dilinoleilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (Dlin-C-DAP), 1,2-dilinoileyoxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (Dlin-DAC), 1,2-dilinoileyoxi-3-morfolinopropano (Dlin-MA), 1,2-dilinoleoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-dilinoileiltio-3-dimetilaminopropano (Dlin-S-DMA), 1-linoleoil-2-linoleiloxi-3-dimetilaminopropano (Dlin-2-DMA), 1,2-dilinoleiloxi-3-trimetilaminopropano, sal de cloruro (Dlin-TMA.Cl), 1,2-dilinoleoil-3-trimetilaminopropano, sal de cloruro (Dlin-TAP.Cl), 1,2-dilinoileiloxi-3-(N-metilpiperazino)propano (Dlin-MPZ), 3-(N,N-dilinoleilamino)-1,2-propanodiol (DlinAP), 3-(N,N-dioleilamino)-1,2-propanodio (DOAP), 1,2-dilinoileiloxo-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (Dlin-EG-DMA), cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), bromuro de N,N-distearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 3-(N—(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol (DC-Chol), bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietil amonio (DMRIE), 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio trifluoroacetato (DOSPA), dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS), 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano (CLinDMA), 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetil-1-(cis,cis-9',1'-2'-octadecadienoxi)propano (CpLinDMA), N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina (DMOBA), 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DOcarbDAP), 1,2-N,N'-dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLincarbDAP), dexametasona-espermina (DS) y espermina disustituida (D2S) o sus mezclas.

[00227] Pueden usarse una cantidad de preparaciones comerciales de lípidos catiónicos tales como, LIPOFECTIN® (que incluye DOTMA y DOPE, disponibles de GIBCO/BRL), y LIPOFECTAMINE® (que comprende DOSPA y DOPE, disponibles de GIBCO/BRL).

[00228] Lípidos ionizables adicionales que pueden usarse incluyen C12-200, 306Oi10, MC3, cKK-E12, bCKK-E12, Lípido 5, Lípido 9, ATX-002, ATX-003, y Merck-32. La Publicación de Solicitud de Patente U. S. Nro. 2017/0367988 describe Merck-32.

[00229] En formas de realización adicionales, el lípido catiónico puede estar presente en una cantidad de alrededor de 10 % en relación molar de la LNP a alrededor de 85 % en relación molar de la LNP, o de alrededor de 50 % en relación molar de la LNP a alrededor de 75 % en relación molar de la LNP.

[00230] La LNP puede comprender un lípido neutro. Los lípidos neutros pueden comprender una especie lipídica que existe en forma zwitteriónica neutra o no cargada a pH fisiológico. Dichos lípidos incluyen diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, dihidroesfingomielina, cefalina y cerebrósidos. La selección de lípidos neutros generalmente se guía por consideraciones que incluyen el tamaño de partícula y la estabilidad. En ciertas formas de realización, el componente lipídico neutro puede ser un lípido que tiene dos grupos acilo (por ejemplo, diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina).

[00231] Los lípidos que tienen una diversidad de grupos de cadena acilo de longitud de cadena y grado de saturación variables están disponibles o pueden aislarse o sintetizarse. En ciertas formas de realización, se pueden utilizar lípidos que contienen ácidos grasos saturados con longitudes de cadena de carbono en el intervalo de C14 a C22. En ciertas formas de realización, se utilizan lípidos con ácidos grasos mono o diinsaturados con longitudes de cadena de carbono en el rango de C14 a C22. Además, se pueden usar lípidos que tienen mezclas de cadenas de ácidos grasos saturados e insaturados. Los lípidos neutros ejemplares incluyen 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) o una fosfatidilcolina. Los lípidos neutros también pueden estar compuestos de esfingomielina, dihidroesfingomielina o fosfolípidos con otros grupos de cabeza, tales como serina e inositol.

[00232] En otras formas de realización que proporcionan lípidos neutros, el lípido neutro puede estar presente en una cantidad de alrededor de 0,1 % en peso de la LNP a alrededor de 99 % en peso de la LNP, o de alrededor de 5 % en peso de la LNP a alrededor de 15 % en peso de la LNP, p. ej., alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor

de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, o alrededor de 99 %.

[00233] La LNP puede contener componentes adicionales tales como esteroides y polietilenglicol. Los esteroides pueden conferir fluidez a la LNP. Tal como se utiliza en el presente documento, "esterol" se refiere a un esteroide de origen natural de origen vegetal (fitoesteroides) o animal (zoosteroides), así como a esteroides sintéticos de origen no natural, todos los cuales se caracterizan por la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo A del esteroide. Los esteroides adecuados incluyen los utilizados convencionalmente en el campo de la preparación de liposomas, vesículas lipídicas o partículas lipídicas, más comúnmente colesterol. Los fitoesteroides incluyen campesterol, sitosterol y estigmasterol. Los esteroides también incluyen lípidos modificados con esteroides, tales como los descritos en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. Nro. 2011/0177156. En diferentes formas de realización que proporcionan un esteroide, el esteroide está presente en una cantidad de alrededor de 1 % en peso de la LNP a alrededor de 80 % en peso de la LNP, o de alrededor de 10 % en peso de la LNP a alrededor de 25 % en peso de la LNP.

[00234] El polietilenglicol (PEG) es un polímero soluble en agua de unidades repetitivas de etileno PEG con grupos hidroxilo terminales. Los PEG se clasifican por sus pesos moleculares, por ejemplo, PEG 2000 tiene un peso molecular promedio de alrededor de 2000 daltons, y PEG 5000 tiene un peso molecular promedio de alrededor de 5000 daltons. Los PEG disponibles comercialmente de Sigma Chemical Co. y otras compañías incluyen monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinimidilo succinato (MePEG-S-NHS), monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH₂), monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG-TRES) y monometoxipolietilenglicol-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM).

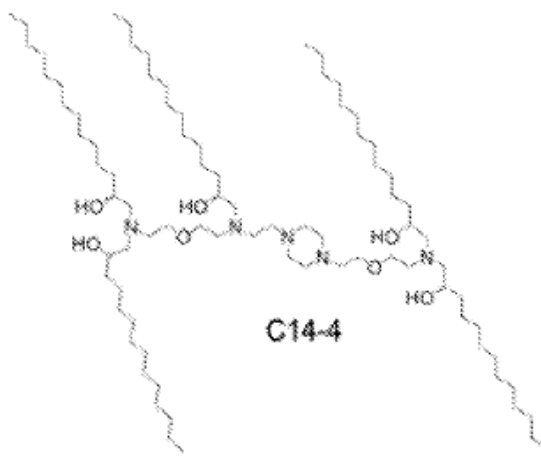
[00235] En ciertas formas de realización relacionadas con el PEG, el PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 550 a alrededor de 10 000 daltons y está opcionalmente sustituido con alquilo, alcoxi, acilo o arilo. En otras formas de realización, el PEG está sustituido con metilo en la posición hidroxilo terminal. En otras formas de realización, el PEG tiene un peso molecular promedio de alrededor de 750 a alrededor de 5000 daltones, o de alrededor de 1000 a alrededor de 5000 daltones, o de alrededor de 1500 a alrededor de 3000 daltones, o de alrededor de 2000 daltones, o de alrededor de 750 daltones.

[00236] Los lípidos modificados con PEG incluyen los conjugados de PEG-dialquiloxypropilo (PEG-DAA) descritos en las Patentes de EE. UU. Nros. 8,936,942 y 7,803,397. Los lípidos modificados con PEG (o conjugados de lípido-polioxi-etileno)

pueden tener una diversidad de porciones lipídicas de "anclaje" para asegurar la porción de PEG a la superficie de la vesícula lipídica. Los ejemplos de lípidos modificados con PEG adecuados incluyen fosfatidiletanolamina y ácido fosfatídico modificados con PEG, conjugados de PEG-ceramida (por ejemplo, PEG-CerC14 o PEG-CerC20) que se describen en la Patente Estadounidense Nro. 5,820,873, dialquilaminas modificadas con PEG y 1,2-diaciloxipropan-3-aminas modificadas con PEG. En ciertas formas de realización, el lípido modificado con PEG puede ser diacilglicerol y dialquilglicerol modificados con PEG. En ciertas formas de realización, el PEG puede estar en una cantidad de alrededor del 0,1 % en peso de la LNP a alrededor del 50 % en peso de la LNP, o de alrededor del 5 % en peso de la LNP a alrededor del 15 % en peso de la LNP.

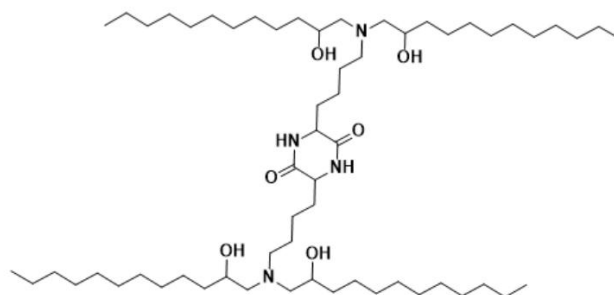
[00237] En formas de realización adicionales relacionadas con el tamaño de la LNP, antes de la encapsulación de ácido nucleico, las LNP tienen un rango de tamaño de alrededor de 10 nm a 500 nm, o de alrededor de 50 nm a alrededor de 200 nm, o de 75 nm a alrededor de 125 nm.

[00238] En ciertas formas de realización relacionadas con LNP, la LNP se describe en Billingsley et al., Nano Lett. 2020, 20, 1578; Billingsley et al., Publicación de Patente Internacional Nro. WO 2021/077066; o Solicitud de Patente de EE. UU. Nro. 2022/396556 (cada una de las cuales se incorpora por la presente como referencia en su totalidad). Estas publicaciones describen LNP que contienen PEG anclado a lípidos, colesterol, fosfolípidos y lípidos ionizables. En ciertas formas de realización, la LNP contiene un núcleo de poliamina C14-4 y/o tiene un tamaño de partícula de alrededor de 70 nm. C14-4 tiene la siguiente estructura.

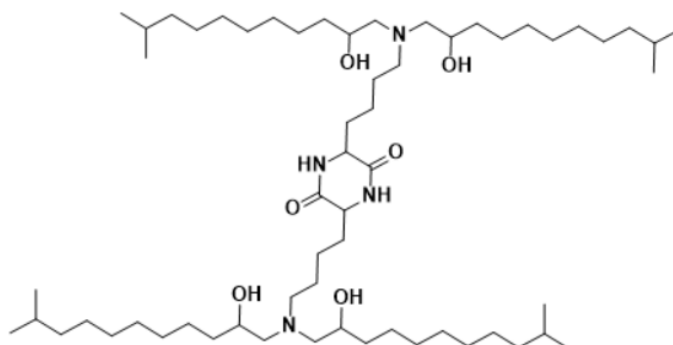


[00239] En ciertas formas de realización, la LNP está compuesta por un lípido catiónico o lipopéptido descrito en la Patente de EE. UU. Nro. 10,493,031, la Patente de EE. UU. Nro. 10,682,374 o el documento WO2021/077066 (cada una de las cuales se incorpora por la presente como referencia en su totalidad). En ciertas formas de realización, la LNP

contiene un lípido catiónico, un lípido a base de colesterol y/o uno o más lípidos modificados con PEG. En ciertas formas de realización, la LNP contiene cKK-E12 (Dong et al., PNAS (2014) 111 (11), 3955):

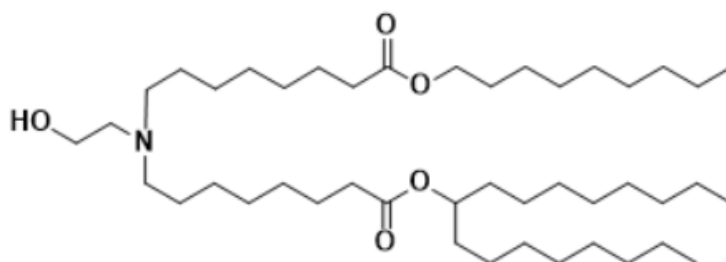


[00240] En ciertas formas de realización, la LNP comprende una forma modificada de cKK-E12 referida en este documento como “bCKK-E12,” que tiene la siguiente estructura:

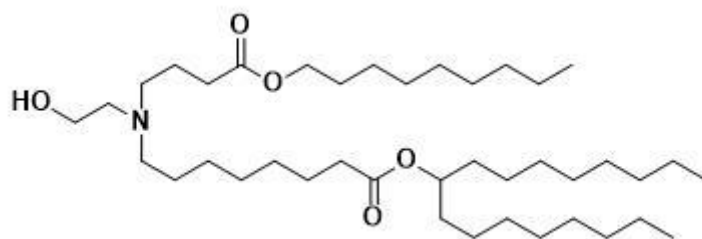


[00241] En ciertas formas de realización, la LNP comprende Lípido 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 como lo describen Sabnis *et al.*, Molecular Therapy 2018, 26: 6, 1509-1519 (incorporado en este documento por referencia en su totalidad). En ciertas formas de realización, la LNP comprende Lípido 5, 8, 9, 10, o 11, descrito en Sabnis *et al.*

[00242] Lípido 5 de Sabnis *et al.* tiene la estructura:



[00243] Lípido 9 de Sabnis *et al.* tiene la estructura:



[00244] Los lípidos adicionales que pueden ser utilizados incluyen aquellos descritos por Roces *et al.*, *Pharmaceutics*, 2020, 12,1095; Jayaraman *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51, 8529-8533; Maier *et al.*, *www.moleculartherapy.org*, 2013, Vol. 21, No. 8, 1570-1578; Liu *et al.*, *Adv. Mater.* 2019, 31, 1902575, p. ej., BAMEA-O16B; Cheng *et al.*, *Adv. Mater.*, 2018, 30, 1805308, p. ej., 5A2-SC8; Hajj y Ball, *Small*, 2019 15, 1805097, p. ej., 306Oi10; Du *et al.*, *Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU.* Nro. 20160376224; y Tanaka *et al.*, *Adv. Funct. Mater.*, 2020, 30, 1910575; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

[00245] En formas de realización adicionales, la nanopartícula es una LNP. En formas de realización adicionales, la LPN en mol % comprende, consiste esencialmente en, o consiste en los siguientes componentes: (1) uno o más lípidos catiónicos de alrededor de 20 % a alrededor de 65 %, uno o más fosfolípidos de alrededor de 1 % a alrededor de 50 %, uno o más lípidos conjugados con PEG de alrededor de 0,1 % a alrededor de 10 %, y colesterol de 0 % a alrededor de 70 %; y (2) uno o más lípidos catiónicos de alrededor de 20 % a alrededor de 50 %, uno o más fosfolípidos de alrededor de 5 % a alrededor de 20 %, uno o más lípidos conjugados con PEG de alrededor de 0,1 % a alrededor de 5 %, y colesterol de alrededor de 20 % a alrededor de 60 %. En formas de realización adicionales, el lípido fosfolípido es un lípido neutro; y el lípido fosfolípido es DOPE o DSPC.

[00246] En formas de realización adicionales, la LNP, en mole %, comprende, consiste esencialmente en, o consiste de los siguientes componentes: (1) cKK-E12 alrededor de 35 %; C14-PEG2000, alrededor de 2,5 %; colesterol, alrededor de 46,5 %; y DOPE, alrededor de 16 %; (2) bCKK-E12 alrededor de 35 %; C14-PEG2000, alrededor de 2,5 %; colesterol, alrededor de 46,5 %; y DOPE, alrededor de 16 %; (3) Lípido 9 alrededor de 50 %; C14-PEG2000, alrededor de 1,5 %; colesterol, alrededor de 38,5 %; y DSPC alrededor de 10 %; (4) Lípido 5 alrededor de 50 %; C14-PEG2000 alrededor de 1,5 %; colesterol alrededor de 38,5 %; y DSPC alrededor de 10 %; (5) lípido ionizable, alrededor de 50 %; DSPC, alrededor de 10 %; colesterol, alrededor de 37,5 %; y estabilizador (PEG-Lípido), alrededor de 2,5 %; o (6) es GenVoy-ILM™ LNP (Precision NanoSystems).

[00247] IV.B. Nanopartículas a base de polímero

[00248] Los sistemas de suministro a base de polímeros pueden estar hechos de una diversidad de diferentes materiales naturales y sintéticos. El ADN y otros compuestos pueden quedar atrapados en la matriz polimérica de las nanopartículas poliméricas, o pueden adsorberse o conjugarse en la superficie de las nanopartículas. Los ejemplos de polímeros comúnmente utilizados para el suministro de ácidos nucleicos incluyen ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliláctico (PLA), poli(etilenimina) (PEI) y derivados de PEI, quitosano, dendrímeros, polianhídrido, policaprolactona, polimetacrilatos, poli-L-lisina, pululano, dextrano, ácido hialurónico y poli- α -aminoésteres (Thomas et al., (2019) *Molecules* 24, 3744).

[00249] Las nanopartículas a base de polímeros pueden tener diferentes tamaños, que varían de alrededor de 1 nm a alrededor de 1000 nm, de alrededor de 10 nm a alrededor de 500 nm, de alrededor de 50 nm a alrededor de 200 nm, de alrededor de 100 nm a alrededor de 150 nm, y de alrededor de 150 nm o menos.

[00250] IV.C. Nanopartículas poliméricas lípidas

[00251] Las nanopartículas de polímero lipídicas son nanopartículas híbridas que proporcionan tanto un componente lipídico como un componente polimérico y, como tales, pueden considerarse una LNP o LPNP. La configuración LPNP puede proporcionar un polímero externo y un lípido interno, o un lípido externo y un polímero interno. La presencia de dos tipos diferentes de material facilita el diseño de nanopartículas para proporcionar una liberación retardada de un componente. Se pueden seleccionar diferentes componentes lipídicos y poliméricos teniendo en cuenta el material que se va a suministrar (por ejemplo, ver Teo et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* (2016) 98, 41; Bochicchio et al., *Pharmaceutics* (2021) 13, 198; Mahzabin y Das, *IJPSR* (2021) 12(1), 65; y Teixeira et al., (2017) *Prog. Lipid Res.* Oct.; 68: 1-11).

[00252] IV.D. Nanopartículas a base de proteínas y péptidos

[00253] Los sistemas a base de proteínas y péptidos pueden emplear una diversidad de proteínas y péptidos diferentes. Los ejemplos de proteínas que se pueden emplear incluyen gelatina y elastina. Los sistemas a base de péptidos pueden emplear, por ejemplo, CPP.

[00254] Los CPP son péptidos cortos (6-30 residuos de aminoácidos) potencialmente capaces de penetración intracelular para suministrar moléculas terapéuticas. La mayoría de los CPP consisten principalmente en residuos arginina y lisina, lo que los hace catiónicos e hidrófilos, pero los CPP también pueden ser anfifílicos, aniónicos o hidrófobos. Los CPP pueden derivarse de biomoléculas naturales (p. ej., proteína Tat del HIV-1) u obtenerse mediante métodos sintéticos (p. ej., poli-L-lisina, poliarginina) (Singh et al., *Drug Deliv.* 2018; 25 (1): 1996-2006). Los ejemplos de CPP incluyen CPP

catiónicos (altamente cargados positivamente) tales como el péptido Tat, penetratina, protamina, poli-L-lisina y poliarginina; CPP anfipáticos (péptidos quiméricos o fusionados, contruidos a partir de diferentes fuentes, que contienen secuencias de aminoácidos cargadas tanto positiva como negativamente), tales como transportano, VT5, bactericina-7 (Bac7), péptido rico en prolina (PPR), SAP (VRLPPP)₃, TP10, pep-1 y MPG); CPP membranotrópicos (exhiben naturaleza hidrofóbica y anfipática simultáneamente, y comprenden residuos aromáticos grandes y residuos pequeños) tales como H625, SPIONs-PEG-CPP y NP; y CPP hidrófobos (contienen solo motivos o residuos no polares) tales como SG3, PFVYLI, pep-7 y factores de crecimiento de fibroblastos.

[00255] Las nanopartículas de proteínas y péptidos se pueden proporcionar en diferentes tamaños, por ejemplo, que van desde alrededor de 1 nm hasta alrededor de 1000 nm, desde alrededor de 10 nm hasta alrededor de 500 nm, desde alrededor de 50 nm hasta alrededor de 200 nm, desde alrededor de 100 nm hasta alrededor de 150 nm, o desde alrededor de 150 nm o menos.

[00256] IV.E. Nanopartículas de jaula de péptidos

[00257] Los sistemas de suministro a base de jaulas de péptidos se pueden producir a partir de material proteináceo capaz de ensamblarse en una estructura de tipo jaula que forma un entorno interno restringido. Las jaulas de péptidos pueden comprender una cubierta proteinácea que se autoensambla para formar una jaula de proteína (por ejemplo, una estructura con una cavidad interior que es accesible al solvente de forma natural, o puede hacerse accesible al solvente alterando la concentración de solvente, el pH o las relaciones de equilibrio). Los monómeros de las jaulas de proteína pueden ser formas naturales o variantes, que incluyen sustituciones, inserciones y deleciones de aminoácidos (por ejemplo, fragmentos)

[00258] Se pueden ensamblar diferentes tipos de "cubiertas" de proteínas y cargarlas con diferentes tipos de materiales. Se pueden producir jaulas de proteína utilizando proteína(s) de cubierta viral (por ejemplo, de la cubierta de proteína del virus del moteado clorótico del caupí), así como proteínas no virales (por ejemplo, Patentes de EE. UU. Nros. 6,180,389 y 6,984.386, Publicación de Patente de EE. UU. Nro. 20040028694 y Publicación de Patente de EE. UU. Nro. 20090035389, cada una de las cuales se incorpora por referencia en el presente documento en su identidad).

[00259] Los ejemplos de jaulas de proteínas derivadas de proteínas no virales incluyen: ferritinas y apoferritinas derivadas de eucariotas o procariotas, tales como ferritinas de 12 y 24 subunidades; y proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés), tales como la clase de proteínas de choque térmico de 24 subunidades que forman un espacio

de núcleo interno, la HSP pequeña de *Methanococcus jannaschii*, la HSP Dsp dodecamérica de *E. coli*, y la proteína MrgA.

[00260] Las jaulas de proteínas pueden tener diferentes tamaños de núcleo, tales como desde alrededor de 1 nm hasta alrededor de 1000 nm, desde alrededor de 10 nm hasta alrededor de 500 nm, desde alrededor de 50 nm hasta alrededor de 200 nm, desde alrededor de 100 nm hasta alrededor de 150 nm, o desde alrededor de 150 nm o menos.

[00261] IV.F. Exosomas

[00262] Los exosomas son vesículas de membranas biológicas pequeñas. Los exosomas se han utilizado para transportar diversas cargas, incluidas moléculas pequeñas, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. Los exosomas generalmente varían en tamaño de alrededor de 30 nm a 100 nm y pueden ser captados por una célula y suministrar su carga (por ejemplo, el casete de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polinucleótido de ARN comprende una secuencia de direccionamiento de α -sinucleína). Las cargas pueden asociarse con la estructura de la superficie del exosoma o pueden encapsularse dentro de la bicapa del exosoma.

[00263] Se pueden realizar diversas modificaciones a los exosomas, que facilitan el suministro de la carga y el direccionamiento celular. Las modificaciones para facilitar el suministro de la carga incluyen estructuras para asociarse con cargas tales como andamiajes de proteínas y polímeros. Las modificaciones para el direccionamiento celular incluyen el direccionamiento de ligandos y la modificación de la carga superficial. Las publicaciones que describen la producción, modificación y uso de exosomas para el suministro de diferentes cargas incluyen Munagala et al., Cancer Letters (2021), 505, 58; Fu et al., (2020) NanoImpact 20, 100261; y Dooley et al., (2021) Molecular Therapy 29 (5), 1729 (cada uno de los cuales se incorpora por la presente como referencia en su totalidad).

V. Composiciones farmacéuticas

[00264] Las composiciones farmacéuticas se pueden utilizar para facilitar el almacenamiento y/o el suministro de un agente que se administra a un sujeto. En ciertas formas de realización, la composición farmacéutica comprende: (a) un polinucleótido de ARN que comprende una secuencia dirigida al ARNm de α -sinucleína, (b) una dupla de ARN inhibidor opcionalmente modificado dirigida al ARNm de α -sinucleína, (c) un polinucleótido, casete de expresión o ácido nucleico viral recombinante que comprende una secuencia que codifica una secuencia de direccionamiento al ARNm de α -sinucleína, o (d) un vehículo de suministro que comprende (a), (b) o (c); y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[00265] La referencia a “aceptable desde el punto de vista farmacéutico” indica que los componentes no causan efectos biológicos indeseables sustanciales en la cantidad utilizada. Los portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico pueden contener diferentes componentes, tales como uno o más excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico, tales como una sal, azúcar, tampón, solvente, conservante, proteína y surfactante. Un excipiente particular puede tener más de una función. Se proporcionan ejemplos de excipientes y portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico que se pueden usar para vectores virales, por ejemplo, en las Publicaciones de Patente Internacional Nros. WO2021/071835 y WO2024/138129 (incorporadas en la presente solicitud como referencia en su totalidad).

[00266] Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para que sean compatibles con una vía particular de administración o suministro. Las composiciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones o emulsiones acuosas y no acuosas, cuyas preparaciones son típicamente estériles y pueden ser isotónicas con la sangre del receptor previsto. Ejemplos ilustrativos incluyen agua, solución salina tamponada, solución de Hanks, solución de Ringer, dextrosa, fructosa, etanol, aceites vegetales, animales y sintéticos. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano.

[00267] En una forma de realización, la composición farmacéutica contiene una formulación capaz de inyectarse en un sujeto. Ejemplos de componentes de formulación inyectables incluyen soluciones salinas isotónicas y estériles, sales (por ejemplo, fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y mezclas de dichas sales), solución salina tamponada, azúcares (por ejemplo, dextrosa) y agua para inyección. Las composiciones farmacéuticas incluyen composiciones secas, por ejemplo, liofilizadas que, luego de la adición de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones adecuadas para la administración.

[00268] Además, las suspensiones se pueden preparar como suspensiones de inyección de aceite adecuadas. Los solventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como el aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como el oleato de etilo o los triglicéridos, o liposomas. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad del compuesto de manera de facilitar la preparación de soluciones concentradas.

[00269] Una “cantidad eficaz” o “cantidad suficiente” se refiere a una cantidad que proporciona un efecto indicado o deseado. La cantidad eficaz se puede administrar, en dosis únicas o múltiples, sola o en combinación, con una o más composiciones

adicionales (por ejemplo, agentes terapéuticos o inmunosupresores adicionales), tratamientos, protocolos o regímenes terapéuticos; y proporcionar una respuesta a largo o corto plazo.

[00270] Las composiciones farmacéuticas que comprenden transgenes que codifican un polinucleótido de ARN que se dirige al ARNm de α -sinucleína se pueden suministrar a un sujeto, de modo que se permita la producción del polinucleótido codificado. El suministro puede ser *in vivo* o *ex vivo*. En ciertas formas de realización, las composiciones farmacéuticas comprenden suficiente material genético para permitir que un receptor produzca una cantidad terapéuticamente eficaz en el sujeto.

[00271] Una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad que provoca la respuesta biológica o medicinal deseada o indicada en un sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar en función de los síntomas observados y/o mediante el uso de biomarcadores asociados con una enfermedad o un trastorno particular. La selección de una dosis eficaz particular se puede optimizar teniendo en cuenta diferentes factores, que incluyen la enfermedad que se va a tratar o prevenir, los síntomas implicados, la enfermedad o el trastorno objetivo, la seguridad y eficacia en modelos animales, la masa corporal del paciente y el estado inmunitario del paciente. La dosis óptima que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o del trastorno, y se puede evaluar de acuerdo con las circunstancias del paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis y respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de modelos animales.

[00272] En ciertas formas de realización, una composición farmacéutica que comprende un vector de rAAV comprende cápsides de AAV vacías. En ciertas formas de realización, en una composición farmacéutica que comprende vectores de rAAV y cápsides de AAV vacías, la relación entre las cápsides de AAV vacías y el vector de rAAV está dentro o entre alrededor de 100:1-50:1, de alrededor de 50:1-25:1, de alrededor de 25:1-10:1, de alrededor de 10:1-1:1, de alrededor de 1:1-1:10, de alrededor de 1:10-1:25, de alrededor de 1:25-1:50, o de alrededor de 1:50-1:100. En cierta forma de realización, la relación de las cápsides de AAV vacías al vector de rAAV es alrededor de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, o 10:1.

[00273] Ejemplos y guías adicionales de composiciones farmacéuticas y sistemas de suministro se proporcionan, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2020) 23th ed., University of the Science in Philadelphia, publicado por Elsevier; The Merck Index (2013) 15th ed., Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993), Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.; y Ansel y

Stoklosa, Pharmaceutical Calculations (2001) 11th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

VI. Administración y tratamiento

[00274] Los polinucleótidos de ARN que comprenden una secuencia inhibidora dirigida a la α -sinucleína se pueden utilizar en métodos para reducir la expresión de α -sinucleína y/o tratar una enfermedad o un trastorno de sinucleinopatía en un sujeto. Dichos métodos pueden, por ejemplo, comprender la administración de (a) un polinucleótido de ARN que comprende una secuencia dirigida al ARNm de α -sinucleína, (b) una dupla de ARN inhibidor opcionalmente modificado dirigido al ARNm de α -sinucleína, (c) un polinucleótido, casete de expresión o ácido nucleico viral recombinante que comprende una secuencia que codifica para una secuencia dirigida al ARNm de α -sinucleína o (d) un vehículo de suministro que comprende (a), (b) o (c) y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

[00275] El tratamiento se puede administrar a un sujeto, preferentemente, un sujeto humano, para proporcionar un tratamiento profiláctico que reduzca la probabilidad o gravedad de una enfermedad o de un trastorno, y/o que trate una enfermedad o un trastorno diagnosticado. El tratamiento de una enfermedad o trastorno diagnosticado incluye la mejora de uno o más síntomas y/o el retraso de la aparición de uno o más síntomas. En ciertas formas de realización, el agente terapéutico particular, la vía de administración y/o la composición farmacéutica se seleccionan teniendo en cuenta la enfermedad o el trastorno particular que se está tratando.

[00276] Los sujetos que padecen una enfermedad o un trastorno particular, o que tienen un mayor riesgo de padecer una enfermedad o un trastorno particular, pueden identificarse, por ejemplo, en función de los síntomas, α -sinucleína, biomarcadores y/o marcadores genéticos. El tratamiento puede llevarse a cabo, por ejemplo, en sujetos que tienen un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad o un trastorno de sinucleinopatía. Los ejemplos de marcadores incluyen sustituciones de SNCA A53T y SNCA A30P (Er et al., Biochem Soc Trans. 27 de febrero de 2023; 51 (1): 245-257, incorporado en la presente solicitud como referencia en su totalidad).

[00277] En ciertas formas de realización, el diagnóstico implica un ensayo de amplificación de semillas de α -sinucleína (Siderowf et al., Lancet Neurol. 2023 mayo; 22 (5): 407-417, incorporado en la presente solicitud como referencia en su totalidad).

[00278] En ciertas formas de realización, el tratamiento es para una enfermedad o un trastorno con cuerpos de Lewy. En otras formas de realización, la enfermedad o trastorno con cuerpos de Lewy es enfermedad de Parkinson, demencia de la enfermedad de

Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, distrofia neuroaxonal infantil, distrofia neuroaxonal atípica, distonía-parkinsonismo de inicio en la edad adulta, parkinsonismo autosómico recesivo de inicio temprano, neurodegeneración asociada a POLG, Niemann-Pick tipo C1 o enfermedad de Krabbe.

[00279] Ciertas formas de realización están dirigidas al tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la demencia de la enfermedad de Parkinson o la demencia con cuerpos de Lewy. Los síntomas de la enfermedad de Parkinson incluyen temblor en reposo, bradiquinesia, dificultades del habla y la marcha, hipofonía, distrofia muscular, inestabilidad y deformidades posturales. La enfermedad de Parkinson también puede estar acompañada de síntomas no motores, tales como movimiento ocular rápido, trastorno de la conducta del sueño (RBD), hiposmia, depresión e insuficiencia autonómica. Los síntomas en etapa temprana incluyen dolor, rigidez o entumecimiento en las extremidades, bradiquinesia, temblores y una disminución en la expresión facial. Los síntomas en etapa tardía incluyen fluctuaciones motoras, disquinesia, congelamiento de la marcha y caídas. El diagnóstico inicial puede sustentarse en la evaluación de las características clínicas de la historia clínica y el examen del paciente. La capacidad de respuesta a los agentes dopaminérgicos también puede usarse en el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson a lo largo del tiempo. La mayoría de los pacientes con enfermedad de Parkinson finalmente desarrollan demencia (Koga et al. *Molecular Neurodegeneration* (2021) 16:83; y Lee et al. *Neuroimmunol Neuroinflammation* 2021; 8: 222-44, ambos de los cuales se incorporan aquí en su totalidad).

[00280] Los síntomas de la demencia con cuerpos de Lewy incluyen demencia, cognición fluctuante, alucinaciones visuales, movimiento ocular rápido, trastorno de la conducta del sueño y parkinsonismo (Koga et al. *Neurodegeneración molecular* (2021) 16:83).

[00281] En ciertas formas de realización, el diagnóstico, el seguimiento del paciente y/o las evaluaciones clínicas implican el uso de un cuestionario, una escala y/o una herramienta de evaluación utilizada por el médico en el tratamiento y la evaluación de los resultados clínicos de los trastornos del movimiento, tales como la enfermedad de Parkinson. Dichas evaluaciones de los resultados clínicos se pueden encontrar, por ejemplo, en el sitio web de International Parkinson and Movement Disorder, que se incorpora por referencia (protocolo de transferencia de hipertexto://www.movementdisorders.org/MDS/MDS-Clinical-Outcome-Assessment.htm).

[00282] En ciertas formas de realización, la progresión de la enfermedad de Parkinson se evalúa utilizando la Escala de Calificación Unificada de la Enfermedad de Parkinson de la Sociedad de Trastornos del Movimiento (MDS-UPDRS, por sus siglas en inglés)

(Goetz et al, 2023, *Mov. Disord.* 2023; 38 (2): 342-7; y Goetz et al, *Mov. Disord.* 2008; 23 (15): 2129-70, ambos de los cuales se incorporan por la presente como referencia en su totalidad).

[00283] En ciertas formas de realización, la progresión de la enfermedad de Parkinson se puede evaluar utilizando biomarcadores de imágenes. En otras formas de realización, los biomarcadores de imágenes y las técnicas para monitorear la patología y la progresión de la enfermedad de Parkinson incluyen: PET SV2A y VMAT2 para investigar cambios en la integridad de la terminal de dopamina en el caudado y el putamen; IRM estructural para investigar la pérdida volumétrica en la sustancia negra, así como el mapeo de susceptibilidad cuantitativa para evaluar el cambio estructural en función de la acumulación de hierro en la sustancia negra; biomarcadores de biofluidos para rastrear la progresión de la enfermedad, tales como los niveles en el LCR de α -Syn total, tau total y fosforilada, dopa descarboxilasa y ácido 3,4 dihidroxifenilacético; y la reducción de la proteína α -Syn se puede medir en exosomas derivados de neuronas aislados del plasma.

[00284] En una forma de realización adicional para la progresión de la enfermedad, se puede utilizar una aplicación móvil DHT de Roche para la enfermedad de Parkinson, que incluye un conjunto de evaluaciones de resultados de rendimiento ("PerfO") diseñadas para medir la progresión de las principales características motoras en personas con enfermedad de Parkinson en etapa temprana (Essioux et al., "Las tecnologías de salud digitales pueden reducir el tamaño de la muestra y permitir un ensayo clínico de prueba de concepto más breve en la enfermedad de Parkinson". Presentado en la 17ª Conferencia Internacional AD/PD 2023 sobre enfermedades de Alzheimer y Parkinson y trastornos neurológicos relacionados; 28 de marzo-1 de abril de 2023; Gotemburgo, Suecia). La DHT proporciona una medición de las deficiencias subyacentes a los síntomas motores centrales de la enfermedad de Parkinson, que incluyen bradiquinesia de la parte superior e inferior del cuerpo, disfunción de la marcha, inestabilidad postural, temblor y dificultades del habla y la voz. Estos pueden derivarse de 7 pruebas motoras DHT PerfO: giro de la mano, destreza, giro en U, temblor en reposo, temblor postural, habla y voz.

[00285] Ciertas formas de realización están dirigidas al tratamiento de la MSA. La MSA se caracteriza por una combinación variable de insuficiencia autonómica, parkinsonismo que no responde a la levodopa (L-DOPA), ataxia cerebelosa, signos piramidales y síntomas no motores. Los síntomas no motores pueden incluir RBD, trastornos respiratorios durante el sueño, disfagia, disfonía grave y disartria (Koga et al. *Molecular Neurodegeneration* (2021) 16:83).

[00286] La administración puede ser por diferentes vías, tales como subcutánea, epidérmica, intradérmica, intratecal, intraorbitaria, intramucosa, intranasal, intraperitoneal, intravenosa, intrapleurar, intraarterial, intracavitaria, oral, a través de la vena porta, intramuscular, intraparenquimatosa, intracisternal o intraventricular. En ciertas formas de realización, la administración a un paciente es por infusión en un portador farmacéutico.

[00287] En ciertas formas de realización, la administración es directa al SNC, por ejemplo, administración intraparenquimatosa, intracisternal o intraventricular.

[00288] En ciertas formas de realización, la vía de administración y/o el vector se dirigen al caudado-putamen y/o a la sustancia negra. En otras formas de realización, se dirigen al caudado-putamen + sustancia negra, para tratar MSA; o se dirigen a la sustancia negra para tratar la enfermedad de Parkinson.

[00289] En ciertas formas de realización, la administración es directa al SNC, por ejemplo, mediante administración intraparenquimatosa, intracisternal o intraventricular.

[00290] En ciertas formas de realización, la administración al SNC se lleva a cabo mediante administración directa al cerebro utilizando una aguja o un catéter (por ejemplo, Publicación Internacional Nro. WO 2021/108809, Cohen-Pferrer et al., Pediatric Neurology 67 (2017) 23-35; y Patente de EE. UU. Nro. 10369329; cada una de las cuales se incorpora por la presente como referencia en su totalidad).

[00291] En ciertas formas de realización, la administración al SNC se realiza mediante suministro mejorado por convección. El suministro mejorado por convección comprende la exposición quirúrgica del cerebro, la colocación de un catéter directamente en el área objetivo, seguida de la infusión de un agente terapéutico (Publicación de Patente de EE. UU. Nro. 2022/010001; y Debinski et al. (2009) Expert Rev Neurother. 9(10): 1519-27; ambas se incorporan por la presente como referencia en su totalidad).

[00292] En ciertas formas de realización, la administración intraparenquimatosa se realiza a través de infusiones IP al caudado y al putamen, o a la sustancia negra, mediante infusión bilateral utilizando suministro mejorado por convección. En otras formas de realización, la administración emplea infusiones estereotácticas bilaterales. En otras formas de realización, la administración se lleva a cabo bajo guía de IRM, donde el rAAV se proporciona en una formulación que comprende un agente de obtención de imágenes. Hay diferentes dispositivos disponibles para la infusión, incluidos, por ejemplo, la cánula ClearPoint® SmartFlow mediante suministro mejorado por convección (CED) bajo guía de IRM y el sistema de navegación neurológica ClearPoint® Neuro Navigation System.

[00293] En ciertas formas de realización, después de la infusión IP, se mide la presencia de ácido nucleico inhibidor codificado por un transgén en el líquido cefalorraquídeo

(LCR). La presencia de ácido nucleico inhibidor en el LCR se puede monitorear en diferentes puntos temporales, por ejemplo, al inicio y en los meses 3, 6, 12, 18 y 24. En otra forma de realización, se administra un vector que codifica miR5, y se mide la presencia de miR5 en el líquido cefalorraquídeo (LCR). La medición del ácido nucleico inhibidor en el LCR se puede utilizar, por ejemplo, como un marcador de durabilidad.

[00294] Los dispositivos, sistemas y técnicas de suministro al SNC también incluyen los descritos, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. Nro. 8128600, la Publicación de Patente de EE. UU. Nro. 2020/0324089, la Patente de EE. UU. Nro. 11129643, la Patente de EE. UU. Nro. 11154377, la Publicación de Patente de EE. UU. Nro. 2021/0343397, la Publicación de Patente de EE. UU. Nro. 2021/0282866, la Patente de EE. UU. Nro. 9572928, la Patente de EE. UU. Nro. 8337458, la Patente de EE. UU. Nro. 10722265, y la Publicación de Patente de EE. UU. Nro. 2021/214749, cada una de las cuales se incorporan como referencia en el presente documento en su totalidad.

[00295] La administración al SNC también se puede llevar a cabo utilizando técnicas que facilitan el transporte a través de la barrera hematoencefálica, incluida la interrupción de la barrera hematoencefálica y el uso de portadores para la barrera hematoencefálica (Chen et al., (2021) *Journal of Controlled Release* 333, 129-138, y Bellettato y Scrapa, *Italian Journal of Pediatrics* (2018) 44 (Supl. 2): 131; Haumann et al., (2020) *CNS Drugs* 34, 1121-1131; y Cammalleri et al., *J. Clin. Neurophysiol.* (2020) Mar; 37 (2): 104-117, cada uno de los cuales se incorpora por la presente como referencia en su totalidad). Las técnicas que facilitan el cruce de la barrera hematoencefálica se pueden utilizar en vehículos de suministro virales y no virales.

[00296] En ciertas formas de realización, el suministro al SNC se logra utilizando técnicas y/o agentes que facilitan el cruce de la barrera hematoencefálica.

[00297] En ciertas formas de realización, el suministro al SNC se logra mediante el uso de técnicas para eludir la barrera hematoencefálica.

[00298] En ciertas formas de realización, el suministro al SNC se logra mediante la administración directa al cerebro.

[00299] Las técnicas que facilitan el transporte a través de la barrera hematoencefálica incluyen la interrupción de la barrera hematoencefálica, el uso de portadores para la barrera hematoencefálica y el uso de vectores capaces de cruzar la barrera hematoencefálica. Las técnicas generales que facilitan el cruce de la barrera hematoencefálica se pueden utilizar en vehículos de suministro virales y no virales. Además, los vehículos de suministro particulares, tales como ciertos serotipos de AAV, pueden facilitar el cruce de la barrera hematoencefálica (Chen et al., (2021) *Journal of Controlled Release* 333, 129-138; Bellettato y Scrapa, *Italian Journal of Pediatrics* (2018)

44 (Supl. 2): 131; Haumann et al., (2020) CNS Drugs 34, 1121-1131; Cammalleri et al., J. Clin. Neurophysiol. (2020) Mar; 37 (2): 104-117; y Fischell y Fishman, Front. Neurosci., 23 de septiembre de 2021, volumen 15, artículo 747726, doi: 10.3389/fnins.2021.747726; cada uno de los cuales se incorpora por la presente como referencia en su totalidad).

[00300] En ciertas formas de realización, se utiliza una cápside de AAV que facilita la entrada al SNC. Se proporcionan ejemplos de dichas cápsides en Chen *et al.*, (2021) Journal de Controlled Release 333, 129-138 (p. ej., AAV9, AAVrh.10, AAVrh.8, AAVHSC, AAV-B1, AAV-AS, y AAV1/rh.10), Patente de EE. UU. Nro. 9,585,971, Publicaciones de Patente de EE. UU. Nros. US2021/214749 y US2021/107947, Patente de EE. UU. Nro. 11,518,787, y Publicación de Patente Internacional Nro. WO2019/158619.

[00301] En ciertas formas de realización, la cápside de AAV comprende una inserción que se dirige a células del SNC, tales como las presentes en el caudado, y/o el putamen, y/o la sustancia negra, y/o el área tegmental ventral. Se proporcionan ejemplos de secuencias de direccionamiento en la Publicación de Patente de EE. UU. Nro. US2021/214749 y la Publicación de Patente Internacional Nro. WO2019/158619, ambas incorporadas en la presente solicitud como referencia en su totalidad. Los péptidos de direccionamiento se pueden insertar en diferentes ubicaciones de la cápside de AAV. En ciertas formas de realización, los sitios de inserción de la cápside de AAV están fuera del dominio de lipasa de VP1 y fuera de la proteína activadora del ensamblaje (AAP).

[00302] En ciertas formas de realización, la cápside de AAV comprende una inserción de péptido de direccionamiento que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en la Publicación de Patente de EE. UU. Nro. US2021/214749 o la Publicación de Patente Internacional Nro. WO2019/158619. En otras formas de realización, la cápside es una cápside de AAV2 que comprende una inserción de péptido que comprende la SEQ ID NO: 279, 280, 281 o 282; y la inserción está centrada alrededor del residuo de aminoácido 587 de VP1 de AAV2, o la inserción está entre N587 y R588 de la proteína de cápside de VP1 de AAV2.

[00303] En ciertas formas de realización, el suministro al SNC implica el uso de ultrasonido focalizado y microburbujas. El ultrasonido focalizado combinado con microburbujas puede alterar temporalmente la barrera hematoencefálica, de modo de facilitar la entrada de agentes terapéuticos, incluidos los vehículos de suministro de transgenes. El ultrasonido focalizado puede depositar energía en un área seleccionada de la anatomía humana, y su uso puede facilitarse mediante la guía de imágenes por resonancia magnética (IRM). Se pueden utilizar diferentes tipos de microburbujas con ultrasonido focalizado para interrumpir temporalmente la barrera hematoencefálica. (Cammalleri et al., J Clin Neurophysiol. (2020) Mar; 37 (2): 104-117; Noroozian et al.,

Methods Mol Biol. (2019) 1950, 177-197; Patente de EE. UU. Nro. 10,322,178; y Publicación de Patente Internacional Nro. WO 2019/113538; cada una de las cuales se incorpora por la presente como referencia en su totalidad).

[00304] Las microburbujas se inyectan típicamente por vía intravenosa. En ciertas formas de realización, las microburbujas son Definity™ (Lantheus Medical Imaging, North Billerica, MA, EE. UU). que contienen microesferas lipídicas de perflutrén (media de diámetro de 1,1 a 3,3 μm con un diámetro máximo de 20 μm); SonoVue™ (Bracco Imaging, Milán, Italia), una suspensión de microesferas de fosfolípidos que contienen gas hexafluoruro de azufre (media de diámetro de $\sim 2,5 \mu\text{m}$; más del 90 % de las burbujas son más pequeñas que 8 μm); y Optison™ (GE Healthcare, Princeton, NJ, EE. UU)., compuestas por una suspensión estéril apirógena de microesferas de albúmina sérica humana con perflutrén (media de diámetro de 3,0 a 4,5 μm con un diámetro máximo de 32 μm) (ver Cammalleri et al., J. Clin. Neurophysiol. (2020) Mar; 37 (2): 104-117, incorporado en este documento como referencia en su totalidad).

[00305] En ciertas formas de realización, las microburbujas se producen y se administran como se describe en la Patente de EE. UU. Nro. 10,322,178, incorporada en la presente como referencia en su totalidad.

[00306] En ciertas formas de realización, los vectores de rAAV se seleccionan o se diseñan para facilitar el uso con el suministro de ultrasonido focalizado (Kofed et al., Journal of Controlled Release 351 (2022) 667-680; Kofed et al., Molecular Therapy: Methods & Clinical Development Vol. 27 de diciembre de 2022, 167-195; Publicación de Patente de EE. UU. Nro. 2023/0047753; y Publicación de Patente Internacional Nro. WO2023/0044161; cada una de las cuales se incorpora como referencia en el presente documento en su totalidad).

[00307] En ciertas formas de realización, los vectores de rAAV comprenden un péptido de direccionamiento acústico descrito en la Publicación de Patente de EE. UU. Nro. 2023/0047753 y/o la Publicación de Patente Internacional Nro. WO2023/004416.

[00308] En ciertas formas de realización, se utiliza la administración intranasal para lograr la administración del vector al SNC. El suministro intranasal evita la barrera hematoencefálica y reduce la exposición sistémica. En otras formas de realización, el suministro intranasal comprende el uso de ultrasonido focalizado y microburbujas. Se ha indicado que el uso de ultrasonido focalizado y microburbujas en combinación con el suministro intranasal mejora la penetración de agentes terapéuticos que ya se encuentran en el espacio perivascular más allá de la barrera hematoencefálica (Ye et al., The Lancet (2022) Oct: Vol 84: 1-14, incorporado en la presente solicitud como referencia en su totalidad).

[00309] En ciertas formas de realización que proporcionan la expresión en el SNC, el polinucleótido que expresa un polinucleótido de ARN comprende el promotor PGK, el promotor CBh y/o el promotor EF1- α .

[00310] Las dosis óptimas pueden variar de acuerdo con diferentes factores, tales como el tratamiento particular y el criterio de valoración deseado. La cantidad, el número, la frecuencia o la duración de la dosis se pueden aumentar o reducir proporcionalmente, teniendo en cuenta los efectos secundarios adversos, las complicaciones u otros factores de riesgo del tratamiento o la terapia y el estado del sujeto.

[00311] Una “forma de dosificación unitaria” se refiere a una unidad físicamente discreta que contiene una cantidad eficaz predeterminada de ingrediente activo en combinación con un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Las formas de dosificación unitaria se pueden proporcionar dentro de, por ejemplo, ampollas y viales, que pueden incluir un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o una composición en un estado liofilizado o secado por congelación. En el caso de un estado liofilizado o secado por congelación, se puede agregar un portador líquido estéril antes de la administración. Las formas de dosificación unitaria individuales se pueden incluir en recipientes o equipos multidosis.

[00312] Una “cantidad eficaz/efectiva” logra el efecto deseado o indicado. Por ejemplo, una cantidad eficaz/efectiva para el tratamiento disminuye uno o más síntomas adversos, reduce la probabilidad de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o un trastorno, o reduce la progresión de la enfermedad o el trastorno. Las cantidades eficaces/efectivas preferidas para el tratamiento son efectivas para disminuir múltiples o todos los síntomas adversos.

[00313] Como la α -Syn es una proteína de origen natural, una cierta cantidad de la proteína puede ser importante o útil para ciertas funciones. Si bien las funciones biológicas de la α -Syn no están bien caracterizadas, los animales sin α -Syn en los que se ha seleccionado experimentalmente el gen SNCA se desarrollan normalmente y permanecen sanos durante toda su vida (Chandra et al., Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101 (41): 14966-71), aunque se han informado déficits de aprendizaje sutiles en una cepa de ratones deficientes en α -Syn (Kokhan et al., Behav Brain Res 2012; 231 (1): 226-30). En estudios poblacionales, los individuos identificados con una delección de un alelo SNCA carecían de características de parkinsonismo o demencia, lo que contradice un efecto pronunciado de pérdida de función de α -Syn (Blauwendraat et al., UK Biobank. Neurobiol Dis 2021; 148: 105182; y Burré et al., Mov Disord. 2024 Jun 30. doi: 10.1002/mds.29897).

[00314] Estudios no clínicos en roedores y NHP sugieren que la reducción del ARNm de SNCA (hasta 90 %) y la proteína α -Syn (hasta 70 %) es bien tolerada durante 12 meses, y no causó neurodegeneración dopaminérgica o déficits funcionales en la proyección dopaminérgica ascendente (Zharikov et al., Neurobiol. Dis. 2019; 125: 146-53; y Zharikov et al., J. Clin. Invest. 2015; 125 (7): 2721-35). En NHP, el suministro intratecal repetido de oligonucleótidos antisentido (ASO, por sus siglas en inglés) produjo un bloqueo por reducción de hasta el 70 % de la transcripción de SNCA y la proteína α -Syn en el cerebro, sin efectos adversos hasta 90 días (Cole et al., JCI Insight 2021; 6 (5): e135633). Las inmunoterapias destinadas a reducir los niveles de α -Syn en el cerebro han demostrado un perfil de seguridad favorable para un mayor desarrollo (Jankovic et al., JAMA Neurol. 2018; 75 (10): 1206-14; y Pagano N. Engl. J. Med. 2022; 387 (5): 421-32), lo que indica que la reducción de α -Syn en humanos adultos puede ser tolerable.

[00315] En ciertas formas de realización, se administra a un sujeto una composición farmacéutica que comprende un vector viral o no viral, en una dosis adecuada para disminuir la expresión de α -sinucleína o la α -sinucleína. En diferentes formas de realización, la α -sinucleína se reduce en lo menos 15 %, por lo menos 20 % por lo menos 50 %, por lo menos 60 %, o por lo menos 70 %; y/o α -sinucleína o la expresión de α -sinucleína se reduce en por lo menos 20 %, por lo menos 50 %, por lo menos 60 %, por lo menos 70 %, o alrededor de 30 % a alrededor de 70 %, o alrededor de 30 % a alrededor de 60 %, o alrededor de 25 % a alrededor de 70 %; en relación con los niveles iniciales en la región cerebral transducida (p. ej., sustancia negra).

[00316] En diferentes formas de realización, una dosificación adecuada es de alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg de vector por kg de peso corporal de un sujeto, alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 0,1 mg/kg de vector por kg de peso corporal de un sujeto, alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 1,0 mg/kg de vector por kg de peso corporal de un sujeto, o alrededor de 1,0 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg de vector por peso corporal de un sujeto.

[00317] Generalmente, las dosis de vector de rAAV varían de por lo menos 1×10^8 genomas de vector por kilogramo (vg/kg) del peso del sujeto, o más, p. ej., 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} o 1×10^{14} , o más, genomas de vector por kilogramo (vg/kg) del peso del sujeto, a fin de lograr un efecto terapéutico. En diferentes formas de realización, la dosis de rAAV es alrededor de 5×10^{11} rAAV vg/kg o más de alrededor de 5×10^{11} rAAV vg/kg; alrededor de 1×10^{12} rAAV vg/kg o más de alrededor de 1×10^{12} rAAV vg/kg; alrededor de 2×10^{12} rAAV vg/kg o más de alrededor de 2×10^{12} rAAV vg/kg; alrededor de 3×10^{12} rAAV vg/kg o más de alrededor de 3×10^{12} rAAV vg/kg; alrededor de 4×10^{12} rAAV vg/kg o más de alrededor de 4×10^{12} rAAV vg/kg; alrededor de 5×10^{12} rAAV vg/kg o más

de alrededor de 5×10^{12} rAAV vg/kg; alrededor de 1×10^{13} rAAV vg/kg o más de alrededor de 1×10^{13} rAAV vg/kg; alrededor de 2×10^{13} rAAV vg/kg o más de alrededor de 2×10^{13} rAAV vg/kg; alrededor de 3×10^{13} rAAV vg/kg o más de alrededor de 3×10^{13} rAAV vg/kg; alrededor de 4×10^{13} rAAV vg/kg o más de alrededor de 4×10^{13} rAAV vg/kg; alrededor de 5×10^{13} rAAV vg/kg o más de alrededor de 5×10^{13} rAAV vg/kg; alrededor de 6×10^{13} rAAV vg/kg o más de alrededor de 6×10^{13} rAAV vg/kg.

[illegible]

alrededor de 3×10^{13} rAAV vg/kg; un rango de dosis de alrededor de 3×10^{13} a alrededor de $3,5 \times 10^{13}$ rAAV vg/kg; un rango de dosis de alrededor de $3,5 \times 10^{13}$ a alrededor de 4×10^{13} rAAV vg/kg; un rango de dosis de alrededor de 4×10^{13} a alrededor de $4,5 \times 10^{13}$ rAAV vg/kg; un rango de dosis de alrededor de $4,5 \times 10^{13}$ a alrededor de 5×10^{13} rAAV vg/kg; un rango de dosis de alrededor de 5×10^{13} a alrededor de $5,5 \times 10^{13}$ rAAV vg/kg; un rango de dosis de alrededor de $5,5 \times 10^{13}$ a alrededor de 6×10^{13} rAAV vg/kg; un rango de dosis de alrededor de 6×10^{13} a alrededor de 1×10^{14} rAAV vg/kg.

[00319] En ciertas formas de realización, rAAV vg/kg se administran en una dosis de alrededor de 5×10^{11} vg/kg, alrededor de 6×10^{11} vg/kg, alrededor de 7×10^{11} vg/kg, alrededor de 8×10^{11} vg/kg, alrededor de 9×10^{11} vg/kg, alrededor de 1×10^{12} vg/kg, alrededor de 2×10^{12} vg/kg, alrededor de 3×10^{12} vg/kg, alrededor de 4×10^{12} vg/kg, alrededor de 5×10^{12} vg/kg, alrededor de 6×10^{12} vg/kg, alrededor de 7×10^{12} vg/kg, alrededor de 8×10^{12} vg/kg, alrededor de 9×10^{12} vg/kg, alrededor de 1×10^{13} vg/kg, alrededor de 2×10^{13} vg/kg, alrededor de 3×10^{13} vg/kg, alrededor de 4×10^{13} vg/kg, alrededor de 5×10^{13} vg/kg, o alrededor de 6×10^{13} vg/kg.

[00320] En ciertas formas de realización, la dosis y los rangos de dosis para otros vectores virales son los que se proporcionan en el presente documento con respecto a rAAV. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, la dosis y el rango de dosis para vectores de adenovirus recombinantes, vectores de retrovirus recombinantes (por ejemplo, lentivirus) y vectores de virus del herpes simple recombinantes son los mismos que los ilustrados anteriormente con respecto a rAAV.

[00321] En ciertas formas de realización, la dosis del genoma del vector proporcionada es en función de la región diana, tal como el caudado, el putamen y/o la sustancia negra (SN). En otras formas de realización, la dosis proporcionada es 3×10^8 vg/región cerebral diana (TBR, por sus siglas en inglés) a 3×10^{11} vg/TBR, alrededor de 3×10^8 vg/TBR, alrededor de 3×10^9 vg/TBR, alrededor de 3×10^{10} vg/TBR, o alrededor de 3×10^{11} vg/TBR; o 3×10^8 vg/SN a 3×10^{11} vg/SN, alrededor de 3×10^8 vg/SN, alrededor de 3×10^9 vg/SN, alrededor de 3×10^{10} vg/SN, o alrededor de 3×10^{11} vg/SN.

[00322] En ciertas formas de realización, las construcciones de polinucleótidos, vectores virales y vectores no virales descritos en este documento se administran en combinación con compuestos o tratamientos adicionales para una enfermedad o un trastorno particular; y/o en combinación con un compuesto que disminuye una respuesta inmunitaria generada contra el polinucleótido, el vehículo de suministro y/o la proteína producida. Se pueden proporcionar compuestos o tratamientos adicionales en diferentes modalidades, tales como la administración por separado; y pueden administrarse o realizarse antes o después de la administración de las construcciones de polinucleótidos,

los vectores virales y vectores no virales descritos en este documento, o sustancialmente de manera contemporánea con estos.

[00323] En ciertas formas de realización, la administración de las construcciones de polinucleótidos, los vectores virales y vectores no virales descritos en este documento se realiza en combinación con uno o más tratamientos adicionales para una enfermedad o trastorno de sinucleinopatía. Los tratamientos para la enfermedad de Parkinson incluyen, por ejemplo, medicamentos dopaminérgicos (p. ej., levodopa); inhibidores y antagonistas de la monoaminoxidasa; y factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF) (Lee et al. *Neuroimmunol. Neuroinflammation* 2021; 8: 222-44, incorporado en la presente solicitud como referencia en su totalidad).

[00324] En ciertas formas de realización, el tratamiento se lleva a cabo en combinación con (a) uno o más compuestos adicionales utilizados para tratar la enfermedad de Parkinson seleccionados de un inhibidor de la dopamina descarboxilasa/precursor de la dopamina (p. ej., carbidopa-levodopa); un inhibidor de la catecol-o-metiltransferasa, inhibe la descomposición de la levodopa (p. ej., entacapona, tolcapona u opicapona); un agonista de la dopamina (p. ej., pramipexol, ropinirol, apomorfina o rotigotina); un inhibidor de la monoamino oxidasa-B, inhibe la descomposición de la dopamina (p. ej., selegilina, rasagilina o safinamida); un inhibidor de mecanismo mixto, que incluye el antagonismo del N-metil-D-aspartato (p. ej., amantadina y memantina); un antagonista de la adenosina 2A (p. ej., istradefilina); y/o un anticolinérgico (p. ej., trihexifenidilo y benztropina) (ver, p. ej., protocolo de transferencia de hipertexto// www.apdaparkinson.org/what-is-parkinsons/treatment-medication/medication); y/o (b) el paciente ha estado o está recibiendo tratamiento con (a). En otra forma de realización, el paciente ha estado o está recibiendo tratamiento con (a) y tiene una respuesta reducida al tratamiento que implica (a).

[00325] En ciertas formas de realización, el tratamiento se lleva a cabo en combinación con (a) uno o más compuestos adicionales utilizados para tratar la demencia con cuerpos de Lewy seleccionados de un inhibidor de la colinesterasa (p. ej., rivastigmina, donepezilo y galantamina), antagonistas de N-metil-D-aspartato (p. ej., memantina y amantadina), inhibidor de la dopamina descarboxilasa/precursor de la dopamina (p. ej., carbidopa-levodopa) y antipsicóticos (p. ej., clozapina y quetiapina), y/o (b) el paciente ha estado o está recibiendo tratamiento con (a). En una forma de realización adicional, el paciente ha estado o está recibiendo tratamiento con (a) y tiene una respuesta reducida al tratamiento que implica (a).

[00326] En ciertas formas de realización, el tratamiento de la atrofia multisistémica se lleva a cabo en combinación con uno o más compuestos adicionales u otros tratamientos

dirigidos a síntomas particulares. Los ejemplos de dichos compuestos adicionales y tratamientos incluyen medicamentos para aumentar la presión arterial (p. ej., fludrocortisona, midodrina, piridostigmina y droxidopa); medicamentos que reducen los síntomas similares a los de la enfermedad de Parkinson (p. ej., levodopa y carbidopa); y medicamentos para tratar la disfunción eréctil (p. ej., sildenafil) (ver, p. ej., protocolo de transferencia de hipertexto//www.mayoclinic.org/diseases-conditions/multiple-system-atrophy/diagnosis-treatment/drc-20356157, incorporado por la presente como referencia en el presente documento).

[00327] En ciertas formas de realización, se usa un polinucleótido de ARN que comprende una secuencia inhibidora dirigida a la α -sinucleína en combinación con GDNF. En otras formas de realización, se administra GDNF o ácido nucleico que codifica para GDNF. El ácido nucleico que codifica GDNF se puede proporcionar en el mismo polinucleótido o en uno diferente, tal como el polinucleótido que codifica una secuencia inhibidora de ARN dirigida a la α -sinucleína.

[00328] En ciertas formas de realización, la administración de construcciones de polinucleótidos, vectores virales y vectores no virales descritos en este documento se realiza en combinación con un agente o régimen inmunosupresor. Dichos agentes y regímenes se pueden utilizar, según sea necesario, para lograr tolerancia inmunitaria o mitigar la respuesta inmunitaria a los polinucleótidos o vehículos de suministro proporcionados. Los ejemplos de agentes y regímenes inmunosupresores incluyen metotrexato, rituximab, gamma globulina intravenosa (IVIG), omalizumab, ImmTOR® (partícula de vacuna sintética (SVP)-rapamicina (rapamicina encapsulada en una nanopartícula biodegradable)), ImmTOR-IL™ (ImmTOR con agonista de IL-2 selectivo de Treg), agotamiento de células B, inmunoadsorción y plasmaféresis.

[00329] En ciertas formas de realización, la construcción de polinucleótido, el vector viral o vector no viral se administra junto con uno o más agentes inmunosupresores, donde uno o más agentes inmunosupresores se administran antes, sustancialmente al mismo tiempo o después de administrar la construcción de polinucleótido, el vector viral o vector no viral. En ciertas formas de realización, los uno o más agentes inmunosupresores se administran concomitantemente con la construcción de polinucleótido, el vector viral o vector no viral. En ciertas formas de realización, los uno o más agentes inmunosupresores se administran 1-12, 12-24 o 24-48 horas; o 2-4, 4-6, 6-8, 8-10, 10-14, 14-20, 20-25, 25-30, 30-50 días, o más de 50 días antes de la administración de la construcción de polinucleótido, el vector viral o vector no viral. En ciertas formas de realización, los uno o más agentes inmunosupresores se administran 1-12, 12-24 o 24-48 horas; o 2-4, 4-6, 6-8, 8-10, 10-14, 14-20, 20-25, 25-30, 30-50 días, o más de 50 días;

después de la administración de la construcción de polinucleótido, el vector viral o vector no viral.

[00330] En ciertas formas de realización, el agente inmunosupresor es un agente antiinflamatorio. En ciertas formas de realización, el agente inmunosupresor es un esteroide, por ejemplo, un corticoesteroide. En determinadas formas de realización, el agente inmunosupresor es prednisona, prednisolona, un inhibidor de la calcineurina (p. ej., ciclosporina, tacrolimus), MMF (ácido micofenólico, p. ej., CellCept®, Myfortic®), un inhibidor de CD52 (p. ej., alemtuzumab), una CTLA4-Ig (p. ej., abatacept, belatacept), un mAb anti-CD3, un mAb anti-LFA-1 (p. ej., efalizumab), un mAb anti-CD40 (p. ej., ASKP1240), un mAb anti-CD22 (p. ej., epratuzumab), un mAb anti-CD20 (p. ej., rituximab, orelizumab, ofatumumab, veltuzumab), un inhibidor del proteasoma (p. ej., bortezomib), una TACI-Ig (p. ej., atacicept), un mAb anti-C5 (p. ej., eculizumab), micofenolato, azatioprina, sirolimus everolimus, TNFR-Ig, mAb anti-TNF, tofacitinib, un mAb anti-IL-2R (p. ej., basiliximab), un mAb anti-IL-17 (p. ej., secukinumab), un mAb anti-IL-6 (p. ej., anticuerpo sirukumab contra IL-6, anticuerpo antirreceptor de IL-6 tocilizumab (Actemra®), un inhibidor de IL-10, un inhibidor de TGF-beta, un anticuerpo dirigido a células B (por ejemplo, rituximab), un inhibidor de la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR) (por ejemplo, rapamicina), una partícula de vacuna sintética (SVP™)-rapamicina (rapamicina encapsulada en una nanopartícula biodegradable), gammaglobulina intravenosa (IV IG), omalizumab, metotrexato, un inhibidor de la tirosina quinasa (p. ej., ibrutinib), ciclofosfamida, fingolimod, un inhibidor del factor activador de células B (BAFF) (p. ej., mAb anti-BAFF, p. ej., belimumab), un inhibidor de un ligando inductor de la proliferación (APRIL), un mAb anti-IL-1b (p. ej., canakinumab (Haris®)), un inhibidor de C3a, un Tregitopo (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. Nro. 10,213,496), o una combinación y/o un derivado de los mismos.

[00331] Las estrategias para reducir (superar), evitar o mitigar el efecto de la inmunidad humoral para los vectores virales, tales como los vectores de rAAV, incluyen la administración de dosis altas de vector; el uso de cápsides vacías de AAV como señuelos para adsorber anticuerpos anti-AAV; la administración de fármacos inmunosupresores para disminuir, reducir, inhibir, prevenir o erradicar la respuesta inmunitaria humoral a rAAV; el cambio del serotipo de la cápside de rAAV o el diseño de la cápside de rAAV para que sea menos susceptible a los anticuerpos neutralizantes; el uso de ciclos de intercambio de plasma para adsorber inmunoglobulinas anti-AAV, de modo de reducir así la valoración de anticuerpo anti-AAV; y el uso de técnicas de suministro tales como catéteres con balón seguidos de lavado con solución salina. Dichas estrategias se

describen, por ejemplo, en Mingozi et al., (2013) Blood, 122: 23-36. Se pueden utilizar técnicas y estrategias similares para otros tipos de vectores virales.

[00332] Las cápsides vacías utilizadas como sondas señuelo, proporcionadas en la misma formulación o en una formulación separada a la del vector de rAAV, se pueden proporcionar en diferentes relaciones con respecto a los vectores virales. En ciertas formas de realización, las sondas señuelo se proporcionan simultáneamente con el rAAV. Las cantidades de cápsides vacías administradas se pueden calibrar en función de la cantidad (valoración) de anticuerpos producidos en un sujeto particular. En ciertas formas de realización, la relación de las cápsides vacías de AAV con respecto al vector rAAV está dentro o entre alrededor de 100:1-50:1, de alrededor de 50:1 a 25 a 1, de alrededor de 25:1 a 10:1, de alrededor de 10:1 a 1:1, de alrededor de 1:1 a 1:10, de alrededor de 1:10 a 1:25, de alrededor de 1:25 a 1:50, o de alrededor de 1:50 a 1:100. En aspectos particulares, la relación de las cápsides de AAV vacías administradas, con respecto al vector de rAAV es alrededor de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, o 10:1. Preferentemente, el serotipo de las cápsides vacías es el mismo que el serotipo de rAAV.

[00333] En ciertas formas de realización, los vehículos virales se suministran utilizando métodos que evitan el torrente sanguíneo y los anticuerpos virales. Los ejemplos de dichas técnicas incluyen el suministro al hígado a través de la arteria hepática; y el suministro a través de la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE, por sus siglas en inglés) al hígado. Otros sistemas ductales, tales como los conductos de la glándula submandibular, también se pueden utilizar como portales para suministrar vectores virales a un sujeto que desarrolla o tiene anti-anticuerpos preexistentes para el vector viral.

[00334] Las estrategias adicionales para reducir la inmunidad humoral al rAAV (que se pueden aplicar a otros vectores virales) incluyen métodos para eliminar, agotar, capturar y/o inactivar los anticuerpos AAV, comúnmente denominados aféresis y, más en particular, plasmáféresis, cuando están involucrados productos sanguíneos. La aféresis o plasmáféresis es un proceso en el que el plasma de un sujeto humano se hace circular *ex vivo* (extracorporalmente) a través de un dispositivo que modifica el plasma mediante la adición, eliminación y/o el reemplazo de componentes antes de su devolución al paciente. La plasmáféresis se puede utilizar para eliminar inmunoglobulinas humanas (p. ej., IgG, IgE, IgA, IgD) de un producto sanguíneo (p. ej., plasma). Este procedimiento se puede emplear para agotar, capturar, inactivar, reducir o eliminar inmunoglobulinas (anticuerpos) que se unen a AAV, de modo de reducir así la valoración de anticuerpos AAV en el sujeto tratado que pueden contribuir a la neutralización de rAAV. Un ejemplo es el uso de un dispositivo compuesto por una columna de matriz de afinidad de cápside de AAV y el

paso de un producto sanguíneo (p. ej., plasma) a través de una matriz de afinidad de cápside de AAV, lo que produce la unión de anticuerpos AAV de diferentes isotipos (ver, por ejemplo, Bertin et al., 2020, Sci. Rep. 10, 864, incorporado por la presente como referencia en su totalidad).

[00335] En ciertas formas de realización, las construcciones de polinucleótidos, los vectores virales y vectores no virales se pueden utilizar en combinación con un agente que bloquea, inhibe o reduce la interacción de IgG con el receptor Fc neonatal (FcRn), tal como un anticuerpo anti-FcRn, para reducir el reciclaje de IgG y mejorar el aclaramiento de IgG *in vivo*; y/o un agente que disminuye los anticuerpos circulantes que se une a un vector viral recombinante, o que se une a un ácido nucleico o un polipéptido, una proteína o un péptido codificado por un polinucleótido encapsidado por un vector viral recombinante, o que se une al polinucleótido. En ciertas formas de realización, la unión de anticuerpos a un vector viral se reduce o inhibe mediante un agente que reduce la interacción de IgG con FcRn, una proteasa o una glicosidasa.

[00336] En ciertas formas de realización, las construcciones de polinucleótidos, los vectores virales y vectores no virales descritos en este documento se pueden usar en combinación con una endopeptidasa (por ejemplo, IdeS de *Streptococcus pyogenes*) o una variante modificada de la misma, o una endoglicosidasa (por ejemplo, S. *pyogenes* EndoS), o una variante modificada de la misma. Dicho tratamiento se puede llevar a cabo, por ejemplo, para reducir o aclarar anticuerpos neutralizantes contra el vehículo de suministro de genes (por ejemplo, cápside del vector viral) y permitir el tratamiento de pacientes que anteriormente se consideraban no elegibles para la terapia génica, o que desarrollan anticuerpos resultantes de la terapia génica. Dichas estrategias se describen, por ejemplo, en Leborgne et al., (2020) Nat. Med., 26: 1096-1101.

VII. Equipos

[00337] La presente invención incluye equipos con material de empaque y uno o más componentes en el mismo. Un equipo incluye típicamente una etiqueta o un prospecto que incluye una descripción de los componentes o instrucciones de uso *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo* de los componentes allí incluidos. Un equipo puede contener una colección de dichos componentes, por ejemplo, una construcción de polinucleótido, un vector viral o no viral y, opcionalmente, un segundo compuesto activo, tal como otro compuesto, agente, fármaco o composición.

[00338] Un equipo se refiere a una estructura física que alberga uno o más componentes. El material de empaque puede mantener los componentes estériles, y

puede estar hecho de material comúnmente utilizado para dichos fines, tal como papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, papel de aluminio, ampollas, viales y tubos.

[00339] Las etiquetas o los prospectos pueden incluir información de identificación de uno o más componentes, cantidades de dosis, farmacología clínica de los ingredientes activos, lo que incluye el mecanismo de acción, farmacocinética y farmacodinámica. Las etiquetas o los prospectos pueden incluir información que identifique la información del fabricante, números de lote, lugar y fecha de fabricación, y fechas de vencimiento. Las etiquetas o los prospectos pueden incluir información sobre una enfermedad para la que se puede usar un componente del equipo. Las etiquetas o los prospectos pueden incluir instrucciones para el médico o el sujeto para usar uno o más de los componentes del equipo en un método, uso o protocolo de tratamiento o régimen terapéutico. Las instrucciones pueden incluir cantidades de dosificación, frecuencia o duración, e instrucciones para llevar a la práctica cualquiera de los métodos, usos, protocolos de tratamiento o regímenes profilácticos o terapéuticos descritos en este documento.

[00340] Las etiquetas o los prospectos pueden incluir información sobre uno o más beneficios que un componente puede proporcionar, tales como un beneficio profiláctico o terapéutico. Las etiquetas o los prospectos pueden incluir información sobre posibles efectos secundarios adversos, complicaciones o reacciones, tales como advertencias para el sujeto o el médico respecto de situaciones en las que no sería apropiado usar una composición en particular. También podrían producirse efectos secundarios adversos o complicaciones cuando el sujeto ha tomado, tomará o está tomando actualmente uno o más medicamentos que pueden ser incompatibles con la composición, o el sujeto ha tomado, tomará o está tomando actualmente otro protocolo de tratamiento o régimen terapéutico que sería incompatible con la composición y, por lo tanto, las instrucciones podrían incluir información sobre dichas incompatibilidades.

[00341] Las etiquetas o los prospectos incluyen "material impreso", por ejemplo, papel o cartón, o están separados o adheridos a un componente, un equipo o material de empaquetamiento (por ejemplo, una caja), o están adheridos a una ampolla, un tubo o vial que contiene un componente del equipo. Las etiquetas o los prospectos pueden incluir además un medio legible por computadora, tal como una etiqueta impresa con código de barras, un disco, un disco óptico tal como CD o DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, cinta magnética, o un medio de almacenamiento eléctrico tal como RAM y ROM, o híbridos de estos, tales como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos, medios FLASH o tarjetas de tipo memoria.

VIII. Aspectos y formas de realización adicionales.

[00342] Aspectos, formas de realización y sus combinaciones adicionales incluyen los siguientes:

1. Un polinucleótido de ARN que comprende una secuencia de ARN de direccionamiento que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % con la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 36, 38, 32-35, 37, o 39-62; y/o difiere de cualquiera de SEQ ID NOs: 36, 38, 32-35, 37, o 39-62 en 1 o 2 nucleótidos.

2. El polinucleótido de ARN de 1, donde la secuencia de ARN de direccionamiento comprende: una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

a) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 34 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 108;

b) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 36 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 109;

c) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 37 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 110;

d) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 38 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 111;

e) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 39 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 112;

f) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 41 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 113; y

g) una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 42 por 0, 1, 2 o 3 nucleótidos, donde la secuencia de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 114.

3.El polinucleótido de ARN de 1, donde dicha secuencia de ARN de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 38.

4.El polinucleótido de ARN de 3, donde dicha secuencia de ARN de direccionamiento comprende la secuencia de SEQ ID NO: 95 o SEQ ID NO: 97.

5.El polinucleótido de ARN de cualquiera de 1-4, donde dicho polinucleótido de ARN además comprende una segunda secuencia de ARN, donde la segunda secuencia de ARN es sustancialmente complementaria a la secuencia de ARN de direccionamiento.

6.El polinucleótido de ARN de 5, donde dicho polinucleótido de ARN es un pre-miARN, donde dicho pre-miARN comprende un andamio de pre-miARN, una secuencia guía incrustada y una secuencia pasajera incrustada, donde dicha secuencia guía comprende dicha secuencia de direccionamiento, y dicha secuencia pasajera comprende dicha segunda secuencia.

7.El polinucleótido de ARN de 6, donde el polinucleótido de ARN comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % a cualquiera de SEQ ID NOs: 122-128 y 207-224.

8.El polinucleótido de ARN de 1, donde el polinucleótido de ARN comprende la secuencia de SEQ ID NOs: 123 o 125.

9.El polinucleótido de ARN de 5, donde dicho polinucleótido de ARN es un ARNsh, donde dicho ARNsh comprende un andamio de ARNsh, una secuencia guía incrustada y una secuencia pasajera incrustada, donde dicha secuencia guía comprende dicha secuencia de direccionamiento y dicha secuencia pasajera comprende dicha segunda secuencia.

10. El polinucleótido de ARN de 5, donde dicho polinucleótido de ARN es un pri-miARN, donde dicho pri-miARN comprende un andamio de pri-miARN, una secuencia guía incrustada y una secuencia pasajera incrustada, donde dicha secuencia guía comprende dicha secuencia de direccionamiento y dicha secuencia pasajera comprende dicha segunda secuencia.

11. El polinucleótido de ARN de 10, donde el andamio es un andamio miR-1, miR-26, miR16-1, miR-30, miR-33mi-R101, miR-64, miR-122, miR-125, miR-135, miR-155, miR-155 mejorado (eSIBR), o miR-451.

12. El polinucleótido de ARN de 10, donde el andamio es un andamio S155e, andamio S26, andamio S126, andamio S33 o andamio S155. En una forma de realización adicional, el andamio comprende SEQ ID NOs: 186 o 187.

13. El polinucleótido de ARN de 10, donde dicho polinucleótido de ARN comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % a cualquiera de SEQ ID NOs: 115-121, 207-224 o la versión de ARN (cadena principal de ribosa y U en lugar de T) de 243-260. En una forma de realización adicional, el polinucleótido de ARN comprende una combinación de pasajera/guía como se proporciona en las Tablas 2, 3, o 4.

14. El polinucleótido de ARN de 11, donde el polinucleótido de ARN comprende la secuencia de SEQ ID NO: 116 o SEQ ID NO: 118.

15. Un ARN inhibidor opcionalmente modificado que comprende (a) una hebra guía capaz de hibridar con la secuencia diana de cualquiera de SEQ ID NOs: 129-135; y (b) una secuencia pasajera sustancialmente complementaria; donde uno o más nucleótidos de la hebra guía y la hebra pasajera son ARN opcionalmente modificado.

16. Un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que

codifica el polinucleótido de ARN de cualquiera de 1-14.

17. Un casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polinucleótido de ARN de cualquiera de 1-14, operativamente unida a uno o más elementos de control de expresión.

18. El casete de expresión de 17, donde el casete de expresión comprende un promotor corriente ascendente y una señal de poliadenilación corriente descendente, operativamente unidos a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polinucleótido de ARN.

19. El casete de expresión de 18, donde el casete de expresión comprende 5' a 3', operativamente unidos a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polinucleótido de ARN, un promotor o promotor/mejorador, la secuencia de ácido nucleico que codifica el polinucleótido de ARN, y una señal de poliadenilación.

20. El casete de expresión de 18 o 19, donde el promotor proporciona expresión en el SNC.

21. El casete de expresión de 18 o 19, donde el promotor es un promotor EF-1 α .

22. El casete de expresión de cualquiera de 17-21, donde el casete de expresión es ADN.

23. El casete de expresión de 22, donde el casete de expresión comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % con cualquiera de SEQ ID NOs: 168-174.

24. El casete de expresión de 23, donde el casete de expresión comprende la secuencia de SEQ ID NOs: 169 o 171.

25. El casete de expresión de cualquiera de 17-24, que además comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor neurotrófico derivado de célula glial (GDFN) que o bien está unido operativamente a dicho promotor o está unido operativamente a un segundo promotor.

26. Un ácido nucleico de vector viral recombinante que comprende el casete de expresión de cualquiera de 17-25, y elementos virales 5' y 3' que proporcionan empaquetado y/o replicación viral.

27. El ácido nucleico de vector viral recombinante de 26, donde el ácido nucleico de vector viral recombinante es un ADN recombinante y comprende una repetición invertida (ITR) de virus adenoasociado (AAV) que flanquea el extremo terminal 5' del ácido nucleico de vector viral recombinante, y una ITR de AAV que flanquea el extremo terminal 3' del ácido nucleico de vector viral recombinante.

28. El ácido nucleico de vector viral recombinante de 27, donde la ITR 5' y la ITR

3' se seleccionan de las ITR 5' y las ITR 3' de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.10, AAVrh.74 o AAV3B.

29. El ácido nucleico de vector viral recombinante de 26, donde el ácido nucleico de vector viral recombinante es autocomplementario.

30. El ácido nucleico de vector viral recombinante de 27, donde la ITR 5' comprende una secuencia con una identidad de secuencia de por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % a SEQ ID NO: 182 y la ITR 3' comprende una secuencia con una identidad de secuencia de por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % a SEQ ID NO: 183.

31. El ácido nucleico de vector viral recombinante de 27 o 30, que comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % a la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOs: 175-181.

32. El ácido nucleico de vector viral recombinante de 27, que comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 95 % por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % o 100 % a SEQ ID NOs: 176 o 178.

33. Un vehículo de suministro que comprende un vector viral o no viral y el polinucleótido de ARN de cualquiera de 1-14, el ARN inhibidor de 15, el polinucleótido de 16, el casete de expresión de cualquiera de 17-25 o el ácido nucleico de vector viral recombinante de cualquiera de 26-32.

34. El vehículo de suministro de 33, donde el vehículo de suministro es el vector viral.

35. El vehículo de suministro de 34, donde el vector viral es un AAV recombinante, un vector de lentivirus recombinante, o un vector de adenovirus recombinante.

36. El vehículo de suministro de 35, donde el vector viral es un AAV recombinante que comprende el ácido nucleico de vector viral recombinante de cualquiera de 26-32 y una cápside.

37. El vehículo de suministro de 36, donde el vector recombinante de AAV comprende una cápside que comprende una VP1, VP2 o VP3 que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90 % a una VP1, VP2 o VP3 de cualquiera de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.74, AAV3B, AAV-2i8, AAVrh.10, AAVrh.8, AAVHSC, AAV-B1, AAV-AS, o AAV1/rh.10; o VP1 de SEQ ID NO: 164 o SEQ ID NO: 167.

38. El vehículo de suministro de 36, donde la cápside es una cápside de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh.74, AAV3B, AAV-2i8, AAVrh.10, AAVrh.8, AAVHSC, AAV-B1, AAV-AS, o AAV1/rh.10; o la cápside comprende VP1 de SEQ ID NO: 164 o SEQ ID NO: 167.

39. El vehículo de suministro de 36, donde la cápside comprende VP1 de SEQ ID NO: 164, VP2 de SEQ ID NO: 165, y VP3 de SEQ ID NO: 166.

40. El vehículo de suministro de cualquiera de 36-39, donde dicha cápside es una cápside de AAV2 que comprende la secuencia de direccionamiento de SEQ ID NOs: 279, 280, 281, o 282 insertada entre una ubicación correspondiente a N587 y R588 de VP1.

41. El vehículo de suministro de 39 o 40, donde el ácido nucleico de vector viral recombinante comprende las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NOs: 137 y 151.

42. El vehículo de suministro de 41, donde el ácido nucleico de vector viral recombinante comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 158.

43. El vehículo de suministro de 41, donde el ácido nucleico de vector viral recombinante comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 169.

44. El vehículo de suministro de 41, donde el ácido nucleico de vector viral recombinante comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 176.

45. El vehículo de suministro de cualquiera de 41-44, donde la cápside comprende VP1 de SEQ ID NO: 164, VP2 de SEQ ID NO: 165, y VP3 de SEQ ID NO: 166.

46. El vehículo de suministro de cualquiera de 41-44, donde la cápside es una cápside de AAV2 que comprende la secuencia de direccionamiento de SEQ ID NOs: 279 o 282 insertada entre una ubicación correspondiente a N587 y R588 de VP1.

47. El vehículo de suministro de 33, donde el vehículo de suministro es una nanopartícula seleccionada del grupo que consiste en una nanopartícula lipídica (LNP), una nanopartícula polimérica, una nanopartícula polimérica lipídica (LPNP), una nanopartícula a base de proteína o péptido, un dendrímero de ADN o nanoportador a base de ADN, un nanotubo de carbono, una micropartícula, una microcápsula, una nanopartícula inorgánica, una nanopartícula de jaula de péptidos, y un exosoma.

48. El suministro de vehículo de 47, donde el vehículo de suministro es un LNP o LPNP.

49. Un vector adenoasociado recombinante que comprende ácido nucleico rAAV encapsidado en una cápside, donde dicho ácido nucleico rAAV comprende (a) una ITR 5' de SEQ ID NO: 182; (b) un promotor EF1a de SEQ ID NO: 184; (c) una secuencia codificante de pri-miARN que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 158, (d) una señal de poliadenilación que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 185, y (e) una ITR 3' de

SEQ ID NO: 183, donde (c) está operativamente unida a (b) y (d).

50. El vector recombinante de AAV de 49, que comprende una secuencia por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 %, o que comprende, la secuencia de SEQ ID NO: 169

51. El vector recombinante de AAV de 49 o 50, donde dicha cápside comprende VP1 de SEQ ID NO: 164, VP2 de SEQ ID NO: 165, y VP3 de SEQ ID NO: 166.

52. Una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido de ARN de cualquiera de 1-14, el ARN inhibidor de 15, el polinucleótido de 16, el casete de expresión de cualquiera de 17-25, el ácido nucleico de vector viral recombinante de cualquiera de 26-32, el vehículo de suministro de cualquiera de 33-48, o el vector de rAAV de cualquiera de 49-51 y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

53. Un método para reducir o inhibir la agregación de α -sinucleína en una célula o en un sujeto, que comprende administrar a la célula o al sujeto el polinucleótido de ARN de cualquiera de 1-14, el ARN inhibidor de 15, el polinucleótido de 16, el casete de expresión de cualquiera de 17-25, el ácido nucleico de vector viral recombinante de cualquiera de 26-32, el vehículo de suministro de cualquiera de 33-48, el vector de rAAV de cualquiera de 49-51, o la composición farmacéutica de 52.

54. Un método de tratamiento de un sujeto para una enfermedad o trastorno de sinucleinopatía, que comprende administrar al sujeto el polinucleótido de ARN de cualquiera de 1-14, el ARN inhibidor de 15, el polinucleótido de 16, el casete de expresión de cualquiera de 17-25, el ácido nucleico de vector viral recombinante de cualquiera de 26-32, el vehículo de suministro de cualquiera de 33-48, el vector de rAAV de cualquiera de 49-51, o la composición farmacéutica de 52.

55. El método de 54, donde la enfermedad o trastorno de sinucleinopatía es o bien enfermedad con cuerpos de Lewy o atrofia multisistémica.

56. El método de 54, donde la enfermedad o el trastorno de sinucleinopatía es distrofia neuroaxonal infantil, distrofia neuroaxonal atípica, distonía-parkinsonismo de inicio en la edad adulta, parkinsonismo autosómico recesivo de inicio temprano, neurodegeneración asociada a POLG, Niemann-Pick tipo C1 o enfermedad de Krabbe.

57. El método de 54, donde la enfermedad o el trastorno de sinucleinopatía es enfermedad de Parkinson.

58. Un método de tratamiento de una enfermedad o un trastorno asociado con baja dopamina que comprende administrar al sujeto el polinucleótido de ARN de cualquiera de 1-14, el ARN inhibidor de 15, el polinucleótido de 16, el casete de expresión de cualquiera de 17-25, el ácido nucleico de vector viral recombinante de cualquiera de 26-32, el vehículo de suministro de cualquiera de 33-48, el vector de rAAV de cualquiera

de 49-51, o la composición farmacéutica de 52.

59. El método de cualquiera de 53-58, donde la administración comprende la administración directa intraparenquimatosa, intracisternal o intraventricular.

60. El método de cualquiera de 53-59, donde la administración inicial es fuera del SNC.

61. El método de cualquiera de 53-60, donde el sujeto es un ser humano.

62. Un método de cualquiera de 53-61, donde dicho método reduce α -sinucleína a alrededor de 25 % a alrededor de 70 %, 30 % a 65 %, o 35 % a 60 %, en relación con los niveles iniciales en la región cerebral transducida, tal como la sustancia negra.

63. El método de cualquiera de 53-62, donde el AAV recombinante de cualquiera de 36-46 y 59-51 se proporciona en una dosis de 3e8 vg/SN a 3E11 vg/SN, alrededor de 3e8 vg/SN, alrededor de 3e9 vg/SN, alrededor de 3e10 vg/SN, o alrededor de 3E11 vg/SN

64. Un plásmido de genoma de vector de AAV que comprende el ácido nucleico viral recombinante de cualquiera de 26-32.

65. El plásmido de genoma de AAV de 64, donde el plásmido carece de genes *rep* y *cap*.

66. Un método para producir un vector de rAAV que comprende el paso de cultivar una línea celular de empaquetamiento de rAAV que comprende una actividad de virus auxiliar rAAV, donde el genoma de dicha célula de producción comprende el ácido nucleico de cualquiera de 26-32, un gen *rep* y un gen *cap*, donde se produce dicho vector de rAAV.

67. Un método para producir un vector de rAAV, que comprende el paso de cultivar una célula permisiva de rAAV que comprende el plásmido genómico de rAAV de 64, donde la célula permisiva de rAAV comprende además (a) genes *rep* y *cap* proporcionados o bien como parte del genoma celular y/o por uno o más plásmidos separados, y (b) actividad de virus auxiliar proporcionada por el genoma celular y/o proporcionada por uno o más plásmidos separados.

68. El método de 67, donde la célula permisiva de rAAV es una célula empaquetadora, donde el genoma de dicha célula empaquetadora comprende un gen *cap* y un gen *rep*.

69. El método de 67, donde o bien (a) dicho gen *rep*, dicho gen *cap* y dicha actividad auxiliar se proporcionan en un único plásmido, o (b) dicho gen *rep* y dicho gen *cap* se proporcionan en un plásmido *rep/cap*, y dicha actividad auxiliar es proporcionada por un plásmido auxiliar.

70. Un método para obtener un vector de rAAV, que comprende los pasos de (a)

producir el vector de rAAV usando el método de cualquiera de 66-69 y (b) purificar el vector de rAAV.

IX. Secuencias

[00343] La Tabla 9 proporciona diferentes secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos. En diferentes formas de realización, un polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 %, o 100 % con respecto a cualquiera de las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en la Tabla 9; y un polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 %, o 100 % con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la Tabla 9.

[00344] Tabla 9

<u>SEQ</u>	
ARNsi guía	
1	UACAUAGAGAACACCCUCUTT
2	UCCUUUCAUGAAUACAUCCTT
3	UUUGUCACUUGCUCUUUGGTT
4	UUUUGGAGCCUACAUAGAGTT
5	AUAGAGAACACCCUCUUUUTT
6	UAGAGAACACCCUCUUUUGTT
7	UCCUUUUUGACAAAGCCAGTT
8	UUUUGACAAAGCCAGUGGCTT
9	UUCUCAGCCACUGUUGCCATT
10	UCCUCCAACAUUUGUCACUTT
11	AUUUGUCACUUGCUCUUUGTT
12	UUUGGUCUUCUCAGCCACUTT
13	UGCUCUCCAACAUAUUGUCTT
14	AGCCUACAUAAGAGAACACCTT
15	UUUGGAGCCUACAUAAGAGATT
16	GUCCUUUCAUGAAUACAUCTT
17	CUUUUUUGACAAAGCCAGUGTT
18	CCUUGGCCUUUGAAAGUCCTT
19	CUUGGUUUUGGAGCCUACATT
20	GUCACUUGCUCUUUGGUCUTT
21	GUCCUUUUUGACAAAGCCATT
22	CACUGCUCCUCCAACAUUUTT
23	GCUCCUCCAACAUAUUGUCATT
24	CAACUGGUCCUUUUUGACATT
25	GCUCCCUCCACUGUCUUCUTT
26	CACUGUUGCCACACCAUGCTT
27	GGUAUCAAGACUACGAACCTT

28	GGAGCAGUGGUGACGGGUGTT
29	GGGUAUCAAGACUACGAAGTT
30	GGUGUUCUCUAUGUAGGCUTT
31	CCUUCUGAGGAAGGGUAUCTT
Direccinamiento	
32	UACAUAGAGAACACCCUCU
33	UCCUUUCAUGAAUACAUC
34	UUUGUCACUUGCUCUUUGG
35	UUUUGGAGCCUACAUAAG
36	AUAGAGAACACCCUCUUUU
37	UAGAGAACACCCUCUUUUG
38	UCCUUUUUGACAAAGCCAG
39	UUUUGACAAAGCCAGUGGC
40	UUCUCAGCCACUGUUGCCA
41	UCCUCCAACAUUUGUCACU
42	AUUUGUCACUUGCUCUUUG
43	UUUGGUCUUCUCAGCCACU
44	UGCUCUCCAACAUAUUUGUC
45	AGCCUACAUAAGAGAACACC
46	UUUGGAGCCUACAUAAGAGA
47	GUCCUUUCAUGAAUACAUC
48	CUUUUUUGACAAAGCCAGUG
49	CCUUGGCCUUUGAAAGUCC
50	CUUGGUUUUGGAGCCUACA
51	GUCACUUGCUCUUUGGUCU
52	GUCCUUUUUGACAAAGCCA
53	CACUGCUCUCCAACAUAUU
54	GCUCCUCCAACAUAUUUGUCA
55	CAACUGGUCCUUUUUGACA
56	GCUCCCUCCACUGUCUUCU
57	CACUGUUGCCACACCAUGC
58	GGUAUCAAGACUACGAACC
59	GGAGCAGUGGUGACGGGUG
60	GGGUAUCAAGACUACGAAC
61	GGUGUUCUCUAUGUAGGCU
62	CCUUCUGAGGAAGGGUAUC
ARNsi Pasajero	
63	AGAGGGUGUUCUCUAUGUATT
64	GGAUGUAUUC AUGAAAGGATT
65	CCAAAGAGCAAGUGACAAATT
66	CUCUAUGUAGGCUCCAAAATT
67	AAAAGAGGGUGUUCUCUAUTT
68	CAAAAGAGGGUGUUCUCUATT
69	CUGGCUUUGUCAAAAAGGATT
70	GCCACUGGCUUUGUCAAAAATT
71	UGGCAACAGUGGCUGAGAATT
72	AGUGACAAAUGUUGGAGGATT
73	CAAAGAGCAAGUGACAAAUTT

74	AGUGGCUGAGAAGACCAAATT
75	GACAAAUGUUGGAGGAGCATT
76	GGUGUUCUCUAUGUAGGCUTT
77	UCUCUAUGUAGGCUCCAAATT
78	GAUGUAUUCAUGAAAGGACTT
79	CACUGGCUUUGUCAAAAAGTT
80	GGACUUUCAAAAGGCCAAGGTT
81	UGUAGGCUCCAAAACCAAGTT
82	AGACCAAAGAGCAAGUGACTT
83	UGGCUUUGUCAAAAAGGACTT
84	AAAUGUUGGAGGAGCAGUGTT
85	UGACAAAUGUUGGAGGAGCTT
86	UGUCAAAAAGGACCAGUUGTT
87	AGAAGACAGUGGAGGGAGCTT
88	GCAUGGUGUGGCAACAGUGTT
89	GGUUCGUAGUCUUGAUACCTT
90	CACCCGUCACCACUGCUCCTT
91	GUUCGUAGUCUUGAUACCCTT
92	AGCCUACAUAGAGAACACCTT
93	GAUACCCUCCUCAGAAGGTT
miARN guía	
94	UUUGUCACUUGCUCUUUGGUC
95	AUAGAGAACACCCUCUUUUGU
96	UAGAGAACACCCUCUUUUGUC
97	UCCUUUUUGACAAAGCCAGUG
98	UUUUGACAAAGCCAGUGGCUG
99	UCCUCCAACAUUUGUCACUUG
100	AUUUGUCACUUGCUCUUUGGU
miARN pasajero	
101	GACCAAAGAGCAAGUGACAAA
102	ACAAAAGAGGGUGUUCUCUAU
103	GACAAAAGAGGGUGUUCUCUA
104	CACUGGCUUUGUCAAAAAGGA
105	CAGCCACUGGCUUUGUCAAAA
106	CAAGUGACAAUGUUGGAGGA
107	ACCAAAGAGCAAGUGACAAAU
miARN guía semilla	
108	UUGUCAC
109	UAGAGAA
110	AGAGAAC
111	CCUUUUU
112	UUUGACA
113	CCUCCAA
114	UUUGUCA
Pri-miARN	
5' secuencia guía y 3' secuencia pasajera están subrayadas	
115	CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCUGUUUGUCACUUGCUCUUUGGUCGUUUU GGCCACUGACUGACGACCAAAGCAAGUGACAAACAGGACACAAGGCCUGUUACU AGCACUCACAUGGAACAAAUGGCC

116	CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCUGAUAGAGAACACCCUCUUUUGUGUUUU GGCCACUGACUGACACAAAAGAGUGUUCUCUAUCAGGACACAAGGCCUGUUACU AGCACUCACAUGGAACAAAUGGCC
117	CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCUGUAGAGAACACCCUCUUUUGUCGUUUU GGCCACUGACUGACGACAAAAGGGUGUUCUCUACAGGACACAAGGCCUGUUACU AGCACUCACAUGGAACAAAUGGCC
118	CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCUGUCCUUUUUGACAAAGCCAGUGGUUUU GGCCACUGACUGACCACUGGCUGUCAAAAAGGACAGGACACAAGGCCUGUUACU AGCACUCACAUGGAACAAAUGGCC
119	CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCUGUUUUGACAAAGCCAGUGGCUGGUUUU GGCCACUGACUGACCAGCCACUCUUUGUCAAAACAGGACACAAGGCCUGUUACU AGCACUCACAUGGAACAAAUGGCC
120	CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCUGUCCUCCAACAUUUGUCACUUGGUUUU GGCCACUGACUGACCAAGUGACAUGUUGGAGGACAGGACACAAGGCCUGUUACU AGCACUCACAUGGAACAAAUGGCC
121	CUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCUGAUUUGUCACUUGCUCUUUGGUGUUUU GGCCACUGACUGACACCAAAGAAAGUGACAAAUACAGGACACAAGGCCUGUUACU AGCACUCACAUGGAACAAAUGGCC
Pre-miARN 5' secuencia guía y 3' secuencia pasajera están subrayadas	
122	<u>UUUGUCACUUGCUCUUUGGUCGUUUUGGCCACUGACUGACGACCAAAGCAAGUG</u> <u>ACAAA</u>
123	<u>AUAGAGAACACCCUCUUUUGUGUUUUGGCCACUGACUGACACAAAAGAGUGUUC</u> <u>UCUAU</u>
124	<u>UAGAGAACACCCUCUUUUGUCGUUUUGGCCACUGACUGACGACAAAAGGGUGUU</u> <u>CUCUA</u>
125	<u>UCCUUUUUGACAAAGCCAGUGGUUUUGGCCACUGACUGACCACUGGCUGUCAAA</u> <u>AAGGA</u>
126	<u>UUUUGACAAAGCCAGUGGCUGGUUUUGGCCACUGACUGACCAGCCACUCUUUGU</u> <u>CAAAA</u>
127	<u>UCCUCCAACAUUUGUCACUUGGUUUUGGCCACUGACUGACCAAGUGACAUGUUG</u> <u>GAGGA</u>
128	<u>AUUUGUCACUUGCUCUUUGGUGUUUUGGCCACUGACUGACACCAAAGAAAGUGA</u> <u>CAAAU</u>
Diana	
129	GACCAAAGAGCAAGUGACAAA
130	ACAAAAGAGGGUGUUCUCUAU
131	GACAAAAGAGGGUGUUCUCUA
132	CACUGGCUUUGUCAAAAAGGA
133	CAGCCACUGGCUUUGUCAAAA
134	CAAGUGACAAUGUUGGAGGA
135	ACCAAAGAGCAAGUGACAAAU
ADN que codifica miARN guía	
136	TTTGTCACCTTGCTCTTTGGTC
137	ATAGAGAACACCTCTTTTGT
138	TAGAGAACACCTCTTTTGTC
139	TCCTTTTTGACAAAGCCAGTG
140	TTTTGACAAAGCCAGTGGCTG
141	TCCTCCAACATTTGTCACTTG
142	ATTTGTCACTTGCTCTTTGGT
ADN que codifica miARN guía semilla	
143	TTGTCAC

144	TAGAGAA
145	AGAGAAC
146	CCTTTTT
147	TTTGACA
148	CCTCCAA
149	TTTGTCA
ADN que codifica miARN pasajero	
150	GACCAAAGAGCAAGTGACAAA
151	ACAAAAGAGGGTGTCTCTAT
152	GACAAAAGAGGGTGTCTCTA
153	CACTGGCTTTGTCAAAAAGGA
154	CAGCCACTGGCTTTGTCAAAA
155	CAAGTGACAAATGTTGGAGGA
156	ACCAAAGAGCAAGTGACAAAT
ADN que codifica pri-miARN 5' secuencia guía y 3' secuencia pasajera están subrayadas	
157	CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTTTGTCACTTGCTCTTTGGTCGTTTT GGCCACTGACTGACGACCAAAGCAAGTGACAAACAGGACACAAGGCCTGTTACT AGCACTCACATGGAACAAATGGCC
158	CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGATAGAGAACACCCTCTTTTGTGTTTT GGCCACTGACTGACACAAAAGAGTGTCTCTATCAGGACACAAGGCCTGTTACT AGCACTCACATGGAACAAATGGCC
159	CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTAGAGAACACCCTCTTTTGTCTGTTTT GGCCACTGACTGACGACAAAAGGGTGTCTCTACAGGACACAAGGCCTGTTACT AGCACTCACATGGAACAAATGGCC
160	CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTCCTTTTGTGACAAAGCCAGTGTTTT GGCCACTGACTGACCACTGGCTGTCAAAAAGGACAGGACACAAGGCCTGTTACT AGCACTCACATGGAACAAATGGCC
161	CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTTTTGTGACAAAGCCAGTGCGTTTT GGCCACTGACTGACCAGCCACTCTTTGTCAAAACAGGACACAAGGCCTGTTACT AGCACTCACATGGAACAAATGGCC
162	CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTCCTCCAACATTTGTCACTTGTTTT GGCCACTGACTGACCAAGTGACATGTTGGAGGACAGGACACAAGGCCTGTTACT AGCACTCACATGGAACAAATGGCC
163	CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGATTTGTCACTTGCTCTTTGGTGTTTT GGCCACTGACTGACACCAAAGAAAGTGACAAATCAGGACACAAGGCCTGTTACT AGCACTCACATGGAACAAATGGCC
Cápside	
164	VP1 MAADGILPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDNNGRLVLPGYKILG PFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQQLQAGDNPILRYNHADADEFQERLQEDT SFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPPDSSTGIGK KGQQPAKKRLNFGQTDSESVDPDQPIGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNN EGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGST NDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVK EVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQY GILTLLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHSQS LDRLMNPLIDQILYILSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCY RQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPVAMATHKDEERFFPSS GVLMMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPI VGAVNSQGALPGMVWQNRDVILQGPIWAKIPHTDGNFHPSPMLMGFGFLKHPPFPQ ILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQ

	YTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRILTRNL
165	VP2 MAPGKKRPVEPSPQORSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDPQPIGE PPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTST RTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDW QRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQL PYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGILTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLR TGNNFEFSYNFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQILYILSRTQSTGGTAGTQ QLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNG RDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVL MFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIK TTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVILQGPIWAK IPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYS TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGT RILTRNL
166	VP3 MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHL YKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFRP KRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCL PPFPADVFMIPQYGILTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFE DVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQILYILSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNM SAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMA THKDDEERFFPSSGVL MFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGV VADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVILQGPIWAKIPHTDGNFHPSP LMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWEL QKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRILTRNL
167	VP1 MAADGILPDWLEDNLSEGIREWVALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGYKILG PGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQQKAGDNPILKYNHADAEFQERLKEDT SFGGNLGRAVFQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQSPQEPDSSSGVGKS GKQPARKRLNFGQTGDSESVDPDPQPLGEPPAAPTSLGSNTMASGGGAPMADNNE GADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDN HYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFRPKKLSFKLFNIQVKEVT QNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGIL TLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPPHSSYAHSQSLDR LMNPLIDQILYILNRTQGTTS GTTNQSRLLFSQAGPQMSMLQARNWLPGPCYRQ QRLSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPMHGN LIFGKEGTTASNAELDNVMITDEEEIRTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTTR TVNDQGALPGMVWQDRDVILQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIM IKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYT SNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRILTRPL
Casete de expresión	
168	miR3 ACGCGTTACAGAAACCAAGAAAGCACCATAGCGTTTGCCTTCAACTGCTTCCCA ACTTGTTTTCCTCTTCCAATTTGATTGTGGTTTCTCTCCAGAAGGAAGTCCAC AGTACTTAGCGTTGGCCACATAGTAGGTTCTCAAATACTTGTTAATAAATAAGT TTGTTTCGAGAAGCTGGGCAATGATATTCTACAGCTGGAAGAAGAAACATAATGA TCTAGTAATTAGCTCATTAATAAATAAACGTTCTTCTTTCCTCAGAGGAGCATTT CCCAAGGCCTGCCTTGATAGCCATCCAAAAGGCCAAGCTCATCCAATCTTGCC CTAGATTTATGCTAAATGCAGTTACAATCGATAGGATGACAGAAAACGACAGC ACTTATTTAAATATAATAGGCACTTATTTAAATAGGAGAAGCTGTGACTTCATA GCAAGTGTTGGGGTTAGGAACTGGGTGGATAAACTTGCTGATGCTGTAGATCT TAGCCTCTACATGAGATCATGTGGAAAATCTGAAAGCATTTTAGGTTCTTATG TTTGCAATCAAATAACTGTACACCTTTTAAATTTAAAAAGTACCATGAGGCACAC ACACACACTCGCAGGAACCTTTTTGGCGTAACAAAAC TAGAATTAGATCTAAAGC

	TAACTGTAGGACTGAGTCTATTCTAAACTGAAAGCCTGGACATCTGGAGTACCA GGGGGAGATGACGTGTTACGGGCTTCCATAAAAGCAGCTGGCTTTGAATGGAAG GAGCCAAGAGGCCAGCACAGGAGCGGATTTCGTCGCTTTCACGGCCATCGAGCCG AACCTCTCGCAAGTCCGTGAGCCGTTAAGGAGGCCCCAGTCCCGACCCTTCGC CCAAGCCCCCTCGGGGTCCCCGGGCTGGTACTCCTTGCCACACGGGAGGGGCG CGGAAGCCGGGGCGGAGGAGGAGCCAACCCCGGGCTGGGCTGAGACCCGAGAG GAAGACGCTCTAGGGATTTGTCCCGGACTAGCGAGATGGCAAGGCTGAGGACGG GAGGCTGATTGAGAGGCGAAGGTACACCCTAATCTCAATACAACCTTTGGAGCT AAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCACGTCCCTTCCAGGCGGCCTCCCC GTCACCACCCCCCAACCCGCCCGACCGGAGCTGAGAGTAATTCATACAAAA GGAATCGCCCCCTGCCTTGGGGAATCCAGGGACCGTCGTTAAACTCCCCTAAC GTAGAACCAGAGATCGCTGCGTTCGCGCCCCCTCACCCGCCCGCTCTCGTCAT CACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAG CGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAAGTTGGGGGGAGGGGTGCGCAATTGAACC GGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAAGTGATGTCGTGTACTGG CTCCGCCTTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCC GTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTG TGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGA ATTACTTCCACGCCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGT TGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCG TGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTG GCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTT TTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGG CCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGC CCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACC GAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCT CGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGTTCGGCACC AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAA ATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAA AAGGGCCTTTCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGC GCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGG TTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGTTCAAAGTTTTTT TCTTCCATTTAGGTGTCGTGAAAACAAACCCTAGGCGTCGACGATCTAGCGTC GACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTTTGTCACTTGCTC TTTGGTCGTTTTGGCCACTGACTGACGACCAAAGCAAGTGACAAACAGGACACA AGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCAGATCCGATCTTTTTCC CTCTGCCAAAATTTATGGGGACATCATGAAGCCCCCTGAGCATCTGACTTCTGG CTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCT CTCACTCGATCGCGGCCGC
169	miR5 ACGCGTTACAGAAACCAAGAAAGCACCATAGCGTTTGCCTTCAACTGCTTCCCA ACTTGTTTTCTCTTCCAATTTGATTGTGGTTTCCCTCTCCAGAAGGAACTCCAC AGTACTTAGCGTTGGCCACATAGTAGGTTCTCAAATACTTGTTAATAAATAAGT TTGTTTCGAGAAGCTGGGCAATGATATTCTACAGCTGGAAGAAGAAACATAATGA TCTAGTAATTAGCTCATTAATAAATAACGTTCTTCTTTCCTCAGAGGAGCATTT CCAAGGCCTGCCTTGATAGCCATCCAAAAGGCCAAGCTCATCCAATCTTGCC CTAGATTTATGCTAAAAATGCAGTTACAATCGATAGGATGACAGAAAACGACAGC ACTTATTTAAATATAATAGGCACTTATTTAAATAGGAGAAGCTGTGACTTCATA GCAAGTGTTGGGGTTAGGAAACTGGGTGGATAAACTTGCTGATGCTGTAGATCT TAGCCTCTACATGAGATCATGTGGAATACTGAAAGCATTTTAGGTTCCCTTATG TTTGCAATCAAATAACTGTACACCTTTTAATTTAAAAAGTACCATGAGGCACAC ACACACACTCGCAGGAACTTTTTGGCGTAACAAAACCTAGAATTAGATCTAAAGC

	TAACTGTAGGACTGAGTCTATTCTAAACTGAAAGCCTGGACATCTGGAGTACCA GGGGGAGATGACGTGTTACGGGCTTCCATAAAAGCAGCTGGCTTTGAATGGAAG GAGCCAAGAGGCCAGCACAGGAGCGGATTTCGTCGCTTTCACGGCCATCGAGCCG AACCTCTCGCAAGTCCGTGAGCCGTTAAGGAGGCCCCAGTCCCGACCCTTCGC CCAAGCCCCCTCGGGGTCCCCGGGCTGGTACTCCTTGCCACACGGGAGGGGCG CGGAAGCCGGGGCGGAGGAGGAGCCAACCCCGGGCTGGGCTGAGACCCGAGAG GAAGACGCTCTAGGGATTTGTCCCGGACTAGCGAGATGGCAAGGCTGAGGACGG GAGGCTGATTGAGAGGCGAAGGTACACCCTAATCTCAATACAACCTTTGGAGCT AAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCACGTCCCTTCCAGGCGGCCTCCCC GTCACCACCCCCCAACCCGCCCGACCGGAGCTGAGAGTAATTCATACAAAA GGAATCGCCCCCTGCCTTGGGGAATCCAGGGACCGTCGTTAAACTCCCCTAAC GTAGAACCAGAGATCGCTGCGTTCGCGCCCCCTCACCCGCCCGCTCTCGTCAT CACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAG CGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGGCAATTGAACC GGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGG CTCCGCCTTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCC GTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTG TGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGA ATTACTTCCACGCCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGT TGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCG TGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTG GCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTT TTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGG CCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGC CCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACC GAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCT CGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGTTCGGCACC AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAA ATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAA AAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGC GCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGG TTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTT TCTTCCATTTAGGTGTCGTGAAAACAAACCCTAGGCGTCGACGATCTAGCGTC GACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGATAGAGAACACCCT CTTTTGTGTTTTGGCCACTGACTGACACAAAAGAGTGTTCTCTATCAGGACACA AGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCAGATCCGATCTTTTTCC CTCTGCCAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCCTGAGCATCTGACTTCTGG CTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCT CTCACTCGATCGCGGCCGC
170	miR6 ACGCGTTACAGAAACCAAGAAAGCACCATAGCGTTTGCCTTCAACTGCTTCCCA ACTTGTTTTCTCTTCCAATTTGATTGTGGTTTCCCTCTCCAGAAGGAACTCCAC AGTACTTAGCGTTGGCCACATAGTAGGTTCTCAAATACTTGTTAATAAATAAGT TTGTTTCGAGAAGCTGGGCAATGATATTCTACAGCTGGAAGAAGAAACATAATGA TCTAGTAATTAGCTCATTAATAAATAACGTTCTTCTTTCCTCAGAGGAGCATTT CCAAGGCCTGCCTTGATAGCCATCCAAAAGGCCAAGCTCATCCAATCTTGCC CTAGATTTATGCTAAAAATGCAGTTACAATCGATAGGATGACAGAAAACGACAGC ACTTATTTAAATATAATAGGCACTTATTTAAATAGGAGAAGCTGTGACTTCATA GCAAGTGTTGGGGTTAGGAAACTGGGTGGATAAACTTGCTGATGCTGTAGATCT TAGCCTCTACATGAGATCATGTGGAATACTGAAAGCATTTTAGGTTCTTTATG TTTGCAATCAAATAACTGTACACCTTTTAATTTAAAAAGTACCATGAGGCACAC ACACACACTCGCAGGAACTTTTTGGCGTAACAAAACCTAGAATTAGATCTAAAGC

	TAACTGTAGGACTGAGTCTATTCTAAACTGAAAGCCTGGACATCTGGAGTACCA GGGGGAGATGACGTGTTACGGGCTTCCATAAAAGCAGCTGGCTTTGAATGGAAG GAGCCAAGAGGCCAGCACAGGAGCGGATTTCGTGCTTTTCACGGCCATCGAGCCG AACCTCTCGCAAGTCCGTGAGCCGTTAAGGAGGCCCCAGTCCCGACCCTTCGC CCAAGCCCCCTCGGGGTCCCCGGGCTGGTACTCCTTGCCACACGGGAGGGGCG CGGAAGCCGGGGCGGAGGAGGAGCCAACCCCGGGCTGGGCTGAGACCCGAGAG GAAGACGCTCTAGGGATTTGTCCCGGACTAGCGAGATGGCAAGGCTGAGGACGG GAGGCTGATTGAGAGGCGAAGGTACACCCTAATCTCAATACAACCTTTGGAGCT AAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCACGTCCCTTCCAGGCGGCCTCCCC GTCACCACCCCCCAACCCGCCCGACCGGAGCTGAGAGTAATTCATACAAAA GGAATCGCCCCCTGCCTTGGGGAATCCAGGGACCGTCGTTAAACTCCCCTAAC GTAGAACCAGAGATCGCTGCGTTCCTCGCCCCCTCACCCGCCCGCTCTCGTCAT CACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAG CGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAAGTTGGGGGGAGGGGTGGCAATTGAACC GGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGG CTCCGCCTTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCC GTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTG TGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGA ATTACTTCCACGCCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGT TGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCG TGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTG GCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTT TTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGG CCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGC CCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACC GAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCT CGCGCCCGCTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGTTCGGCACC AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAA ATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAA AAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGC GCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGG TTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGTTCAAAGTTTTTT TCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGAAAACAAACCCTAGGCGTCGACGATCTAGCGTC GACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTAGAGAACACCCTC TTTTGTGTTTTTGGCCACTGACTGACGACAAAAGGGTGTCTCTACAGGACACA AGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCAGATCCGATCTTTTTCC CTCTGCCAAAATTTATGGGGACATCATGAAGCCCCCTGAGCATCTGACTTCTGG CTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCT CTCACTCGATCGCGGCCGC
171	miR7 ACGCGTTACAGAAACCAAGAAAGCACCATAGCGTTTGCCTTCAACTGCTTCCCA ACTTGTTTTCTCTTCCAATTTGATTGTGGTTTTCTCTCCAGAAGGAACTCCAC AGTACTTAGCGTTGGCCACATAGTAGGTTCTCAAATACTTGTTAATAAATAAGT TTGTTTCGAGAAGCTGGGCAATGATATTCTACAGCTGGAAGAAGAAACATAATGA TCTAGTAATTAGCTCATTAATAAATAACGTTCTTCTTTCCTCAGAGGAGCATTT CCAAGGCCTGCCTTGATAGCCATCCAAAAGGCCAAGCTCATCCAATCTTGCC CTAGATTTATGCTAAAAATGCAGTTACAATCGATAGGATGACAGAAAACGACAGC ACTTATTTAAATATAATAGGCACTTATTTAAATAGGAGAAGCTGTGACTTCATA GCAAGTGTTGGGGTTAGGAACTGGGTGGATAAACTTGCTGATGCTGTAGATCT TAGCCTCTACATGAGATCATGTGGAATACTGAAAGCATTTTAGGTTCTTTATG TTTGCAATCAAATAACTGTACACCTTTTAATTTAAAAAGTACCATGAGGCACAC ACACACACTCGCAGGAACTTTTTGGCGTAACAAAACCTAGAATTAGATCTAAAGC

	TAACTGTAGGACTGAGTCTATTCTAAACTGAAAGCCTGGACATCTGGAGTACCA GGGGGAGATGACGTGTTACGGGCTTCCATAAAAGCAGCTGGCTTTGAATGGAAG GAGCCAAGAGGCCAGCACAGGAGCGGATTTCGTCGCTTTCACGGCCATCGAGCCG AACCTCTCGCAAGTCCGTGAGCCGTTAAGGAGGCCCCAGTCCCGACCCTTCGC CCAAGCCCCCTCGGGGTCCCCGGGCTGGTACTCCTTGCCACACGGGAGGGGCG CGGAAGCCGGGGCGGAGGAGGAGCCAACCCCGGGCTGGGCTGAGACCCGAGAG GAAGACGCTCTAGGGATTTGTCCCGGACTAGCGAGATGGCAAGGCTGAGGACGG GAGGCTGATTGAGAGGCGAAGGTACACCCTAATCTCAATACAACCTTTGGAGCT AAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCACGTCCCTTCCAGGCGGCCTCCCC GTCACCACCCCCCAACCCGCCCGACCGGAGCTGAGAGTAATTCATACAAAA GGAATCGCCCCCTGCCTTGGGGAATCCAGGGACCGTCGTTAAACTCCCCTAAC GTAGAACCAGAGATCGCTGCGTTCGCGCCCCCTCACCCGCCCGCTCTCGTCAT CACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAG CGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAAGTTGGGGGGAGGGGTGGCAATTGAACC GGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGG CTCCGCCTTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCC GTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTG TGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGA ATTACTTCCACGCCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGT TGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCG TGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTG GCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTT TTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGG CCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGC CCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACC GAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCT CGCGCCCGCTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGTTCGGCACC AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAA ATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAA AAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGC GCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGG TTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGTTCAAAGTTTTTT TCTTCCATTTAGGTGTCGTGAAAACAAACCCTAGGCGTCGACGATCTAGCGTC GACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTCCTTTTTGACAAA GCCAGTGGTTTTTGGCCACTGACTGACCCTGGCTGTCAAAAAGGACAGGACACA AGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCAGATCCGATCTTTTTCC CTCTGCCAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCCTGAGCATCTGACTTCTGG CTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCT CTCACTCGATCGCGGCCGC
172	miR8 ACGCGTTACAGAAACCAAGAAAGCACCATAGCGTTTGCCTTCAACTGCTTCCCA ACTTGTTTTCTCTTCCAATTTGATTGTGGTTTTCTCTCCAGAAGGAACTCCAC AGTACTTAGCGTTGGCCACATAGTAGGTTCTCAAATACTTGTTAATAAATAAGT TTGTTTCGAGAAGCTGGGCAATGATATTCTACAGCTGGAAGAAGAAACATAATGA TCTAGTAATTAGCTCATTAATAAATAACGTTCTTCTTTCCTCAGAGGAGCATTT CCAAGGCCTGCCTTGATAGCCATCCAAAAGGCCAAGCTCATCCAATCTTGCC CTAGATTTATGCTAAAAATGCAGTTACAATCGATAGGATGACAGAAAACGACAGC ACTTATTTAAATATAATAGGCACTTATTTAAATAGGAGAAGCTGTGACTTCATA GCAAGTGTTGGGGTTAGGAACTGGGTGGATAAACTTGCTGATGCTGTAGATCT TAGCCTCTACATGAGATCATGTGGAATACTGAAAGCATTTTAGGTTCTTTATG TTTGCAATCAAATAACTGTACACCTTTTAATTTAAAAAGTACCATGAGGCACAC ACACACACTCGCAGGAACTTTTTGGCGTAACAAAACCTAGAATTAGATCTAAAGC

	TAACTGTAGGACTGAGTCTATTCTAAACTGAAAGCCTGGACATCTGGAGTACCA GGGGGAGATGACGTGTTACGGGCTTCCATAAAAGCAGCTGGCTTTGAATGGAAG GAGCCAAGAGGCCAGCACAGGAGCGGATTTCGTGCTTTTCACGGCCATCGAGCCG AACCTCTCGCAAGTCCGTGAGCCGTTAAGGAGGCCCCAGTCCCGACCCTTCGC CCAAGCCCCCTCGGGGTCCCCGGGCTGGTACTCCTTGCCACACGGGAGGGGCG CGGAAGCCGGGGCGGAGGAGGAGCCAACCCCGGGCTGGGCTGAGACCCGAGAG GAAGACGCTCTAGGGATTTGTCCCGGACTAGCGAGATGGCAAGGCTGAGGACGG GAGGCTGATTGAGAGGCGAAGGTACACCCTAATCTCAATACAACCTTTGGAGCT AAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCACGTCCCTTCCAGGCGGCCTCCCC GTCACCACCCCCCAACCCGCCCGACCGGAGCTGAGAGTAATTCATACAAAA GGAATCGCCCCCTGCCTTGGGGAATCCAGGGACCGTCGTTAAACTCCCCTAAC GTAGAACCAGAGATCGCTGCGTTCGCGCCCCCTCACCCGCCCGCTCTCGTCAT CACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAG CGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGGCAATTGAACC GGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAAGTGATGTCGTGTACTGG CTCCGCCTTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCC GTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTG TGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGA ATTACTTCCACGCCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGT TGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCG TGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTG GCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTT TTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGG CCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGC CCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACC GAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCT CGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCC AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAA ATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAA AAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGC GCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGG TTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGTTCAAAGTTTTTT TCTTCCATTTAGGTGTCGTGAAAACAAACCCTAGGCGTCGACGATCTAGCGTC GACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTTTTGACAAAGCCA GTGGCTGGTTTTGGCCACTGACTGACCAGCCACTCTTTGTCAAAACAGGACACA AGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCAGATCCGATCTTTTTCC CTCTGCCAAAATTTATGGGGACATCATGAAGCCCCCTGAGCATCTGACTTCTGG CTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCT CTCACTCGATCGCGGCCGC
173	miR10 ACGCGTTACAGAAACCAAGAAAGCACCATAGCGTTTGCCTTCAACTGCTTCCCA ACTTGTTTTCTCTTCCAATTTGATTGTGGTTTCCCTCTCCAGAAGGAACTCCAC AGTACTTAGCGTTGGCCACATAGTAGGTTCTCAAATACTTGTTAATAAATAAGT TTGTTTCGAGAAGCTGGGCAATGATATTCTACAGCTGGAAGAAGAAACATAATGA TCTAGTAATTAGCTCATTAATAAATAACGTTCTTCTTTCCTCAGAGGAGCATTT CCAAGGCCTGCCTTGATAGCCATCCAAAAGGCCAAGCTCATCCAATCTTGCC CTAGATTTATGCTAAAAATGCAGTTACAATCGATAGGATGACAGAAAACGACAGC ACTTATTTAAATATAATAGGCACTTATTTAAATAGGAGAAGCTGTGACTTCATA GCAAGTGTTGGGGTTAGGAAACTGGGTGGATAAACTTGCTGATGCTGTAGATCT TAGCCTCTACATGAGATCATGTGGAATACTGAAAGCATTTTAGGTTCTTTATG TTTGCAATCAAATAACTGTACACCTTTTAATTTAAAAAGTACCATGAGGCACAC ACACACACTCGCAGGAACTTTTTGGCGTAACAAAACCTAGAATTAGATCTAAAGC

	TAACTGTAGGACTGAGTCTATTCTAAACTGAAAGCCTGGACATCTGGAGTACCA GGGGGAGATGACGTGTTACGGGCTTCCATAAAAGCAGCTGGCTTTGAATGGAAG GAGCCAAGAGGCCAGCACAGGAGCGGATTTCGTGCTTTTCACGGCCATCGAGCCG AACCTCTCGCAAGTCCGTGAGCCGTTAAGGAGGCCCCAGTCCCGACCCTTCGC CCAAGCCCCCTCGGGGTCCCCGGGCTGGTACTCCTTGCCACACGGGAGGGGCG CGGAAGCCGGGGCGGAGGAGGAGCCAACCCCGGGCTGGGCTGAGACCCGAGAG GAAGACGCTCTAGGGATTTGTCCCGGACTAGCGAGATGGCAAGGCTGAGGACGG GAGGCTGATTGAGAGGCGAAGGTACACCCTAATCTCAATACAACCTTTGGAGCT AAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCACGTCCCTTCCAGGCGGCCTCCCC GTCACCACCCCCCAACCCGCCCCGACCGGAGCTGAGAGTAATTCATACAAAA GGAATCGCCCCCTGCCTTGGGGAATCCAGGGACCGTCGTTAAACTCCCCTAAC GTAGAACCAGAGATCGCTGCGTTCCCGCCCCCTCACCCGCGGCTCTCGTCAT CACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAG CGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGGCAATTGAACC GGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAAGTGATGTCGTGTACTGG CTCCGCCTTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCC GTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTG TGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGA ATTACTTCCACGCCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGT TGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCG TGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTG GCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTT TTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGG CCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGC CCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACC GAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCT CGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCC AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAA ATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAA AAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGC GCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGG TTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGTTCAAAGTTTTTT TCTTCCATTTAGGTGTCGTGAAAACAAACCCTAGGCGTCGACGATCTAGCGTC GACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTCCTCCAACATTTG TCACTTGGTTTTTGGCCACTGACTGACCAAGTGACATGTTGGAGGACAGGACACA AGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCAGATCCGATCTTTTTCC CTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCCTGAGCATCTGACTTCTGG CTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCT CTCACTCGATCGCGGCCGC
174	miR11 ACGCGTTACAGAAACCAAGAAAGCACCATAGCGTTTGCCTTCAACTGCTTCCCA ACTTGTTTTCTCTTCCAATTTGATTGTGGTTTTCTCTCCAGAAGGAACTCCAC AGTACTTAGCGTTGGCCACATAGTAGGTTCTCAAATACTTGTTAATAAATAAGT TTGTTTCGAGAAGCTGGGCAATGATATTCTACAGCTGGAAGAAGAAACATAATGA TCTAGTAATTAGCTCATTAATAAATAACGTTCTTCTTTCCTCAGAGGAGCATTT CCAAGGCCTGCCTTGATAGCCATCCAAAAGGCCAAGCTCATCCAATCTTGCC CTAGATTTATGCTAAAAATGCAGTTACAATCGATAGGATGACAGAAAACGACAGC ACTTATTTAAATATAATAGGCACTTATTTAAATAGGAGAAGCTGTGACTTCATA GCAAGTGTTGGGGTTAGGAAACTGGGTGGATAAACTTGCTGATGCTGTAGATCT TAGCCTCTACATGAGATCATGTGGAATACTGAAAGCATTTTAGGTTCTTTATG TTTGCAATCAAATAACTGTACACCTTTTAATTTAAAAAGTACCATGAGGCACAC ACACACACTCGCAGGAACTTTTTGGCGTAACAAAACCTAGAATTAGATCTAAAGC

	TAACTGTAGGACTGAGTCTATTCTAAACTGAAAGCCTGGACATCTGGAGTACCA GGGGGAGATGACGTGTTACGGGCTTCCATAAAAGCAGCTGGCTTTGAATGGAAG GAGCCAAGAGGCCAGCACAGGAGCGGATTTCGTGCTTTTCACGGCCATCGAGCCG AACCTCTCGCAAGTCCGTGAGCCGTTAAGGAGGCCCCAGTCCCGACCCTTCGC CCAAGCCCCCTCGGGGTCCCCGGGCTGGTACTCCTTGCCACACGGGAGGGGCG CGGAAGCCGGGGCGGAGGAGGAGCCAACCCCGGGCTGGGCTGAGACCCGAGAG GAAGACGCTCTAGGGATTTGTCCCGGACTAGCGAGATGGCAAGGCTGAGGACGG GAGGCTGATTGAGAGGCGAAGGTACACCCTAATCTCAATACAACCTTTGGAGCT AAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCACGTCCCTTCCAGGCGGCCTCCCC GTCACCACCCCCCAACCCGCCCGACCGGAGCTGAGAGTAATTCATACAAAA GGAATCGCCCCCTGCCTTGGGGAATCCAGGGACCGTCGTTAAACTCCCCTAAC GTAGAACCAGAGATCGCTGCGTTCGCGCCCCCTCACCCGCCCGCTCTCGTCAT CACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAG CGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGGCAATTGAACC GGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGG CTCCGCCTTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCC GTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTG TGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGA ATTACTTCCACGCCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGT TGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCG TGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTG GCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTT TTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGG CCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGC CCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACC GAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCT CGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCC AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAA ATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAA AAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGC GCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGG TTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGTTCAAAGTTTTTTT TCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGAAAACAAACCCTAGGCGTCGACGATCTAGCGTC GACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGATTTGTCACTTGCT CTTTGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCAAGAAAGTGACAAATCAGGACACA AGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCAGATCCGATCTTTTTCC CTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCCTGAGCATCTGACTTCTGG CTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCT CTCACTCGATCGCGGCCGC
Ácido nucleico viral	
175	rAAV-EFla-miR3 CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGGC ACCTTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTTCTACGCGTTACAGAAACCAAGAAAGCACCATAGC GTTTGCCTTCAACTGCTTCCCACTTGTTTTCTCTTCCAATTTGATTGTGGTT TCCTCTCCAGAAGGAACCTCCACAGTACTTAGCGTTGGCCACATAGTAGGTTCTC AAATACTTGTTAATAAATAAGTTTGTTCGAGAAGCTGGGCAATGATATTCTACA GCTGGAAGAAGAAACATAATGATCTAGTAATTAGCTCATTAAAAATAAACGTTT TTCTTTTCTCAGAGGAGCATTTCCTCAAGGCCTGCCTTGATAGCCATCCAAAAAG GCCAAGCTCATCCAATCTTGCCCTAGATTTATGCTAAAATGCAGTTACAATCGA TAGGATGACAGAAAACGACAGCACTTATTTAAATATAATAGGCCTTATTTAAA TAGGAGAAGCTGTGACTTCATAGCAAGTGTGGGGTTAGGAACTGGGTGGATA

	AACTTGCTGATGCTGTAGATCTTAGCCTCTACATGAGATCATGTGGAAAATCTG AAAGCATTTTAGGTTCCCTTATGTTTGCAATCAAATAACTGTACACCTTTTAATT TAAAAAGTACCATGAGGCACACACACACTCGCAGGAACCTTTTGGCGTAACA AAACTAGAATTAGATCTAAAGCTAACTGTAGGACTGAGTCTATTCTAAACTGAA AGCCTGGACATCTGGAGTACCAGGGGGAGATGACGTGTTACGGGCTTCCATAAA AGCAGCTGGCTTTGAATGGAAGGAGCCAAGAGGCCAGCACAGGAGCGGATTTCGT CGCTTTCACGGCCATCGAGCCGAACCTCTCGCAAGTCCGTGAGCCGTTAAGGAG GCCCCAGTCCCGACCTTTCGCCCCAAGCCCCTCGGGGTCCCCGGGCCTGGTAC TCCTTGCCACACGGGAGGGGCGCGGAAGCCGGGGCGGAGGAGGAGCCAACCCCG GGCTGGGCTGAGACCCGCAGAGGAAGACGCTCTAGGGATTTGTCCCGGACTAGC GAGATGGCAAGGCTGAGGACGGGAGGCTGATTGAGAGGCGAAGGTACACCCTAA TCTCAATACAACCTTTGGAGCTAAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCAC GTCCCTTCCAGGCGGCCTCCCCGTCAACACCCCCCAACCCGCCCCGACCGGA GCTGAGAGTAATTATACAAAAGGACTCGCCCCTGCCTTGGGGAATCCCAGGGA CCGTCGTAAACTCCCACTAACGTAGAACCCAGAGATCGCTGCGTTCCCGCCCC CTCACCCGCCCCGTCTCGTCATCACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTC CGGTGCCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG GGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTG GGAAAGTGATGTGCTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACC GTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGA TTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCG CTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGG GCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATA AGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGC AAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTG GGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGC GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCC GGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGG CAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCG GCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGG GTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTGCTTTCAT GTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCT TTTGGAGTACGTGCTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTC CCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAAT TCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGTTTCATTCTCAAGCCTC AGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGAAAACAAACCC TAGGCGTCGACGATCTAGCGTCGACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCT GTATGCTGTTTGTCACTTGCTCTTTGGTCGTTTTGGCCACTGACTGACGACAA AGCAAGTGACAAACAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAAT GGCCCAGATCCGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATATGGGGACATCATGAAGC CCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAAATTTATTTTCATTGCAATAG TGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGATCGCGGCCGAGGAACCCCTAGT GATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCG ACCAAAGTTCGCCCAGCGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGC
176	rAAV-EFla-miR5 CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCG ACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTCCCTACGCGTTACAGAAACCAAGAAAGCACCATAGC GTTTGCCTTCAACTGCTTCCCACTTGTTTTCTCTTCCAATTTGATTGTGGTT TCCTCTCCAGAAGGAACCCACAGTACTTAGCGTTGGCCACATAGTAGGTTCTC AAATACTTGTTAATAAATAAGTTTGTTCGAGAAGCTGGGCAATGATATTCTACA

	GCTGGAAGAAGAAACATAATGATCTAGTAATTAGCTCATTAAAAATAAACGTTCTTCTTTCCCTCAGAGGAGCATTTCCCAAGGCCTGCCTTGATAGCCATCCAAAAAGGCCAAGCTCATCCAATCTTGCCCTAGATTTATGCTAAAATGCAGTTACAATCGATAGGATGACAGAAAACGACAGCACTTATTTAAATATAATAGGCACTTATTTAAATAGGAGAAGCTGTGACTTCATAGCAAGTGTTGGGGTTAGGAAACTGGGTGGATAAAGTCTGCTGATGCTGTAGATCTTAGCCTCTACATGAGATCATGTGGAAAATCTGAAAGCATTTTAGGTTCCCTTATGTTTGCAATCAAATAACTGTACACCTTTTAATTAAAAAGTACCATGAGGCACACACACACTCGCAGGAACCTTTTGGCGTAACAAACTAGAAATTAGATCTAAAGCTAACTGTAGGACTGAGTCTATTCTAAACTGAAAGCCTGGACATCTGGAGTACCAGGGGGAGATGACGTGTTACGGGCTTCCATAAAAGCAGCTGGCTTTGAATGGAAGGAGCCAAGAGGCCAGCACAGGAGCGGATTTCGTCGCTTTCACGGCCATCGAGCCGAACCTCTCGCAAGTCCGTGAGCCGTTAAGGAGGCCCCAGTCCCGACCCCTTCGCCCAAGCCCTCGGGGTCCCGGGCCTGGTACTCCTTGCCACACGGGAGGGGCGCGGAAGCCGGGGCGGAGGAGGAGCCAACCCCGGGCTGGGCTGAGACCCGCAGAGGAAGACGCTCTAGGGATTTGTCCCGGACTAGCGAGATGGCAAGGCTGAGGACGGGAGGCTGATTGAGAGGCGAAGGTACACCCTAATCTCAATACAACCTTTGGAGCTAAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCACGTCCCTTCCAGGCGGCCCTCCCCGTCAACACCCCCCCCCAACCCGCCCGACCCGGAAGTCTGAGAGTAATTCATACAAAAGGACTCGCCCCCTGCCTTGGGGAATCCCAGGGACCGTCGTAAACTCCCACTAACGTAGAACCCAGAGATCGCTGCGTTCCCGCCCCCTCACCCGCCCGCTCTCGTCATCACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACC GTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCGAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCGCTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGGGGCCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAAGTTCGCGTGAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGTGAGTCAACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGAGTACGTCGTCTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAAT TCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTGCTGAAAACAAACCC TAGGCGTCGACGATCTAGCGTCGACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGATAGAGAACACCCTCTTTTGTGTTTTGGCCACTGACTGACACAAAA GAGTGTTCTCTATCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCAGATCCGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGATCGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGC
177	rAAV-EFla-miR6 CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTTCGGGCG

	ACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTCTACGCGTTACAGAAACCAAGAAAGCACCATAGC GTTTGCCTTCAACTGCTTCCCAACTTGTTTTCTCTTCCAATTTGATTGTGGTT TCCTCTCCAGAAGGAACCTCCACAGTACTTAGCGTTGGCCACATAGTAGGTTCTC AAATACTTGTTAATAAATAAGTTTTGTTTCGAGAAGCTGGGCAATGATATTCTACA GCTGGAAGAAGAAACATAATGATCTAGTAATTAGCTCATTAAAAATAAACGTTT TTCTTTTCTCAGAGGAGCATTTTCCCAAGGCCTGCCTTGATAGCCATCCAAAAAG GCCAAGCTCATCCAATCTTGCCCTAGATTTATGCTAAAATGCAGTTACAATCGA TAGGATGACAGAAAACGACAGCACTTATTTAAATATAATAGGCACCTTATTTAAA TAGGAGAAGCTGTGACTTCATAGCAAGTGTTGGGGTTAGGAACTGGGTGGATA AACTTGCTGATGCTGTAGATCTTAGCCTCTACATGAGATCATGTGGAAAATCTG AAAGCATTTTAGGTTCCCTTATGTTTGCAATCAAATAACTGTACACCTTTTAATT TAAAAAGTACCATGAGGCACACACACACACTCGCAGGAACTTTTTGGCGTAACA AAACTAGAATTAGATCTAAAGCTAACTGTAGGACTGAGTCTATTCTAAACTGAA AGCCTGGACATCTGGAGTACCAGGGGGAGATGACGTGTTACGGGCTTCCATAAA AGCAGCTGGCTTTGAATGGAAGGAGCCAAGAGGCCAGCACAGGAGCGGATTCTGT CGCTTTTACGGCCATCGAGCCGAACCTCTCGCAAGTCCGTGAGCCGTTAAGGAG GCCCCCAGTCCCGACCCCTTCGCCCCAAGCCCCCTCGGGGTCCCCGGGCCTGGTAC TCCTTGCCACACGGGAGGGGCGCGGAAGCCGGGGCGGAGGAGGAGCCAACCCCCG GGCTGGGCTGAGACCCGCAGAGGAAGACGCTCTAGGGATTTGTCCCGGACTAGC GAGATGGCAAGGCTGAGGACGGGAGGCTGATTGAGAGGCGAAGGTACACCCTAA TCTCAATACAACCTTTGGAGCTAAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCAC GTCCCTTCCAGGCGGCCTCCCCGTCAACACCCCCCCCCAACCCGCCCGACCGGA GCTGAGAGTAATTCATACAAAAGGACTCGCCCCCTGCCTTGGGGAATCCCAGGGA CCGTGCTTAACTCCCACTAACGTAGAACCCAGAGATCGCTGCGTTCCCGCCCC CTCACCCGCCGCTCTCGTCATCACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTC CGGTGCCCCGTAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG GGGAGGGGTGCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTG GGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACC GTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTTGCCGC CAGAACACAGGTAAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCCTGGCTGCAGTACGTGA TTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCG CTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGG GCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATA AGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGC AAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTG GGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGC GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCC GGCCTGCTCTGGTGCCCTGGCCTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGG CAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCG GCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGG GTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTGCTTCAT GTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCT TTTGAGTACGTGCTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTC CCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAAT TCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCAATTCTCAAGCCTC AGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGAAAACAAACCC TAGGCGTCGACGATCTAGCGTCGACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCT GTATGCTGTAGAGAACACCCTCTTTTGTGCTTTTGGCCACTGACTGACGACAAA AGGGTGTTCTCTACAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAAT GGCCAGATCCGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGC CCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAG TGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGATCGCGGCCGAGGAACCCCTAGT
--	---

	GATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCG ACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGC
178	rAAV-EF1a-miR7 CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCG ACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTCCCTACGCGTTACAGAAACCAAGAAAGCACCATAGC GTTTGCCTTCAACTGCTTCCCAACTTGTTTTCTCTTCCAATTTGATTGTGGTT TCCTCTCCAGAAGGAACCTCCACAGTACTTAGCGTTGGCCACATAGTAGGTTCTC AAATACTTGTTAATAAATAAGTTTGTTCGAGAAGCTGGGCAATGATATTCTACA GCTGGAAGAAGAAACATAATGATCTAGTAATTAGCTCATTAAAAATAAACGTTCT TTCTTTCTCAGAGGAGCATTTCCTCAAGGCCTGCCTTGATAGCCATCCAAAAAG GCCAAGCTCATCCAATCTTGCCCTAGATTTATGCTAAAATGCAGTTACAATCGA TAGGATGACAGAAAACGACAGCACTTATTTAAATATAATAGGCACTTATTTAAA TAGGAGAAGCTGTGACTTCATAGCAAGTGTTGGGGTTAGGAACTGGGTGGATA AACTTGCTGATGCTGTAGATCTTAGCCTCTACATGAGATCATGTGGAATCTG AAAGCATTTTAGGTTCCCTTATGTTTGCAATCAAATAACTGTACACCTTTTAATT TAAAAAGTACCATGAGGCACACACACACACTCGCAGGAACTTTTTGGCGTAACA AAACTAGAATTAGATCTAAAGCTAACTGTAGGACTGAGTCTATTCTAAACTGAA AGCCTGGACATCTGGAGTACCAGGGGGAGATGACGTGTTACGGGCTTCCATAAA AGCAGCTGGCTTTGAATGGAAGGAGCCAAGAGGCCAGCACAGGAGCGGATTCTGT CGCTTTCACGGCCATCGAGCCGAACCTCTCGCAAGTCCGTGAGCCGTTAAGGAG GCCCCCAGTCCCGACCTTCGCCCCAAGCCCCTCGGGGTCCCCGGGCTGGTAC TCCTTGCCACACGGGAGGGGCGCGGAAGCCGGGGCGGAGGAGGAGCCAACCCCG GGCTGGGCTGAGACCCGCAGAGGAAGACGCTCTAGGGATTTGTCCCGGACTAGC GAGATGGCAAGGCTGAGGACGGGAGGCTGATTGAGAGGCGAAGGTACACCCTAA TCTCAATACAACCTTTGGAGCTAAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCAC GTCCCTTCCAGGCGGCCTCCCCGTCAACACCCCCCCCCAACCCGCCCGACCGGA GCTGAGAGTAATTCATACAAAAGGACTCGCCCCTGCCTTGGGGAATCCCAGGGA CCGTGCTTAAACTCCCACTAACGTAGAACCCAGAGATCGCTGCGTTCCCGCCCC CTCACCCGCCGCTCTCGTCATCACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTC CGGTGCCCCTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG GGGAGGGGTGCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTG GGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCTTTTTCCTCGAGGGTGGGGGAGAACC GTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG TTATGGCCCTTGCGTGCCCTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGA TTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCG CTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGG GCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATA AGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTGTGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGC AAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTG GGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGC GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCC GGCCTGCTCTGGTGCCCTGGCCTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGG CAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCCG GCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGG GTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTGCTTCAT GTGACTCCACGGAGTACGGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCT TTTGGAGTACGTGCTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTC CCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAAT TCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCAATTCTCAAGCCTC AGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGAAAACAAACC TAGGCGTCGACGATCTAGCGTCGACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCT

	GTATGCTGTCCTTTTTGACAAAGCCAGTGGTTTTGGCCACTGACTGACCACTGG CTGTCAAAAAGGACAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAAT GGCCAGATCCGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGC CCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAG TGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGATCGCGGCCGAGGAACCCCTAGT GATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCG ACCAAAGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGC
179	rAAV-EFla-miR8 CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCG ACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTCCCTACGCGTTACAGAAACCAAGAAAGCACCATAGC GTTTGCCCTTCAACTGCTTCCCACTTGTTTTCTCTTCCAATTTGATTGTGGTT TCCTCTCCAGAAGGAATCCACAGTACTTAGCGTTGGCCACATAGTAGGTTCTC AAATACTTGTTAATAAATAAGTTTGTTCGAGAAGCTGGGCAATGATATTCTACA GCTGGAAGAAGAAACATAATGATCTAGTAATTAGCTCATTAATAAATAAACGTTT TTCTTTTCTCAGAGGAGCATTTCCCAAGGCCTGCCTTGATAGCCATCCAAAAAG GCCAAGCTCATCCAATCTTGCCCTAGATTTATGCTAAAATGCAGTTACAATCGA TAGGATGACAGAAAACGACAGCACTTATTTAAATATAATAGGCCTTATTTAAA TAGGAGAAGCTGTGACTTCATAGCAAGTGTTGGGGTTAGGAACTGGGTGGATA AACTTGCTGATGCTGTAGATCTTAGCCTCTACATGAGATCATGTGGAATCTG AAAGCATTTTAGGTTCTTATGTTTGCAATCAAATAACTGTACACCTTTTAATT TAAAAAGTACCATGAGGCACACACACACTCGCAGGAACTTTTTGGCGTAACA AAACTAGAATTAGATCTAAAGCTAACTGTAGGACTGAGTCTATTCTAACTGAA AGCCTGGACATCTGGAGTACCAGGGGGAGATGACGTGTTACGGGCTTCCATAAA AGCAGCTGGCTTTGAATGGAAGGAGCCAAGAGGCCAGCACAGGAGCGGATTCTG CGCTTTCACGGCCATCGAGCCGAACCTCTCGCAAGTCCGTGAGCCGTTAAGGAG GCCCCCAGTCCCGACCTTCGCCCAAGCCCCTCGGGGTCCCCGGGCCTGGTAC TCCTTGCCACACGGGAGGGGCGCGGAAGCCGGGGCGGAGGAGGAGCCAACCCCG GGCTGGGCTGAGACCCGCGAGAGGAAGACGCTCTAGGGATTTGTCCCGGACTAGC GAGATGGCAAGGCTGAGGACGGGAGGCTGATTGAGAGGCGAAGGTACACCCTAA TCTCAATACAACCTTTGGAGCTAAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCAC GTCCCTTCCAGGCGGCCTCCCCGTCACCACCCCCCCCCAACCCGCCCCGACCGGA GCTGAGAGTAATTCATACAAAAGGACTCGCCCCCTGCCTTGGGGAATCCCAGGGA CCGTCGTAAACTCCCACTAACGTAGAACCAGAGATCGCTGCGTTCCCGCCCC CTACCCGCCCCTCTCGTCATCACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTC CGGTGCCCCGTAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG GGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTG GGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACC GTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGG TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGA TTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCG CTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGCGCGCTGGG GCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATA AGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGC AAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTG GGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGC GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCC GGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGG CAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCG GCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGG GTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTGCTTCAT GTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCT

	TTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTC CCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAAT TCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTC AGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTACAGGTGTCGTGAAAACAAACCC TAGGCGTCGACGATCTAGCGTCGACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCT GTATGCTGTTTTGACAAAGCCAGTGGCTGGTTTTGGCCACTGACTGACCAGCCA CTCTTTGTCAAACAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAAT GGCCAGATCCGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGC CCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAG TGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGATCGCGGCCGAGGAACCCCTAGT GATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCG ACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGC
180	rAAV-EFla-miR10 CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCG ACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTCCCTACGCGTTACAGAAACCAAGAAAGCACCATAGC GTTTGCCTTCAACTGCTTCCCAACTTGTTTTCTCTTCCAATTTGATTGTGGTT TCCTCTCCAGAAGGAACCTCCACAGTACTTAGCGTTGGCCACATAGTAGGTTCTC AAATACTTGTTAATAAATAAGTTTGTTCGAGAAGCTGGGCAATGATATTCTACA GCTGGAAGAAGAAACATAATGATCTAGTAATTAGCTCATTAAAAATAAACGTTT TTCTTTTCTCAGAGGAGCATTTCCTCAAGGCCTGCCTTGATAGCCATCCAAAAAG GCCAAGCTCATCCAATCTTGCCCTAGATTTATGCTAAAATGCAGTTACAATCGA TAGGATGACAGAAAACGACAGCACTTATTTAAATATAATAGGCACTTATTTAAA TAGGAGAAGCTGTGACTTCATAGCAAGTGTGGGGTTAGGAACTGGGTGGATA AACTTGCTGATGCTGTAGATCTTAGCCTCTACATGAGATCATGTGGAAAATCTG AAAGCATTTTAGGTTCCCTATGTTTGCAATCAAATAACTGTACACCTTTTAATT TAAAAAGTACCATGAGGCACACACACACTCGCAGGAACTTTTTGGCGTAACA AAAGTAGAATTAGATCTAAAGCTAACTGTAGGACTGAGTCTATTCTAAACTGAA AGCCTGGACATCTGGAGTACCAGGGGGAGATGACGTGTTACGGGCTTCCATAAA AGCAGCTGGCTTTGAATGGAAGGAGCCAAGAGGCCAGCACAGGAGCGGATTCTGT CGCTTTTACGGCCATCGAGCCGAACCTCTCGCAAGTCCGTGAGCCGTTAAGGAG GCCCCAGTCCCGACCTTTCGCCCCAAGCCCTCGGGGTCCCCGGGCTTGGTAC TCCTTGCCACACGGGAGGGGCGCGGAAGCCGGGGCGGAGGAGGAGCCAACCCCG GGCTGGGCTGAGACCCGAGAGGAAGACGCTCTAGGGATTTGTCCCGGACTAGC GAGATGGCAAGGCTGAGGACGGGAGGCTGATTGAGAGGCGAAGGTACACCCTAA TCTCAATACAACCTTTGGAGCTAAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCAC GTCCCTTCCAGGCGGCCTCCCCGTCAACACCCCCCAACCCGCCCCGACCGGA GCTGAGAGTAATTATACAAAAGGACTCGCCCCCTGCCTTGGGGAATCCCAGGGA CCGTCGTTAAACTCCCACTAACGTAGAACCCAGAGATCGCTGCGTTCCCGCCCC CTCACCCGCCCCGTCTCGTCATCACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTC CGGTGCCCCGTGAGTGGGACAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG GGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTG GGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACC GTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCCTGGCTGCAGTACGTGA TTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCG CTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGG GCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATA AGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGC AAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTG GGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGC GGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCC

	GGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGG CAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCCG GCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGG GTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCAT GTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCT TTTGAGGTACGTCTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTC CCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAAT TCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTTATTCTCAAGCCTC AGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGAAAACAAACCC TAGGCGTCGACGATCTAGCGTCGACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCT GTATGCTGTCCTCCAACATTTGTCACTTGGTTTTGGCCACTGACTGACCAAGTG ACATGTTGGAGGACAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAAT GGCCCAGATCCGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATATGGGGACATCATGAAGC CCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAG TGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGATCGCGGCCGAGGAACCCCTAGT GATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCG ACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGC
181	rAAV-EF1a-miR11 CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCG ACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTCCCTACGCGTTACAGAAACCAAGAAAGCACCATAGC GTTTGCCCTTCAACTGCTTCCCACTTGTTCCTCTTCCAATTTGATTGTGGTT TCCTCTCCAGAAGGAACCTCCACAGTACTTAGCGTTGGCCACATAGTAGGTTCTC AAATACTTGTTAATAAATAAGTTTGTTCGAGAAGCTGGGCAATGATATTCTACA GCTGGAAGAAGAAACATAATGATCTAGTAATTAGCTCATTAAAAATAAACGTTT TTCTTTTCTCAGAGGAGCATTTCCCAAGGCCTGCCTTGATAGCCATCCAAAAAG GCCAAGCTCATCCAATCTTGCCCTAGATTTATGCTAAAATGCAGTTACAATCGA TAGGATGACAGAAAACGACAGCACTTATTTAAATATAATAGGCCTTATTTAAA TAGGAGAAGCTGTGACTTCATAGCAAGTGTTGGGGTTAGGAAACTGGGTGGATA AACTTGCTGATGCTGTAGATCTTAGCCTCTACATGAGATCATGTGGAATCTG AAAGCATTTTAGGTTCCCTTATGTTTGCAATCAAATAACTGTACACCTTTTAATT TAAAAAGTACCATGAGGCACACACACACACTCGCAGGAACTTTTTGGCGTAACA AACTAGAAATTAGATCTAAAGCTAACTGTAGGACTGAGTCTATTCTAAACTGAA AGCCTGGACATCTGGAGTACCAGGGGGAGATGACGTGTTACGGGCTTCCATAAA AGCAGCTGGCTTTGAATGGAAGGAGCCAAGAGGCCAGCACAGGAGCGGATTCTGT CGCTTTACAGGCCATCGAGCCGAACCTCTCGCAAGTCCGTGAGCCGTTAAGGAG GCCCCCAGTCCCGACCTTCGCCCCAAGCCCCCTCGGGGTCCCCGGGCCTGGTAC TCCTTGCCACACGGGAGGGGCGCGGAAGCCGGGGCGGAGGAGGAGCCAACCCCG GGCTGGGCTGAGACCCGCAGAGGAAGACGCTCTAGGGATTTGTCCCGGACTAGC GAGATGGCAAGGCTGAGGACGGGAGGCTGATTGAGAGGCGAAGGTACACCCTAA TCTCAATACAACCTTTGGAGCTAAGCCAGCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCAC GTCCCTTCCAGGCGGCCTCCCCGTACACACCCCCCAACCCGCCCCGACCGGA GCTGAGAGTAATTCATACAAAAGGACTCGCCCCCTGCCTTGGGGGAATCCCAGGGA CCGTTCGTTAAACTCCCACTAACGTAGAACCCAGAGATCGCTGCGTTCCCGCCCC CTCACCCGCCGCTCTCGTCATCACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTC CGGTGCCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG GGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTG GGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACC GTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGA TTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCG CTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGG

	GCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATA AGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGC AAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTG GGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGC GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCC GGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGG CAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCG GCCCTGCTGCGAGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGG GTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCAT GTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCT TTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTC CCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAAT TCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTC AGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGAAAACAAACCC TAGGCGTCGACGATCTAGCGTCGACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCT GTATGCTGATTTGTCACTTGCTCTTTGGTGTGTTTGGCCACTGACTGACACCAAA GAAAGTGACAAATCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAAT GGCCCAGATCCGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGC CCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAG TGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGATCGCGGCCGAGGAACCCCTAGT GATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCG ACCAAAGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGC
Componentes de vector	
182	5' ITR CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCG ACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTTCCT
183	3' ITR AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCA CTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG
184	EF1alfa promotor de longitud completa TACAGAAACCAAGAAAGCACCATAGCGTTTGCCCTCAACTGCTTCCCAACTTGT TTTCCTCTTCCAATTTGATTGTGGTTTCCTCTCCAGAAGGAACTCCACAGTACT TAGCGTTGGCCACATAGTAGTTCTCAAATACTTGTTAATAAATAAGTTTGTTC GAGAAGCTGGGCAATGATATTCTACAGCTGGAAGAAGAAACATAATGATCTAGT AATTAGCTCATTAATAAATAAACGTTCTTCTTTCCCTCAGAGGAGCATTTCCCAAG GCCTGCCTTGATAGCCATCCAAAAAGGCCAAGCTCATCCAATCTTGCCCTAGAT TTATGCTAAAATGCAGTTACAATCGATAGGATGACAGAAAACGACAGCACTTAT TTAAATATAATAGGCACTTATTTAAATAGGAGAAGCTGTGACTTCATAGCAAGT GTTGGGGTTAGGAAACTGGGTGGATAAACTTGCTGATGCTGTAGATCTTAGCCT CTACATGAGATCATGTGAAAATCTGAAAGCATTTTAGGTTTCCTTATGTTTGCA ATCAAATAACTGTACACCTTTTAATTTAAAAAGTACCATGAGGCACACACACAC ACTCGCAGGAACCTTTTTGGCGTAACAAAAGTACCAATGAGGCTAAGCTAACTG TAGGACTGAGTCTATTCTAAACTGAAAGCCTGGACATCTGGAGTACCAGGGGGA GATGACGTGTTACGGGCTTCCATAAAAGCAGCTGGCTTTGAATGGAAGGAGCCA AGAGGCCAGCACAGGAGCGGATTTCGTCGCTTTCACGGCCATCGAGCCGAACCTC TCGCAAGTCCGTGAGCCGTTAAGGAGGCCCCCAGTCCCGACCCTTCGCCCCAAG CCCCTCGGGGTCCCCGGGCCTGGTACTCCTTGCCACACGGGAGGGGCGCGGAAG CCGGGGCGGAGGAGGAGCCAACCCCGGGCTGGGCTGAGACCCGCAGAGGAAGAC GCTCTAGGGATTTGTCCCGGACTAGCGAGATGGCAAGGCTGAGGACGGGAGGCT GATTGAGAGGCGAAGGTACACCCTAATCTCAATACAACCTTTGGAGCTAAGCCA GCAATGGTAGAGGGAAGATTCTGCACGTCCCTTCCAGGCGGCCTCCCCGTCACC

	ACCCCCCCAACCCGCCCGACCGGAGCTGAGAGTAATTCATACAAAAGGACTC GCCCCTGCCTTGGGGAATCCCAGGGACCGTCGTTAAACTCCCCTAACGTAGAA CCCAGAGATCGCTGCGTTCCTCGCCCCCTCACCCGCCCGCTCTCGTCATCACTGA GGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACA TCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCC TAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGC CTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAAC GTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGT TCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTATGGCCCTTGCGTGCCCTGAATTACT TCCACGCCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAG TGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCCTGCGCTTAAGGAGCCCCCTCGCCTCGTGCTTG AGTTGAGGCCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCT TCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTGTATG ACCTGTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGA TCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGC GTCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAAT CGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCC GCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAGTTGC GTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAG GACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGC CTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTC CAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGG GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGT TAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTGTAGTT TGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCC ATTTCAAGTGTCGTGAAAAC
185	beta globina poli A de conejo ATTTTTCCCTCTGCCAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTG ACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTT TTGTGTCTCTCACTCGATC
Andamios 5' guía y 3' pasajera están subrayadas	
186	<u>N₀₁N₀₂N₀₃N₀₄N₀₅N₀₆N₀₇N₀₈N₀₉N₁₀N₁₁N₁₂N₁₃N₁₄N₁₅N₁₆N₁₇N₁₈N₁₉N₂₀N₂₁</u>UGUGCA GUCCCAN₂₂ <u>N₂₃N₂₄N₂₅N₂₆N₂₇N₂₈N₂₉N₃₀N₃₁N₃₂N₃₃N₃₄N₃₅N₃₆N₃₇N₃₈N₃₉N₄₀N₄₁N₄₂C₄₃G</u>, donde N₀₁ a N₄₂ son ribonucleótidos, N₀₁ es complementario a N₄₂, N₀₂ no es complementario a N₄₁, N₀₃-N₁₀ es complementario a N₃₃-N₄₀, N₁₁ no es complementario a N₃₂, y N₁₂-N₂₁ es complementario a N₂₂- N₃₁
187	GUGGCCGN₀₁N₀₂N₀₃N₀₄N₀₅N₀₆N₀₇N₀₈N₀₉N₁₀N₁₁N₁₂N₁₃N₁₄N₁₅N₁₆N₁₇N₁₈N₁₉N₂₀N₂₁ <u>UGUGCAGGUCCCAN₂₂N₂₃N₂₄N₂₅N₂₆N₂₇N₂₈N₂₉N₃₀N₃₁N₃₂N₃₃N₃₄N₃₅N₃₆N₃₇N₃₈N₃₉N₄₀N₄₁N₄₂</u>CGGGGACGC; donde N₀₁ a N₄₂ son ribonucleótidos, N₀₁ es complementario a N₄₂, N₀₂ no es complementario a N₄₁, N₀₃-N₁₀ es complementario a N₃₃-N₄₀, N₁₁ no es complementario a N₃₂, y N₁₂-N₂₁ es complementario a N₂₂- N₃₁
Factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF)	
188	MKLWDVVAVCLVLLHTASAFPLPAGKRPPEAPAEDRS LGRRRAPFALSSDSNMP EDYPDQ FDDVMDFIQATIKRLKRSPDKQMAVLPRRERNRQAAAANPENSRGKGRRGQRGK

	NRGCVL TAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNLSRNRRLVSDKV GQACCR PIAFDDDL SFLDDNLVYHILRKHS AKRCGCI
Pre-miARN	
207	<u>AUAGAGAACACCCUCUUUUGUUGUGCAGGUCCCAAACAAAAGAGGAUGUUCUCC</u> AUCG
208	<u>AUAGAGAACACCCUCUUUUGUUGUGCAGGUCCCAAACAAAAGAGGUUGUUCUCC</u> AUCG
209	<u>AUAGAGAACACCCUCUUUUGUUGUGCAGGUCCCAAACAAAAGAGGCUGUUCUCC</u> AUCG
210	<u>AUAGAGAACACCCUCUUUUGUUGUGCAGGUCCCAAACAAAAGAGGAUGUUCUCA</u> AUCG
211	<u>AUAGAGAACACCCUCUUUUGUUGUGCAGGUCCCAAACAAAAGAGGUUGUUCUCA</u> AUCG
212	<u>AUAGAGAACACCCUCUUUUGUUGUGCAGGUCCCAAACAAAAGAGGCUGUUCUCA</u> AUCG
213	<u>AUAGAGAACACCCUCUUUUGUUGUGCAGGUCCCAAACAAAAGAGGAUGUUCUCG</u> AUCG
214	<u>AUAGAGAACACCCUCUUUUGUUGUGCAGGUCCCAAACAAAAGAGGUUGUUCUCG</u> AUCG
215	<u>AUAGAGAACACCCUCUUUUGUUGUGCAGGUCCCAAACAAAAGAGGCUGUUCUCG</u> AUCG
216	UCCUUUUUGACAAAGCCAGUGUGUGCAGGUCCCAACACUGGCUUUAUCAAAAAU GACG
217	UCCUUUUUGACAAAGCCAGUGUGUGCAGGUCCCAACACUGGCUUUUUCAAAAAU GACG
218	UCCUUUUUGACAAAGCCAGUGUGUGCAGGUCCCAACACUGGCUUUCUCAAAAAU GACG
219	UCCUUUUUGACAAAGCCAGUGUGUGCAGGUCCCAACACUGGCUUUAUCAAAAAA GACG
220	UCCUUUUUGACAAAGCCAGUGUGUGCAGGUCCCAACACUGGCUUUUUCAAAAAA GACG
221	UCCUUUUUGACAAAGCCAGUGUGUGCAGGUCCCAACACUGGCUUUCUCAAAAAA GACG
222	UCCUUUUUGACAAAGCCAGUGUGUGCAGGUCCCAACACUGGCUUUAUCAAAAAA GACG
223	UCCUUUUUGACAAAGCCAGUGUGUGCAGGUCCCAACACUGGCUUUUUCAAAAAA GACG
224	UCCUUUUUGACAAAGCCAGUGUGUGCAGGUCCCAACACUGGCUUUCUCAAAAAA GACG
ADN que codifica Pre-miARN	
225	<u>ATAGAGAACACCCTCTTTTGTTGTGTCAGGTCCCAAACAAAAGAGGATGTTCTCC</u> ATCG
226	<u>ATAGAGAACACCCTCTTTTGTTGTGTCAGGTCCCAAACAAAAGAGGTTGTTCTCC</u> ATCG
227	<u>ATAGAGAACACCCTCTTTTGTTGTGTCAGGTCCCAAACAAAAGAGGCTGTTCTCC</u> ATCG
228	<u>ATAGAGAACACCCTCTTTTGTTGTGTCAGGTCCCAAACAAAAGAGGATGTTCTCA</u> ATCG
229	<u>ATAGAGAACACCCTCTTTTGTTGTGTCAGGTCCCAAACAAAAGAGGTTGTTCTCA</u> ATCG
230	<u>ATAGAGAACACCCTCTTTTGTTGTGTCAGGTCCCAAACAAAAGAGGCTGTTCTCA</u> ATCG

	ATCG
231	ATAGAGAACACCCTCTTTTGTGTGTGCAGGTCCCAAACAAAAGAGGATGTTCTCG ATCG
232	ATAGAGAACACCCTCTTTTGTGTGTGCAGGTCCCAAACAAAAGAGGTTGTTCTCG ATCG
233	ATAGAGAACACCCTCTTTTGTGTGTGCAGGTCCCAAACAAAAGAGGCTGTTCTCG ATCG
234	TCCTTTTTGACAAAGCCAGTGTGTGCAGGTCCCAACACTGGCTTTATCAAAAAAT GACG
235	TCCTTTTTGACAAAGCCAGTGTGTGCAGGTCCCAACACTGGCTTTTTCAAAAAAT GACG
236	TCCTTTTTGACAAAGCCAGTGTGTGCAGGTCCCAACACTGGCTTTCTCAAAAAAT GACG
237	TCCTTTTTGACAAAGCCAGTGTGTGCAGGTCCCAACACTGGCTTTATCAAAAAA GACG
238	TCCTTTTTGACAAAGCCAGTGTGTGCAGGTCCCAACACTGGCTTTTTCAAAAAA GACG
239	TCCTTTTTGACAAAGCCAGTGTGTGCAGGTCCCAACACTGGCTTTCTCAAAAAA GACG
240	TCCTTTTTGACAAAGCCAGTGTGTGCAGGTCCCAACACTGGCTTTATCAAAAAAC GACG
241	TCCTTTTTGACAAAGCCAGTGTGTGCAGGTCCCAACACTGGCTTTTTCAAAAAAC GACG
242	TCCTTTTTGACAAAGCCAGTGTGTGCAGGTCCCAACACTGGCTTTCTCAAAAAAC GACG
ADN codificante, Pri-miARN	
243	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGATAGAGAACACCCTCTTTTGTGTGTGCAGGTCCCAAACAAAAGA GGATGTTCTCCATCGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
244	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGATAGAGAACACCCTCTTTTGTGTGTGCAGGTCCCAAACAAAAGA GGTTGTTCTCCATCGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
245	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGATAGAGAACACCCTCTTTTGTGTGTGCAGGTCCCAAACAAAAGA GGCTGTTCTCCATCGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
246	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGATAGAGAACACCCTCTTTTGTGTGTGCAGGTCCCAAACAAAAGA GGATGTTCTCAATCGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
247	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGATAGAGAACACCCTCTTTTGTGTGTGCAGGTCCCAAACAAAAGA GGTTGTTCTCAATCGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
248	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGATAGAGAACACCCTCTTTTGTGTGTGCAGGTCCCAAACAAAAGA GGCTGTTCTCAATCGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
249	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGATAGAGAACACCCTCTTTTGTGTGTGCAGGTCCCAAACAAAAGA GGATGTTCTCGATCGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC

250	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGATAGAGAACACCTCTTTTGTGTGTCAGGTCCCAAACAAAAGA GGTTGTTCTCGATCGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
251	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGATAGAGAACACCTCTTTTGTGTGTCAGGTCCCAAACAAAAGA GGCTGTTCTCGATCGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
252	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGTCCTTTTGTGACAAAGCCAGTGTGTGTCAGGTCCCAACACTGGCT TTATCAAAAATGACGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
253	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGTCCTTTTGTGACAAAGCCAGTGTGTGTCAGGTCCCAACACTGGCT TTTTCAAAAATGACGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
254	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGTCCTTTTGTGACAAAGCCAGTGTGTGTCAGGTCCCAACACTGGCT TTCTCAAAAATGACGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
255	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGTCCTTTTGTGACAAAGCCAGTGTGTGTCAGGTCCCAACACTGGCT TTATCAAAAAGACGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
256	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGTCCTTTTGTGACAAAGCCAGTGTGTGTCAGGTCCCAACACTGGCT TTTTCAAAAAGACGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
257	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGTCCTTTTGTGACAAAGCCAGTGTGTGTCAGGTCCCAACACTGGCT TTCTCAAAAAGACGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
258	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGTCCTTTTGTGACAAAGCCAGTGTGTGTCAGGTCCCAACACTGGCT TTATCAAAAACGACGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
259	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGTCCTTTTGTGACAAAGCCAGTGTGTGTCAGGTCCCAACACTGGCT TTTTCAAAAACGACGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
260	GAGGGAATGAAGCCACAGGAGCCAAGAGCAGGAGGACCAAGGCCCTGGCGAAGG CCGTGGCCTCGTCCTTTTGTGACAAAGCCAGTGTGTGTCAGGTCCCAACACTGGCT TTCTCAAAAACGACGGGGACGCGGGCCTGGACGCCGGCATCCGGGCTCAGGACC CCCCTCTCTGCCAGAGGC
Secuencias de direccionamiento de cápside	
279	VMSVLLVDTDATQQ
280	VMSVLLVDTDATQQQLA
281	VMSVLLVDTDNTQQQIA
282	DPGYAETPYASVSH

[00345] La Tabla 10 hace referencia a diferentes construcciones de miR y proporciona las SEQ ID NOs: para el ARN guía, la pasajera, la región de semilla, pri-miARN, y pre-

miARN; y proporciona el ADN codificante/correspondiente (excepto para el pre-miARN). En diferentes formas de realización, un polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 %, o 100 % a cualquiera de las secuencias proporcionadas en la Tabla 10.

[00346] Tabla 10

miR	ARN Guía	ARN Pas.	ARN Semi-lla	Pri-mi ARN	Pre-miARN ARN	Secuencia diana	ADN Guía	ARN Semilla	ADN Pas.	ADN Pri-mi
3	94	101	08	115	122	129	136	143	150	157
5	95	102	09	116	123	130	137	144	151	158
6	96	103	10	117	124	131	138	145	152	159
7	97	104	11	118	125	132	139	146	153	160
8	98	105	12	119	126	133	140	147	154	161
10	99	106	13	120	127	134	141	148	155	162
11	100	107	14	121	128	135	142	149	156	163

EJEMPLOS

[00347] A continuación, se proporcionan ejemplos que ilustran con más detalle diferentes características de la presente invención y la metodología para ponerla en práctica. Los ejemplos proporcionados no limitan la invención reivindicada.

[00348] Ejemplo 1: Reducción de la expresión de SNCA mediante ARNsi en células HEK293

[00349] Se evaluó el efecto de diferentes ARNsi sobre la expresión de SNCA y la supervivencia celular en células HEK293T. Lipofectamine™ RNAiMAX (0,3 µL) que contenía 1 nM, 10 nM o 100 nM de ARNsi se transfectó en células que tenían una densidad celular de alrededor de $1,5 \times 10^4$. La expresión de SNCA se determinó midiendo el ARNm de α -sinucleína mediante PCR, 72 horas después de la transfección. La supervivencia celular se midió utilizando tinción con azul Presto. Las diferentes construcciones se resumen en la Tabla 11. Las secuencias de ARNsi contenían dos desoxitimidinas 5'.

[00350] Tabla 11

ARNsi	SEQ	Guía	SEQ	Pasajera (Sentido)
1	1	UACAUAGAGAACACCCUCUTT	63	AGAGGGUGUUCUCUAUGUATT
2	2	UCCUUUCAUGAAUACAUCCTT	64	GGAUGUAUUCAUGAAAGGATT
3	3	UUUGUCACUUGCUCUUUGGTT	65	CCAAAGAGCAAGUGACAAAATT
4	4	UUUUGGAGCCUACAUAAGAGTT	66	CUCUAUGUAGGCUCGAAAATT
5	5	AUAGAGAACACCCUCUUUUUTT	67	AAAAGAGGGUGUUCUCUAUTT
6	6	UAGAGAACACCCUCUUUUUGTT	68	CAAAAGAGGGUGUUCUCUAUTT
7	7	UCCUUUUUGACAAAGCCAGTT	69	CUGGCUUUGUCAAAAAGGATT
8	8	UUUUGACAAAGCCAGUGGCTT	70	GCCACUGGCUUUGUCAAAAATT
9	9	UUCUCAGCCACUGUUGCCATT	71	UGGCAACAGUGGCUGAGAATT

10	10	UCCUCCAACAUUUGUCACUTT	72	AGUGACAAAUGUUGGAGGATT
11	11	AUUUGUCACUUGCUCUUUGTT	73	CAAAGAGCAAGUGACAAAUTT
12	12	UUUGGUCUUCUCAGCCACUTT	74	AGUGGCUGAGAAGACCAAATT
13	13	UGCUCUCCAACAUAUUGUCTT	75	GACAAAUGUUGGAGGAGCATT
14	14	AGCCUACAUAGAGAACACCTT	76	GGUGUUCUCUAUGUAGGCUTT
15	15	UUUGGAGCCUACAUAGAGATT	77	UCUCUAUGUAGGCUCCAAATT
16	16	GUCCUUUCAUGAAUACAUCTT	78	GAUGUAUUAUGAAAGGACTT
17	17	CUUUUUGACAAAGCCAGUGTT	79	CACUGGCUUUGUCAAAAAGTT
18	18	CCUUGGCCUUUGAAAGUCCTT	80	GGACUUUCAAGGCCAAGGTT
19	19	CCUUGGCCUUUGAAAGUCCTT	81	UGUAGGCUCCAAACCAAGTT
20	20	GUCACUUGCUCUUUGGUCUTT	82	AGACCAAAGAGCAAGUGACTT
21	21	GUCCUUUUUGACAAAGCCATT	83	UGGCUUUGUCAAAAAGGACTT
22	22	CACUGCUCCUCCAACAUUUTT	84	AAAUGUUGGAGGAGCAGUGTT
23	23	GCUCUCCAACAUAUUGUCATT	85	UGACAAAUGUUGGAGGAGCTT
24	24	CAACUGGUCCUUUUUGACATT	86	UGUCAAAAAGGACCAGUUGTT
25	25	GUUCGUAGUCUUGAUACCCTT	87	AGAAGACAGUGGAGGGAGCTT
26	26	CACUGUUGCCACACCAUGCTT	88	GCAUGGUGUGGCAACAGUGTT
27	27	GGUAUCAAGACUACGAACCTT	89	GGUUCGUAGUCUUGAUACCCTT
28	28	GGAGCAGUGGUGACGGGUGTT	90	CACCCGUCACCACUGCUCCTT
29	29	GGGUAUCAAGACUACGAACTT	91	GUUCGUAGUCUUGAUACCCTT
30	30	GGUGUUCUCUAUGUAGGCUTT	92	AGCCUACAUAGAGAACACCTT
31	31	CCUUCUGAGGAAGGGUAUCTT	93	GAUACCCUCCUCAGAAGGTT

[00351] El impacto de los ARNsi sobre la expresión de *SNCA* se ilustra en la FIG. 1 y la Tabla 12. La FIG. 1 ilustra la capacidad de diferentes construcciones para reducir la expresión de *SNCA*, expresada como RQ. Para cada ARNsi, la concentración central es 10 nM, la concentración a la izquierda es 1 nM y la concentración a la derecha es 100 nM.

[00352] La Tabla 12 indica una designación de ARNsi y proporciona datos de inhibición para algunas de las construcciones a 100 mM.

[00353] Tabla 12

ARNsi	Bloqueo por disminución % a 100 nM
1	79
2	77
3	77,5
5	79,5
6	73
7	81
8	74
10	74
11	85
13	78,5
27	81
28	70
29	66
30	72
31	68

[00354] Las FIGS. 2A, 2B y 2C ilustran el porcentaje de supervivencia en diferentes concentraciones de ARNsi. La FIG. 2A ilustra la supervivencia a 1 nM de ARNsi, la FIG. 2B ilustra la supervivencia a 10 nM de ARNsi y la FIG. 2C ilustra la supervivencia a 100 nM de ARNsi.

[00355] Ejemplo 2: Reducción de la expresión de *SNCA* por ARNsi en células HEK293

[00356] Se evaluó el efecto de diferentes ARNsi sobre la expresión de *SNCA* y la supervivencia celular en una línea celular que sobreexpresa *SNCA* fusionado a la proteína fluorescente verde (GFP). Las disminuciones en GFP son indicativas de disminuciones en la expresión de *SNCA*.

[00357] Las células se transfectaron con 100 nM de ARNsi 1-25 (ver la Tabla 11). La fluorescencia de la GFP se midió 72 horas después de la transducción (n = 2). Se utilizaron como controles un control mezclado, un siGLO disponible comercialmente (control sin direccionamiento con fluorescencia roja), un desajuste¹¹ (control sin direccionamiento) y condiciones sin tratamiento. La capacidad de los diferentes ARNsi para reducir la expresión de *SNCA* se ilustra en la FIG. 3.

[00358] Ejemplo 3: Inhibición de la expresión de *SNCB* y *SNCG* por ARNsi

[00359] Se evaluó el impacto de las diferentes construcciones que se dirigían a la expresión de *SNCA* sobre la expresión de *SNCB* y *SNCG* utilizando métodos similares a los descritos en el Ejemplo 1, excepto para la detección de las transcripciones de *SNCB* y *SNCG*. *SNCB* codifica para β -sinucleína, y *SNCG* codifica para γ -sinucleína. β -sinucleína y γ -sinucleína tienen una estructura similar a la α -sinucleína.

[00360] FIG. 4A y FIG. 4B ilustran el impacto de los ARNsi sobre los genes fuera de objetivo *SNCB* y *SNCG* a las 72 horas posteriores a la transfección utilizando 1 nM (valor de la izquierda), 10 nM (valor del centro) y 100 nM (valor de la derecha) de ARNsi. Las construcciones de ARNsi se resumen en la Tabla 11. La FIG. 4A ilustra la expresión de *SNCB* a 1 nM, 10 nM o 100 nM de ARNsi. La FIG. 4B ilustra la expresión de *SNCG* a 1 nM, 10 nM o 100 nM de ARNsi.

[00361] Ejemplo 4: Inhibición de la expresión de *SNCA* por ARNsi en SH-SY5Y

[00362] Se evaluó el efecto de diferentes ARNsi sobre la expresión de *SNCA* y la supervivencia celular en células SH-SY5Y (células de neuroblastoma). Las construcciones de ARNsi se resumen en la Tabla 11. Las células se transdujeron con 10 nM o 100 nM de ARNsi, como se describe en el Ejemplo 1, y la expresión se evaluó midiendo las transcripciones de ARNm de *SNCA* utilizando qPCR. La expresión se midió 72 horas después de la transducción.

[00363] La capacidad de los diferentes ARNsi para inhibir la expresión en células SH-SY5Y se ilustra en la FIG. 5. Las células tratadas con ARNsi se compararon con el

control siGLO. Los datos confirman la capacidad de los ARNsi probados para inhibir la expresión de *SNCA* en células SH-SY5Y.

[00364] Ejemplo 5: Análisis de la expresión génica diferencial

[00365] Los resultados de un análisis de la expresión génica diferencial que mide la capacidad de los ARNsi que se dirigen a la expresión de *SNCA*, para disminuir o aumentar la expresión de genes no diana se proporcionan en la FIG. 6. En general, el ácido nucleico inhibidor preferido tiene un efecto menor sobre la expresión en genes no diana.

[00366] Ejemplo 6: Inhibición de *SNCA* por pri-miARN

[00367] Las secuencias de pri-miARN se diseñaron modificando secuencias de ARNsi seleccionadas, en función de la actividad de inhibición, el impacto sobre la supervivencia celular y el efecto fuera del objetivo. La hebra guía de ARNsi se modificó reemplazando los dTs 3' terminales con nucleótidos complementarios a la diana, y se incrustó en un andamio S155. La hebra pasajera de ARNsi se modificó reemplazando los dTs 3' terminales con nucleótidos complementarios a la hebra guía, y eliminando dos nucleótidos internos para incrustarlos en el andamio S155.

[00368] Los ácidos nucleicos que codificaban para diferentes pri-miARN se insertaron en un plásmido que comprendía un gen reportero (mCherry impulsado por el promotor CMV) y colocando la secuencia codificante de pri-miARN bajo el control de un promotor CBH. El plásmido resultante comprendía CBH-miARN-CMV-mCherry.

[00369] Los plásmidos que codificaban la proteína de fusión α -sinucleína-GFP humana se insertaron en células HEK293. La señal de GFP proporcionó una medida de la expresión de *SCNA*, mientras que las células positivas mCherry (Rojo) indicaron células transfectadas con ácido nucleico que expresaba pri-miARN. Se realizó un ensayo de citometría de flujo (CytoFLEX). Los controles proporcionados fueron sin tratamiento (sin transfección) y simulados (transfectados solo con reactivo, sin plásmido).

[00370] La Tabla 13 proporciona las designaciones de pri-miARN, y resume la secuencia de ADN guía codificante, la secuencia de ADN pasajera codificante, el ADN de pri-miARN codificante, y proporciona la referencia al ARNsi parental. El ARNsi parental indica el ARNsi cuyas secuencias guía y pasajera se modificaron y se incrustaron en el andamio S155.

[00371] Tabla 13

Designación Pri-miARN	Guía SEQ NO:	ID	Pasajera SEQ ID NO:	ARNsi parental	ADN Pri-miARN codificante SEQ ID NO:
miR3	136		150	3	157
miR5	137		151	5	158
miR6	138		152	6	159
miR7	139		153	7	160
miR8	140		154	8	161
miR10	141		155	10	162
miR11	142		156	11	163

[00372] La capacidad de los diferentes miR para inhibir la expresión de SCNA se muestra en la FIG. 7. Los grupos tratados con miR redujeron significativamente la señal de GFP normalizada (como una medida de la expresión de SCNA).

[00373] Ejemplo 7: Inhibición *in vitro* de la agregación y expresión de α -sinucleína

[00374] La capacidad del ácido nucleico suministrado viral que comprende ácido nucleico que codifica diferentes miARN para inhibir la agregación y expresión de α -sinucleína se probó en neuronas primarias de rata. Los miARN se resumen en la Tabla 14. Los vectores de AAV recombinantes se produjeron incorporando ácido nucleico de rAAV en cápsides que comprendían VP1 de SEQ ID NO: 164, VP2 de SEQ ID NO: 165 y VP3 o SEQ ID NO: 166. La producción de rAAV se llevó a cabo utilizando triple transfección.

[00375] Se sembraron neuronas corticales primarias de rata a razón de 5e4 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. El día 6, las células (1) se transdujeron con AAV1-CMV-A53T α -Syn-WPRE (que comprende un vector viral recombinante que codifica α -sinucleína con una sustitución A53T) a una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 10 000 y rAAV que codifica miR a una MOI de 10 000 y 100 000; (2) el día 10, se proporcionaron fibrillas preformadas (PFF, por sus siglas en inglés) de α -sinucleína humana a 1 μ g/mL; y (3) el día 20, las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con anticuerpos contra α -sinucleína y pS129.

[00376] Las construcciones de prueba se resumen en la Tabla 14. El pri-miARN se unió operativamente a un promotor EF1 (SEQ ID NO: 184). Las construcciones de control fueron rAAV-CAG-EGFP que contenía el promotor CAG unido a EGFP; rAAV-EF1-mis11 que contenía una secuencia de miARN de sentido erróneo; y rAAV1/2-3XmiR-GFP (AAV1/2-CAG-Humana-SNCA-3xmiR/GFP-WPRE-BGH-poliA) que codificaba 3 copias de

un miARN dirigido al ARNm codificante de α -sinucleína. AAV1/2-CAG-Humana-SNCA-3xmiR/GFP-WPRE-BGH-poliA se obtuvo de Charles River).

[00377] Tabla 14

Designación	ADN codificante Pri-miARN SEQ ID NO:	Ácido nucleico rAAV SEQ ID NO:
rAAV-miR3	136	175
rAAV-miR5	137	176
rAAV-miR6	138	177
rAAV-miR7	139	178
rAAV-miR8	140	179
rAAV-miR10	141	180
rAAV-miR11	142	181

[00378] La FIG. 8A ilustra el porcentaje de intensidad de α -sinucleína normalizado al control de α -sinucleína. Los diferentes miR inhibieron significativamente la expresión de α -sinucleína.

[00379] La FIG. 8B ilustra el porcentaje de intensidad de pS129, como una medida de agregación. La formación de agregados se determinó midiendo la intensidad fluorescente de la tinción de ps129 y tomando imágenes utilizando el objetivo de aire Opera Phenix 20X. Los diferentes miR inhibieron significativamente la agregación de α -sinucleína.

[00380] Ejemplo 8: Inhibición *in vivo* en el modelo de cotransducción

[00381] Se evaluó la capacidad de los vectores de rAAV que comprendían el ácido nucleico viral que codifica miR5 o miR7 para expresarse e inhibir la agregación de α -sinucleína en ratones C57BL6. La encapsidación del ácido nucleico de rAAV que codificaba miR5 o miR7 se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 7. El diseño experimental se muestra en la Tabla 15.

[00382] Tabla 15

Vector	Ratones	Dosis/hemisferio Vg	Período tiempo semanas	Administración
Sin tratamiento	5		7	IPa estriatal unilateral
Diluyente	5		7	IPa estriatal unilateral
rAAV1/2-A53T α Syn + rAAV-mis11	8	5e9	7	
rAAV1/2-A53T α Syn	8	5e9, 1e10	7	IPa estriatal unilateral
rAAV1/2-A53T	8	5e9, 5e9	7	IPa

α Syn + rAAV-miR5				estriatal unilateral
rAAV1/2-A53T α Syn + rAAV-miR5	8	5e9, 1e10	7	IPa estriatal unilateral
rAAV1/2-A53T α Syn + rAAV-miR7	8	5e9, 5e9	7	IPa estriatal unilateral
rAAV1/2-A53T α Syn + rAAV-miR7	8	5e9, 1e10	7	IPa estriatal unilateral
rAAV1/2-A53T α Syn + AAV1/2 3xmiARN	6	5e9, 1e9	7	IPa estriatal unilateral

IPa se refiere a una administración intraparenquimatosa en ambos hemisferios (dos valores) o en un hemisferio

[00383] La inhibición de la expresión de *SCNA* se evaluó utilizando qPCR para medir las transcripciones de ARNm codificante de α -sinucleína. La FIG. 9A ilustra el cambio de pliegues de α -sinucleína en relación con un control de rAAV1/2-A53T α Syn + rAAV-mis11 (mis11). El AAV recombinante codificante de miR5 y miR7 redujo significativamente la expresión de *SCNA* en dosis de 5e9 y 1e10 vg/hemisferio a las 7 semanas posteriores a la inyección en el cuerpo estriado del ratón. Se incluyó AAV1/2-3XmiARN como control positivo del bloqueo por disminución.

[00384] La inhibición de la agregación de α -sinucleína en la corteza frontal se evaluó utilizando el anticuerpo específico de α -sinucleína syn204 en una dosis de 1e10 vg/hemisferio. El análisis de la proteína se realizó mediante JESS, utilizando un anticuerpo dirigido a la α Syn humana. Los resultados se muestran en la FIG. 9B. Tanto miR5 como miR7 redujeron la proteína α -sinucleína.

[00385] La media del recuento de lecturas de miARN mediante secuenciación de ARN pequeño muestra que miR5 y miR7 se expresan con éxito a partir de los vectores de rAAV en el cuerpo estriado de ratones WT cuando se cotransducen con α Syn AAV-A53T (FIG. 9C).

[00386] El efecto de los vectores virales sobre el *SNCA* murino endógeno (m*SCNA*) se muestra en la FIG. 9D. La sobreexpresión de la α -sinucleína A53T humana no afectó a la expresión de α -sinucleína endógena. El miR7 tiene un desajuste de una base (no complementaria en la posición 6) con el ARNm de la α -sinucleína murina, mientras que el miR5 tiene un desajuste de dos bases (no complementarias en las posiciones 7 y 10) con el ARNm de la α -sinucleína murina. El miR7 redujo la α -sinucleína en el cuerpo estriado, mientras que el miR5 no tuvo un efecto significativo.

[00387] Ejemplo 9: Inhibición de la expresión de mSNCA endógeno en la sustancia negra

[00388] Se evaluó en ratones la capacidad de los vectores de rAAV para inhibir la expresión de mSCNA endógeno en la sustancia negra. El diseño experimental se proporciona en la Tabla 16.

[00389] Tabla 16

Vector	Ratones	Dosis/hemisferio Vg	Administración
Sin tratamiento	5		Inyección SN
rAAV-miR5	8	1e10	Inyección SN
rAAV-miR7	4	1e10	Inyección SN

SN se refiere a inyección en sustancia negra

[00390] La biodistribución y el impacto sobre la expresión de mSCNA se ilustran en las FIGS. 10A-10D. La FIG. 10A ilustra la biodistribución en la sustancia negra (SN) y el cuerpo estriado (Str). El vector de AAV-miR5 y rAAV-miR7 recombinante inyectado en la sustancia negra se detectó en el cuerpo estriado, a un VCGN más bajo, lo que sugiere un movimiento anterógrado del vector viral.

[00391] La FIG. 10B ilustra la expresión de mSCNA en la sustancia negra (SN) y el cuerpo estriado (Str). El nivel de ARNm de α -sinucleína endógena de ratón en el cuerpo estriado fue significativamente mayor en comparación con la sustancia negra.

[00392] La FIG. 10C ilustra la expresión de mSCNA en la sustancia negra (SN). El ARNm de α -sinucleína endógena de ratón en la sustancia negra fue reducido significativamente por rAAV-miR7 (1 desajuste), pero no por rAAV-miR5 (dos desajustes).

[00393] La FIG. 10D ilustra la expresión de mSCNA en el cuerpo estriado (Str). El ARNm de α -sinucleína endógena de ratón en el cuerpo estriado se redujo significativamente tanto por rAAV-miR7 (1 desajuste) como por rAAV-miR5 (dos desajustes).

[00394] Ejemplo 11: Procesamiento de miARN

[00395] La FIG. 11 ilustra el procesamiento de guía y pasajera para miR5 y miR7. Se realizó una secuenciación de próxima generación (NGS) en ARN pequeños para evaluar el procesamiento de miARN después del suministro intraparenquimatoso (IP) de vectores de rAAV de miARN al cuerpo estriado de cerebros de ratón. Brevemente, se coinyectó a ratones C57BL/6 rAAV1/2-A53T α Syn (que expresa SNCA humano con la mutación A53T) más rAAV-mis11 (codifica miARN con sentido erróneo), o rAAV-miR5 o rAAV-miR7 en dos dosis en el cuerpo estriado del cerebro del ratón. Siete semanas después, se recolectó tejido y se procesó para la secuenciación NGS de ARN pequeños. Las cantidades de ARN guía y ARN pasajero generadas a partir de dos dosis diferentes de dos vectores de rAAV-miARN diferentes son indicativas de una relación favorable de guía

a pasajero (donde la guía es la especie predominante) que impulsa la degradación específica del ARNm diana (FIG. 11).

[00396] Ejemplo 12: Estudios de rAAV-miR5 de diez semanas

[00397] Se evaluó el efecto de los vectores de rAAV que comprenden ácidos nucleicos virales que codifican miR5 suministrados bilateralmente en la sustancia negra de ratones C57BL6 diez semanas después de la administración. Se midieron diferentes parámetros, incluidos el peso corporal, la biodistribución, el bloqueo por disminución de α -sinucleína, los niveles de dopamina y el recambio de dopamina. Además, se evaluó el procesamiento de miARN y el impacto sobre la maquinaria endógena de miARN.

[00398] Los vectores de AAV recombinantes se produjeron incorporando ácido nucleico de rAAV en cápsidas que comprendían VP1 de SEQ ID NO: 164, VP2 de SEQ ID NO: 165 y VP3 de SEQ ID NO: 166. La producción de rAAV se llevó a cabo utilizando triple transfección.

[00399] A los ratones se les administró una dosis fija de α Syn humana (AAV1/2-A53T α Syn) para inducir la pérdida de dopamina, como se observa en las sinucleinopatías, incluida la enfermedad de Parkinson, y los animales de tratamiento recibieron dosis de genomas de vector (vg) de 5e7, 5e8 o 5e9 de rAAV-miR5. A los controles se les administró diluyente o mis11 (construcción de sentido erróneo) a 5e9 vg + α Syn.

[00400] La FIG. 12 ilustra la significación estadística del criterio de valoración del peso corporal. El análisis del criterio de valoración del peso corporal indicó una pérdida significativa de peso corporal en el grupo de α Syn humana (AAV1/2-A53T α Syn) y el grupo tratado con miARN de control (rAAV-CAG-mis11) en comparación con los animales tratados con diluyente. En comparación con el control, el rAAV-miR5 a 5e7 vg mostró una pérdida de peso corporal. No se observó una pérdida de peso corporal estadísticamente significativa en los grupos tratados con rAAV-miR5 en dosis alta y media (5e9 y 5e8 vg).

[00401] La distribución de rAAV-miR5 en la sustancia negra se ilustra en las FIGS. 13A y 13B. La presencia del vector se evaluó utilizando cebadores específicos diseñados sobre la base de las secuencias de poliA de BgH y RbG. El vector AAV1/2-A53T α Syn tiene una poliA de BgH; y el rAAV-miR5 y el rAAV-CAG-mis11 tienen una poliA de RbG. La FIG. 13A ilustra la medición de poliA de BgH. La FIG. 13B ilustra la medición de poliA de RbG.

[00402] La capacidad de rAAV-miR5 para inhibir la α -Syn, medida mediante qRT-PCR, se ilustra en la FIG. 14. El tejido cerebral de la sustancia negra se analizó mediante qRT-PCR utilizando cebadores de α -Syn. No se observó ninguna señal en el grupo al que se le inyectó diluyente, lo que ilustra la especificidad para la α -Syn humana. Se observó un

bloqueo por disminución estadísticamente significativo de la α -Syn humana en los grupos tratados con rAAV-miR5 en dosis de 5e9 (dosis más alta) y 5e8 (dosis media) vg, pero no con 5e7 (dosis más baja) en comparación con el rAAV-CAG-mis11 (miARN de control). Las estadísticas se realizaron mediante Anova unidireccional ordinario con prueba de comparación múltiple de Tukey.

[00403] La capacidad de rAAV-miR5 para bloquear por disminución la α Syn en la corteza, medida mediante el ensayo JESS, se ilustra en la FIG. 15. El primer diluyente carece de α -Syn humana, mientras que el segundo diluyente contiene α -Syn. Se observó un bloqueo por disminución estadísticamente significativo de α -Syn humana en los grupos tratados con rAAV-miR5 en todas las dosis 5e9 vg (dosis más alta), 5e8 vg (dosis media) y 5e7 vg (dosis más baja), en comparación con rAAV-CAG-mis11.

[00404] En la enfermedad de Parkinson, las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra se proyectan hacia el cuerpo estriado, donde liberan el neurotransmisor dopamina. Se midieron el nivel y el recambio de dopamina para evaluar si el tratamiento con rAAV-miR5 inhibía la pérdida de dopamina.

[00405] La capacidad de rAAV-miR5 para inhibir la pérdida de dopamina causada por A53T α -Syn se ilustra en la FIG. 16. Se observó una pérdida de dopamina significativamente mayor en el cuerpo estriado luego de la administración de rAAV que codifica A53T α Syn humana (AAV1/2-A53T α Syn) y miARN de control negativo (rAAV-CAG-mis11), en comparación con el grupo de diluyente. Se observó una inhibición estadísticamente significativa de la pérdida de dopamina en el cuerpo estriado en todos los grupos tratados con miARN (rAAV-miR5, 5e9 vg, 5e8 vg y 5e7 vg) en comparación con el grupo tratado con AAV1/2-A53T α Syn y miARN de control negativo (rAAV-CAG-mis11).

[00406] En la enfermedad de Parkinson, la relación de metabolitos corriente descendente de dopamina (DOPAC y HVA) con respecto a dopamina (DOPAC + HVA) es indicativa de un recambio de dopamina constante y neuronas de dopamina sanas. La capacidad de rAAV-miR5 para proteger contra un recambio de dopamina deteriorado se ilustra en la FIG. 17. Se observó un recambio de dopamina deteriorado luego del tratamiento con AAV1/2-A53T α Syn y miARN de control negativo (rAAV-CAG-mis11). Se observó protección del recambio de dopamina deteriorado en los grupos tratados con rAAV-miR5 a dosis media y baja, pero no a la dosis más alta. Esto es indicativo de una maquinaria de dopamina deteriorada debido a la carga viral total a la dosis más alta, a pesar de un buen bloqueo por disminución de α -Syn y protección contra la pérdida de dopamina.

[00407] La FIG. 18 ilustra una evaluación del procesamiento de microARN mediante secuenciación de ARN pequeño. La secuenciación de ARN pequeño después de rAAV-miR5 indica que el miARN guía se expresó favorablemente sobre la hebra pasajera.

[00408] La FIG. 19 resume los resultados de la secuenciación de ARN pequeño. La maquinaria de miARN endógena no se vio perturbada por la sobreexpresión de rAAV-miR5. Incluso en la dosis más alta, 5e9 vg, el miARN madurado exógeno expresado fue el 1 % del total del conjunto de miARN endógeno. La dosis media y más baja, 5e8 y 5e7 vg, representó <0,1 % del total del conjunto de miARN endógeno. El grupo tratado con diluyente es el grupo de control negativo, que no tenía miARN.

[00409] Ejemplo 13: Estudios con ratones SNCA-OVX

[00410] Se administró rAAV-miR5 a ratones SNCA-OVX a 5e8 vg/SN y 5e9 vg/SN. Los ratones SNCA-OVX están genéticamente alterados, en los que se han seleccionado genéticamente ambas copias del gen SNCA murino; y contienen una construcción BAC que proporciona una copia del gen SNCA humano bajo el control de su promotor endógeno que proporciona la expresión de aproximadamente 1,6-1,9 veces los niveles normales de α -Syn (Janezic et al., Proc Natl Acad Sci USA 2013; 110 (42): E4016-25). Los niveles de ARNm de SNCA humano se midieron mediante RT-qPCR.

[00411] Se observó un alto grado de variabilidad en la abundancia de ARNm de SNCA en la sustancia negra entre machos y hembras no tratados, e incluso entre miembros del mismo sexo. Además, los ratones SNCA-OVX machos tenían un peso corporal significativamente mayor en comparación con las hembras, lo que produjo un direccionamiento inexacto de la sustancia negra y una distribución menor de rAAV-miR5 en los machos en comparación con las hembras del mismo grupo. Si bien la variabilidad dificultó la interpretación de los estudios de dosificación de rAAV-miR5, se observó una reducción significativa del 45 % en el ARNm de SNCA a 5e9 vg/SN de rAAV-miR5 por hemisferio en el punto temporal de 6 semanas en las hembras (FIG. 20).

[00412] Ejemplo 14: Estudio de rango de dosis en primates no humanos (NHP, por sus siglas en inglés)

[00413] Se realizó un estudio de rango de dosis en NHP de dos meses, para evaluar el direccionamiento bilateral, la farmacología y la seguridad preliminar de rAAV-miR5 en la sustancia negra de *Chlorocebus sabaeus* (mono verde africano, AGM, n = 2/grupo, 3 dosis). Los vectores de AAV recombinantes se produjeron incorporando ácido nucleico de rAAV en cápsides que comprendían VP1 de SEQ ID NO: 164, VP2 de SEQ ID NO: 165 y VP3 de SEQ ID NO: 166. La producción de rAAV se llevó a cabo utilizando triple transfección. Se realizó tinción clásica con hematoxilina y eosina (H&E) para evaluar la histopatología potencial.

[00414] El objetivo principal del estudio fue evaluar la biodistribución cerebral de un vector AAV de terapia génica, después del suministro mediante infusión intraparenquimatosa (IP) bilateral, mejorada por convección y guiada por IRM, en la pars compacta de la sustancia negra de *Chlorocebus sabaeus* macho, seguida de un período de observación de 8 semanas. Una lectura secundaria de este estudio se centró en evaluar los niveles de expresión del gen diana en las regiones cerebrales de interés, incluida la sustancia negra y los tejidos circundantes y sus proyecciones.

[00415] Cada NHP recibió una dosis bilateral o bien de vehículo, vector de miARN de control (sentido erróneo 11 expresado bajo un promotor EF-1 α) o rAAV-miR5. El diseño del estudio se muestra a continuación en la Tabla 17.

[00416] Tabla 17

Gru- po Nro.	Sitios de dosis	Artículo de prueba	Nivel de dosis/ hemisferio	Volumen de dosis/ hemisferio	Concentra- ción/ hemisferio	Nro. de animales (macho)	ID Animal
1	Sustancia negra izquierda y derecha	Diluyente	N/A	10,0-15,0* μ L	N/A	2	C1303 y D1367
2	Sustancia negra izquierda y derecha	Sentido erróneo 11 Control	3e10 vg	10,0 μ L	3,0e12 vg/ml	2	C1671 y C1521
3	Sustancia negra izquierda y derecha	rAAV- miR5	3e8 vg	10,0 μ L	3,0e10 vg/ml	2	D1296 y D1440
4	Sustancia negra izquierda y derecha	rAAV- miR5	3e9 vg	10,0 μ L	3,0e11 vg/ml	2	D1140 y C1841
5	Sustancia negra izquierda y derecha	rAAV- miR5	3e10 vg	10,0 μ L	3,0e12 vg/ml	2	D1421 y C9030

*El hemisferio izquierdo del animal C1303 recibió 15 μ L

[00417] El día 60 ± 3 , todos los NHP fueron sacrificados, y se les extrajo el cerebro, que se colocaron en una matriz cerebral previamente enfriada, se cortaron en secciones de 4 mm y se dividieron en hemisferios izquierdo y derecho para su procesamiento. El hemisferio izquierdo se fijó para histología, y el tejido del hemisferio derecho se diseccionó o se punzó y se procesó para el análisis de biodistribución.

[00418] Las imágenes de IRM con imágenes de contraste de gadolinio mostraron que la sustancia negra fue dirigida con éxito en los animales de prueba. La Tabla 18 muestra la cobertura estimada de la pars compacta de la sustancia negra en cada animal de prueba. Los valores se calcularon a partir de imágenes posteriores a la infusión y son estimaciones del objetivo anatómico y la cobertura de la infusión. Debido a la resolución

limitada del escáner de IRM de 1,5 T, no se pudo hacer ninguna diferenciación entre la pars compacta de la sustancia negra y la reticulata. Los valores proporcionados en la Tabla 18 corresponden a la cobertura de toda la estructura anatómica. Dado que la compacta se encuentra dorsalmente a la reticulata, se espera que la cobertura general de la compacta sea mayor que los valores estimados.

[00419] Tabla 18: Cobertura de la pars compacta de la sustancia negra, %

Grupo	ID	Izquierda	Derecha
1	C1303	38	36
1	D1367	69	56
2	C1671	43	24
2	C1521	59	48
3	D1296	40	16
3	D1440	61	54
4	D1140	26	33
4	C1841	64	51
5	D1421	48	32
5	C9030	34	71

[00420] Se observó una distribución y expresión dependientes de la dosis de rAAV-miR5, que correspondió a una reducción en el ARNm de SNCA durante 2 meses (el punto de tiempo más largo evaluado) después de la infusión bilateral de rAAV-miR5 en la sustancia negra de los NHP (FIG. 21A, 21B y 21C). Los datos globales del ARNm de SNCA también indicaron que la reducción mediada por rAAV-miR5 en el ARNm de SNCA se observó principalmente en la sustancia negra (>40 %). La cuantificación de la tinción de intensidad inmunohistoquímica de la proteína α -syn citoplasmática en neuronas DA TH positivas del SN indica una reducción mediada por rAAV-miR5 dependiente de la dosis, de la proteína α -syn citoplasmática (FIG. 21D).

[00421] La distribución de rAAV-miR5, administrado en dosis de 3×10^{10} vg/SN (FIG. 22A), 3×10^9 vg/SN (FIG. 22B) y 3×10^8 vg/SN (FIG. 22C) se encontraba principalmente contenida en la sustancia negra con una propagación limitada a las estructuras de los ganglios basales conectados del núcleo subtalámico y el globo pálido. En consecuencia, los niveles de ARNm de SNCA mostraron principalmente una reducción dependiente de la dosis en el SN y en algunas regiones adyacentes de los ganglios basales (Fig. 22D). El análisis RT-qPCR del ARNm de SNCA se realizó utilizando una combinación de cebador-sonda validada, y demostró una reducción dependiente de la dosis del ARNm de SNCA en la sustancia negra (en >50 % en una dosis de 3×10^{10} vg/SN) en comparación con el grupo de control (que incluye animales tratados con diluyente y el grupo de control mis11 para tener en cuenta la variabilidad basal del nivel de SNCA endógeno) a los 2 meses posteriores a la necropsia. Se observó una propagación mínima a las regiones de la

médula espinal, y no se observó propagación de los vectores a ningún tejido periférico fuera del SNC. La expresión del producto transgénico miR5 siguió el patrón de distribución de rAAV-miR5, de manera de mostrar una presencia significativa solo en la sustancia negra, con una expresión limitada solo en las estructuras de los ganglios basales adyacentes.

[00422] En general, los datos muestran que la biodistribución de los genomas vectoriales y el producto transgénico miR5 dependía de la dosis y se concentraba en la sustancia negra. El rAAV-miR5 no se propagó significativamente fuera de las regiones cerebrales inyectadas y conectadas anatómicamente.

[00423] El procedimiento neuroquirúrgico fue bien tolerado, no se informaron efectos adversos durante la fase de vida del estudio, y solo hubo cambios histopatológicos mínimos a lo largo del recorrido de la aguja en todos los NHP. No se observaron hallazgos microscópicos relacionados con el rAAV-miR5. Todos los hallazgos microscópicos en el estudio fueron incidentales o relacionados con el procedimiento de infusión. Los puntos de entrada de la cánula y los tractos de inserción, consistentes con el procedimiento de infusión, fueron visibles macroscópicamente en los cerebros de todos los NHP e incluyeron principalmente pérdida y vacuolización del parénquima, macrófagos pigmentados, gliosis y degeneración axonal. La incidencia y la gravedad de estos hallazgos no se asociaron con el tratamiento con rAAV-miR5.

[00424] El estudio de NHP demostró que rAAV-miR5 indujo una reducción estable y dependiente de la dosis tanto del ARNm de SNCA como de la proteína α -Syn cuando se administró mediante administración neuroquirúrgica al cerebro de NHP. En NHP, un procedimiento de administración quirúrgica, similar al utilizado en pacientes humanos, fue bien tolerado y dio como resultado una buena cobertura de la región cerebral objetivo, con cambios histopatológicos mínimos.

[00425] La expresión del producto transgénico (miR5) siguió el patrón de distribución de rAAV-miR5, de manera de mostrar una presencia significativa solo en el SN, con expresión limitada solo en las estructuras de los ganglios basales adyacentes. La reducción mediada por rAAV-miR5 en el ARNm de SNCA se observó principalmente en el SN (>40 %), de manera de proporcionar una reducción dentro del rango objetivo del 25 %-70 %. En general, los datos sugieren que la biodistribución de los genomas vectoriales y el producto transgénico fue dependiente de la dosis y se concentró en el SN. El rAAV-miR5 no se propagó significativamente fuera del sitio de inyección y de las regiones cerebrales conectadas anatómicamente.

[00426] Ejemplo 15: Estudio de dosis de NHP de cuatro meses

[00427] Teniendo en cuenta una reducción de α -syn objetivo del 25 %-70 % y datos preclínicos previos, se planea un estudio de rango de dosis de 4 meses empleando 3×10^{10} vg por hemisferio a 3×10^{11} vg por hemisferio utilizando macacos para proporcionar datos adicionales de biodistribución, farmacología y seguridad. El diseño del estudio se muestra en la Tabla 19.

[00428] Tabla 19

Grupo Nro.	Artículo de prueba	Nivel de dosis/hemisferio	Valoración de formulación (vg/mL)	Volumen/hemisferio (mL)	Nro. de animales (M/F)
1	Diluyente	N/A	NA	0,010	2/2
2	rAAV-miR5	3×10^{10} vg	$0,3 \times 10^{13}$	0,010	2/2
3	rAAV-miR5	1×10^{11} vg	1×10^{13}	0,010	2/2
4	rAAV-miR5	$\sim 3 \times 10^{11}$ vg	$\sim 3 \times 10^{13}$	0,010	2/2

[00429] Se prevé administrar las dosis una vez mediante infusión IP directa mejorada por convección a la sustancia negra, utilizando un marco neuroquirúrgico ClearPoint Orchestra™ emparejado con una cánula neuroventricular ClearPoint SmartFlow, y el direccionamiento se realiza utilizando el soporte lógico de navegación ClearPoint Neuro. Se usa una IRM (3T Siemens Skyra) para la obtención de imágenes.

[00430] Se pueden examinar diversos parámetros y criterios de valoración, tales como uno o más, o todos los siguientes: observaciones, peso corporal, exámenes físicos, FOB neurológico, exámenes oftálmicos, presión arterial, electrocardiografía, evaluaciones de patología clínica, pesos de órganos y exámenes macroscópicos y microscópicos; muestras de tejido (múltiples regiones cerebrales, DRG [cervical, torácico y lumbar], glándula suprarrenal, hígado, pulmón, corazón, riñón, bazo, testículo y ovario) recolectadas en la necropsia, así como sangre y LCR en puntos temporales seleccionados, para análisis de biodistribución y/o biomarcadores. Los tejidos para examen microscópico pueden incluir regiones cerebrales, médula espinal, incluidas las raíces nerviosas (cervical, torácica y lumbar), ganglio de la raíz dorsal ("DRG (por sus siglas en inglés)" (cervical, torácico y lumbar), nervio ciático, hueso, ojo, hígado, bazo, corazón, pulmón, riñón, músculo esquelético, estómago, testículo, epidídimo, ovario, útero y ganglio linfático (cervical y submandibular).

[00431] El ADN genómico de rAAV-miR5 y el transgén de miARN y los niveles de ARNm de SNCA de macaco se pueden examinar en el SNC para determinar el grado de biodistribución y la magnitud de la reducción del ARNm de SNCA (farmacodinámica) en

cada nivel de dosis. Los niveles de proteína α -Syn se pueden medir utilizando múltiples métodos, incluidos los métodos de detección de inmunohistoquímica y quimioluminiscencia mejorada.

[00432] Ejemplo 16: Dosis humanas

[00433] Los datos de dosificación de primates no humanos se pueden utilizar como punto de partida para la extrapolación a objetivos cerebrales humanos, por ejemplo, dosis dirigidas a la sustancia negra para lograr una reducción del 25 % al 75 % en α -syn. Las dosis de NHP se pueden escalar para humanos, por ejemplo, en función de las diferencias volumétricas entre los volúmenes de sustancia negra de macaco adulto y de sustancia negra determinados a partir de pacientes con enfermedad de Parkinson en la misma etapa de la enfermedad que en la población de pacientes objetivo (etapa 1-2,5 de Hoehn & Yahr modificada). Los datos volumétricos de la IRM de sustancia negra están disponibles a través de la base de datos de la Iniciativa de Marcadores de Progresión de Parkinson y los informes publicados asociados (Langley et al, medRxiv [Preimpresión]. 2023.08.19.23294281).

[00434] Si bien la invención se ha descrito e ilustrado con referencia a ciertas formas de realización particulares de la misma, los expertos en la técnica apreciarán que se pueden realizar diversas adaptaciones, cambios, modificaciones, sustituciones, eliminaciones o adiciones de procedimientos y protocolos sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.