

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 023**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2006.01)

**A61P 25/14** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2015** **E 15817385 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019** **EP 3237618**

54 Título: **Supresión del gen de la huntingtina inducida por ARNi**

30 Prioridad:

**24.12.2014 EP 14200308**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**20.11.2019**

73 Titular/es:

**UNIQUE IP B.V. (100.0%)**

**Paasheuvelweg 25a**

**1105 BP Amsterdam , NL**

72 Inventor/es:

**KONSTANTINOVA, PAVLINA STEFANOVA y**

**MINIARIKOVA, JANA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 732 023 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Supresión del gen de la huntingtina inducida por ARNi

**Antecedentes**

5 El gen de la huntingtina, también conocido como el gen HTT o HD (enfermedad de Huntington), codifica la proteína huntingtina. El gen de la huntingtina es un gen grande de aproximadamente 13,5 kb (la proteína huntingtina tiene aproximadamente 350 kDa). La enfermedad de Huntington es un trastorno genético neurodegenerativo causado por una mutación genética en el gen de la huntingtina. La mutación genética implica a un segmento de ADN del gen de la huntingtina conocido como la repetición del trinucleótido CAG. Normalmente, el segmento CAG en el gen de la huntingtina en los seres humanos se repite varias veces, es decir, aproximadamente 10-35 veces. Las personas que desarrollan la enfermedad de Huntington tienen una expansión de la cantidad de repeticiones de CAG en al menos un alelo. Una persona afectada generalmente hereda el alelo mutado de un progenitor afectado. En los casos raros, la persona con la enfermedad de Huntington no tiene un progenitor con el trastorno (HD esporádica). Las personas que poseen entre 36 y 39 repeticiones CAG pueden desarrollar signos y síntomas de la enfermedad de Huntington, mientras que las personas con 40 o más repeticiones casi siempre desarrollan el trastorno. El aumento en el tamaño de la repetición CAG conduce a la producción de una proteína huntingtina alargada (mutada). Esta proteína se procesa en la célula en fragmentos más pequeños que son citotóxicos y que se acumulan y se agregan en las neuronas. Esto da como resultado una interrupción de la función normal y la muerte eventual de las neuronas. Este es el proceso que ocurre en el cerebro que subyace a los signos y síntomas de la enfermedad de Huntington.

20 La interferencia del ARN (ARNi) es un mecanismo natural que involucra la regulación específica de la secuencia del ARNm. La regulación a la baja del ARNm da como resultado una reducción de la cantidad de proteína que se expresa. La interferencia del ARN se desencadena por el ARN bicatenario. Una de las cadenas del ARN bicatenario es sustancial o completamente complementaria a su diana, el ARNm. Esta cadena se denomina la cadena guía. El mecanismo de la interferencia del ARN implica la incorporación de la cadena guía en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Este complejo es un complejo de recambio múltiple que, a través de un apareamiento básico complementario, se une a su ARNm diana. Una vez unido a su ARNm diana, puede dividir el ARNm o reducir la eficiencia de la traducción. La interferencia del ARN se ha utilizado ampliamente desde su descubrimiento para destruir genes diana específicos. Los desencadenantes para inducir la interferencia del ARN que se han empleado involucran el uso de ARNsi o ARNsh. Además, las moléculas que pueden desencadenar naturalmente el ARNi, los llamados miARN, se han utilizado para preparar miARN artificiales que imitan a sus contrapartes naturales. Estas estrategias tienen en común que proporcionan moléculas de ARN sustancialmente bicatenario que están diseñadas para reconocer a un gen de elección. Diversos enfoques terapéuticos basados en ARNi que utilizan la modalidad de la secuencia específica del ARNi se encuentran en desarrollo y varios están actualmente en la fase de ensayos clínicos (ver i.a. Davidson y McCray, Nature Reviews - Genetics, 2011; Vol.12; 329- 340).

35 Dado que la enfermedad de Huntington implica la expresión de una proteína de huntingtina mutante, la acumulación de la misma conduce a la enfermedad, la interferencia de ARN brinda la oportunidad de tratar la enfermedad, ya que puede reducir la expresión del gen de la huntingtina. El paradigma subyacente a este enfoque implica una reducción de la proteína Htt mutante para reducir así los efectos tóxicos resultantes de la proteína Htt mutante que logra una reducción y/o retraso de los síntomas de la enfermedad de Huntington, o incluso para prevenir los síntomas de la enfermedad de Huntington por completo. La supresión del gen de la huntingtina se ha formulado como hipótesis en la técnica anterior, incluida la lista de aproximadamente dos mil secuencias diana de ARNsi hipotéticas (documento WO2005105995). Las estrategias para reducir la expresión del gen de la huntingtina son conocidas en la técnica e involucran la selección específica de genes de la huntingtina mutantes (por ejemplo, documentos US20090186410, US20110172291). Alternativamente, la interferencia del ARN también se ha empleado para reconocer a genes mutantes y no mutantes (por ejemplo, Rodríguez-Lebron et al., 2005, Mol Ther. Vol 12 No.4: 618-633; Franich et al., 2008, Mol Ther, vol. 16 Numero 5; 947-956; Drouet et al., 2009, Annals of Neurology; Vol. 65 No. 3; 276-285 y McBride et al. Mol Ther. 2011 Dec; 19 (12): 2152-62; documento US20080015158, documento WO2008134646). En este último caso, se ha demostrado que el bloqueo natural de la proteína huntingtina no tiene ningún efecto perjudicial aparente.

**Compendio de la invención**

50 La presente invención proporciona un ARN bicatenario que comprende una primera secuencia de ARN y una segunda secuencia de ARN en la que la primera y la segunda secuencia de ARN son sustancialmente complementarias; caracterizado porque la primera secuencia de ARN tiene una longitud de secuencia de al menos 19 nucleótidos y es sustancialmente complementaria de la SEC. ID NO. 1, en la que la primera cadena se selecciona del grupo que consiste en SEC ID NO.3, SEC ID NO.4, SEC ID NO.5, SEC ID NO. 6 y SEC ID NO. 7 y en la que el ARN bicatenario es capaz de reducir la expresión del gen de la huntingtina. Se probó una gran cantidad de secuencias diana para el bloqueo efectivo del gen de la huntingtina. Se encontró que el ARN bicatenario seleccionado de la presente invención era eficaz para reducir la expresión del gen de la huntingtina. Dicho ARN bicatenario, cuando se proporciona en una célula, ya sea directamente a través de la transfección o indirectamente a través de la administración de ADN (por ejemplo, transfección) o a través de la expresión mediada por vector sobre la cual se puede expresar dicho ARN bicatenario, es capaz de reducir la expresión de tanto el gen de la huntingtina

mutado como cualquier gen normal de la huntingtina. Además, se demostró que el ARN bicatenario de la invención era capaz de reducir la expresión del gen diana cuando se proporcionaba como un ARNip o en una estructura de miARN. Cuando se probó en un modelo animal, se demostró que el ARN bicatenario según la invención era capaz de reducir la muerte celular neuronal y los agregados de huntingtina. El ARN bicatenario, como se proporciona en la presente invención, proporciona una mejora en comparación con los ARN bicatenario en la técnica que se refiere al gen de la huntingtina, o proporciona al menos una alternativa al mismo.

El ARN bicatenario, según la invención, se puede proporcionar como un ARNip, un ARNsh, un pre-miRNA o un pri-miRNA. Dichos ARN bicatenarios pueden administrarse directamente a las células diana, p. ej. a través de la captación celular utilizando, por ejemplo, métodos de transfección. Preferiblemente, dicho suministro se logra usando un vector de terapia génica, en el que se incluye en un vector un casete de expresión para el ARNip, ARNhc, pre-miRNA o pri-miRNA. De esta manera, se puede proporcionar a las células un suministro constante de ARN bicatenario para lograr la supresión del gen de la huntingtina duradera sin requerir una administración repetida. Preferiblemente, el vector viral de elección es el AAV5. La presente invención también proporciona así el uso médico de un ARN bicatenario según la invención, tal como el tratamiento de la enfermedad de Huntington, en donde dicho uso médico también puede comprender un casete de expresión o un vector viral, tal como el AAV5, capaz de expresar dicho ARN bicatenario de la invención.

### Figuras

Figura 1. Gen de la huntingtina humana (HTT) y secuencias diana. (A) Esquema del gen HTT humano (L27350.1) con expansiones de CAG (negro) y secuencias diana para miH1-H21 (gris claro) (B) Secuencia de ARN del exón 1 del gen HTT (SEC ID NO.2). La secuencia de repetición CAG es desde los nts. 367-429. (C) Esquema de las secuencias diana analizadas para el exón 1 (H1, 185-205; H2, 186-206; H3, 189-209; H4, 191-211; H5, 194-214; H6, 196-216; H7, 250-270; H8, 261-281, H9, 310-330; H10, 311-331, H11, 339-359, H12, 345-365, H13, 454-474; H14, 459-479; H15, 477-497; H16, 486-506; H17, 492-512; H18, 498-518; H19, 549-569; H20, 557-577; H21, 558-578, H1-H21 correspondiente a las SEC ID NOs. 23-43). Las secuencias representadas son secuencias de ADN. Los números se refieren a las secuencias de nucleótidos de ARN correspondientes en la SEC ID NO.2. Las secuencias diana de ARN correspondientes de SEC ID NO.2 tienen la secuencia que se enumera en C), excepto que en donde el ADN codifica una "t", el ARN codifica un "U".

Figura 2. Ejemplos de ARN bicatenarios y casetes de expresión. (A) Ejemplos de estructuras pri-/pre-miRNA para miH12 pre-miH12-155 (SEC ID NO.44) y estructura pre-miH12-451 (SEC ID NO.45) con guía de miH12 (gris) indicada. (B) Representación esquemática de los ARN bicatenario de acuerdo con la invención y cómo pueden ser procesados por la maquinaria del ARNi. Un ARN bicatenario puede ser un ARN de horquilla corta (1) o un ARNip extendido (2). El ARN de horquilla o el ARNip extendido tiene la primera secuencia de ARN en el extremo proximal, como se indica (indicado con 1 y paréntesis). Un ARN corto de horquilla o un ARNip extendido pueden procesarse por la maquinaria de ARNi en la célula para producir un ARNip (3), que también puede ser un ARN bicatenario según la invención, de los cuales una cadena que comprende la primera secuencia de ARN puede ser incorporada en el complejo RISC (4). Un ARN bicatenario puede estar comprendido en una secuencia de pri-miARN (5) o una secuencia de pre-miARN (6). El pri-miARN puede ser procesado por la maquinaria del ARNi para producir un pre-miARN y posteriormente un dúplex de miARN maduro (7), de los cuales una cadena que comprende la primera secuencia de ARN puede incorporarse en el complejo RISC (4). La posición de la primera secuencia de ARN en el dúplex de pre-miRNA, pri-miRNA y miRNA se indica con 1 y paréntesis. (C) Secuencia de ADN del casete de expresión pVD-CMV-miH12-155 (promotor CMV (1-588), secuencia intermedia, secuencia de GFP de la proteína fluorescente verde (713-1432), flanco 5' pri-miRNA (1433-1514), pre-miARN 5', cadena guía (primera secuencia de ARN) (1520-1540), secuencia de bucle, cadena de pasajero (segunda secuencia de ARN) (1560-1578), pre-miARN 3') flanco pri-miARN 3' (1584 -1704), señal HSV TKpolyA (1705-1976); (D) secuencia de ADN de pVD-CAG-miH12-451 (promotor CAG (43-1715), flanco 5' pri-miRNA (1716-2017), pre-miRNA 5', cadena guía (primera secuencia de ARN) (2034-2054), segunda secuencia de ARN y, 3' pre-miARN, flanco 3' pri-miARN (2090-2320), señal de hGH poli A (2321-2417) y (E) secuencia de ADN del casete de expresión pVD-PGK-miH12-451 (promotor PGK (23-277), flanco 5' pri-miRNA (278-794), 5' pre-miRNA, cadena guía (primera secuencia de ARN) (811-831), segunda secuencia de ARN y, 3' pre-miRNA, flanco 3' pri-miRNA (867-1097), señal de hGH poliA (1098-1194). (F) secuencia pri-miH12-155 que está codificada por pVD-CMV-miH12-155. (G) secuencia pri-miH12-451 que está codificada por pVD-CAG-miH12-451. (G) secuencia pri-miH12-451 que está codificada por pVD-PGK-miH12-451. Para la figura (E), (F) y (G), el tipo de letra es la misma que se usó anteriormente para el ADN correspondiente. Las secuencias promotoras están en negrita, la secuencia de la proteína verde fluorescente está en cursiva subrayada (solo C), las secuencias de pri-miRNA tienen un tipo de letra normal, la cadena guía (primera secuencia de ARN) está en cursiva y en negrita y la cadena pasajera o la segunda secuencia de ARN está en cursiva, las secuencias pre-miRNA están subrayadas y la señal poliA está subrayada en negrita.

Figura 3. Eficacia de bloqueo in vitro de miH1 -21. (A) Bloqueo total de HTT apuntando al exón 1. LucHTT se cotransfectó en células Hek293T con miH1-miH21. La fluorescencia de luciferasa en Renilla y luciérnaga se midió 48 h después de la transfección. miScr (ctrl) se utilizó como control negativo y se estableció en 100%. miH12 mostró la mayor eficiencia de bloqueo. (B) El bloqueo de LucHTT fue por el siH12 sintético con 19-23 nucleótidos de longitud.

Figura 4. Eficacia de bloqueo in vitro de miH12-451 con diferentes promotores. (A) El indicador LucHTT se ha cotransfectado con las variantes de CAG-miH12 o PGK-miH12 y la eficacia de bloqueo se determinó como se describió anteriormente para la Fig. 3. (B) La actividad de la cadena del pasajero (\*) de miH12-451\*, expresada a partir de los promotores CAG o PGK, se midió en los indicadores específicos de LucHTT\*. No se detectó ninguna actividad en la cadena de pasajero.

Figura 5. Eficacia in vivo de miH12 suministrado por AAV5. (A) Configuración experimental. A los ratones se les coinyectó AAV5-Luc73QHTT y AAV5-CMV-miScr-155 o AAV5-CMV-miH12-155 en una proporción de 1:5. Los puntos de medición se indican con flechas; (B) se midió el bloqueo de AAV5-Luc73QHTT en animales 6 semanas p.i. por IVIS; (C) Tendencia de bloqueo de AAV5-Luc73QHTT por AAV5-miH12 hasta 6 semanas p.i.

Figura 6. Prueba de concepto de bloqueo de HTT humano en un modelo mecanicista de rata HD. (A) Configuración experimental; (B) histología cerebral que muestra menos neurodegeneración (DARP32) y menos agregados de Htt mutantes (EM48) en el grupo AAV5-CMV-miH12-155; (C) histología cerebral de GFP; (D) histología cerebral con marcador de la activación inmune Iba1.

Figura 7. Bloqueo de HTT humano en el modelo de ratón Hu97/18 HD humanizado. (A) Eficacia de la transducción en cerebro murino tras una inyección intraestriatal lenta, inyección intraestriatal por convección con difusión mejorada (CED) o inyección intracerebral ventricular (ICV) de AAV5-CMV-miH12-155. La fluorescencia de GFP se observó 5 semanas después de la inyección. (B) La transferencia Western mide el bloqueo de HTT humano en cerebro murino tras la administración de AAV5-miHTT. (C) Cuantificación por transferencia Western de HTT.

Figura 8. Comparación de la diana H12 seleccionada con secuencias diana de la técnica anterior. LucHTT se cotransfectó en células Hek293T con las construcciones de ARNip (A) y miRNA (B y C) indicadas. La fluorescencia de luciferasa de Renilla y luciérnaga se midió 48 h después de la transfección. miH12 y siH 12 mostraron la mayor eficiencia de bloqueo.

### Descripción detallada

La presente invención proporciona un ARN bicatenario que comprende una primera secuencia de ARN y una segunda secuencia de ARN en la que la primera y la segunda secuencia de ARN son sustancialmente complementarias, caracterizadas porque la primera secuencia de ARN tiene una longitud de secuencia de al menos 19 nucleótidos y es sustancialmente complementaria de la SEC. ID NO. 1, en la que la primera cadena se selecciona del grupo que consiste en SEC ID NO.3, SEC ID NO.4, SEC ID NO.5, SEC ID NO. 6 y SEC ID NO. 7, y en la que el ARN bicatenario es capaz de reducir la expresión del gen de la huntingtina.

La SEC ID NO.1 (5'-CUUCGAGUCCUCAAGUCCUU-3') corresponde a una secuencia diana del gen de la huntingtina del exón 1 (SEC ID NO. 2). El exón 1, como se muestra en la Figura 1B tiene 21 secuencias CAG repetidas desde los nt. 367-429. La secuencia del exón 1, como se muestra en la fig. 1B, corresponde a un gen de huntingtina normal que no está asociado con la enfermedad. Los genes de la huntingtina mutantes correspondientes asociados con la enfermedad de Huntington comprenden mucho más de 21 secuencias de repetición CAG. Como se dijo, con de 36 a 39 repeticiones CAG, se pueden desarrollar signos y síntomas de la enfermedad de Huntington, mientras que con 40 o más repeticiones, casi siempre se desarrolla el trastorno. La secuencia diana SEC ID NO.1 está comprendida en prácticamente todas las secuencias del exón 1, independientemente del número de repeticiones CAG.

La SEC ID NO. 1 corresponde a los nucleótidos nrs. 345-365 de la SEC ID NO.2. Se probaron 18 secuencias diana diferentes en el exón 1 para determinar la orientación utilizando ARN bicatenarios que se diseñaron para inducir una inhibición específica de la secuencia de la SEC ID NO.2. (véanse la figura 1 y la figura 3A) y se encontró que, en particular, la diana de esta secuencia desde el exón 1 fue útil para reducir la expresión del gen de la huntingtina. Se encontró que los ARNip que varían en longitud, es decir, que consisten en 19, 20, 21, 22 y 23 pares de bases consecutivas con 2 salientes de nucleótidos además, eran efectivos contra esta secuencia, así como dos estructuras miARN separadas que llevaban una secuencia de 21 nucleótidos complementaria a la SEC. ID NO.1 en la posición de la secuencia guía (véanse las figuras 3A, 3B y 4). Por lo tanto, la primera secuencia de ARN, que es sustancialmente complementaria a la secuencia diana de la huntingtina SEC ID NO.1, tiene una longitud de secuencia de al menos 19 nucleótidos.

La primera secuencia de ARN de acuerdo con la invención está comprendida en la cadena guía del ARN bicatenario, también denominada cadena antisentido, ya que es complementaria ("anti") a la secuencia diana de sentido. La segunda secuencia de ARN está comprendida en la cadena pasajera, también denominada "cadena de sentido", ya que puede tener una identidad de secuencia sustancial o ser idéntica a la secuencia diana. Las secuencias de ARN primera y segunda están comprendidas en un ARN bicatenario y son sustancialmente complementarias. Dicho ARN bicatenario, según la invención, es para inducir la interferencia del ARN y reducir de ese modo tanto la expresión de genes mutantes de huntingtina como naturales. Por lo tanto, se entiende que sustancialmente complementario significa que no se requiere que todos los nucleótidos de la primera y la segunda secuencia de ARN se emparejen, es decir, que sean completamente complementarios, o todos los nucleótidos de la primera secuencia de ARN y la SEC ID NO.1 se emparejen. Siempre que el ARN bicatenario sea capaz de inducir la

interferencia del ARN para secuenciar de este modo específicamente una secuencia que comprenda la SEC ID NO.1, tal complementariedad sustancial se contempla en la invención.

Por lo tanto, el ARN bicatenario según la invención comprende una primera secuencia de ARN y una segunda secuencia de ARN, en donde la primera y la segunda secuencia de ARN son sustancialmente complementarias, y en donde la primera secuencia de ARN tiene una longitud de secuencia de al menos 19 nucleótidos y es complementaria a la SEC ID NO. 1, siendo capaz de inducir la interferencia de ARN para secuenciar específicamente la expresión de un transcrito de ARN que comprende la SEC ID NO.1. En la invención, dicha inducción de interferencia de ARN, que reduce la expresión de un transcrito de ARN que comprende la SEC ID NO.1, significa que es para reducir la expresión del gen de la huntingtina humano.

Se puede determinar fácilmente si este es el caso mediante el uso de ensayos estándar de indicadores de luciferasa y controles apropiados, como se describe en los ejemplos y como se conoce en la técnica (Zhuang et al. 2006 *Methods Mol Biol.* 2006; 342:181-7). Por ejemplo, un indicador de luciferasa que comprende la SEC ID N° 1 puede usarse para mostrar que el ARN bicatenario de acuerdo con la invención es capaz de bloquear la secuencia específica. Además, como se muestra en la sección del ejemplo, la expresión de la huntingtina se puede determinar con anticuerpos específicos para determinar la cantidad de expresión en un análisis de transferencia Western, al igual que el análisis de transferencia Northern que detecta la cantidad de transcripción de ARN.

Por lo tanto, el ARN bicatenario según la invención es para usarlo en la inducción de la interferencia del ARN. El ARN bicatenario según la invención es para usarlo en la reducción de la expresión de transcripciones que comprenden la SEC ID NO.1, como por ejemplo la SEC ID NO.2 o similares con un número variable de repeticiones CAG.

Como se dijo, el ARN bicatenario es capaz de inducir interferencia de ARN. Se sabe de la técnica que las estructuras de ARN bicatenario son adecuadas para inducir el ARNi. Por ejemplo, un ARN interferente pequeño (ARNip) comprende dos cadenas de ARN separadas, una cadena que comprende la primera secuencia de ARN y la otra cadena que comprende la segunda secuencia de ARN. Un diseño de ARNip que se usa a menudo implica 19 pares de bases consecutivas con salientes de dos nucleótidos en 3' (véase la figura 2A). Este diseño se basa en el procesamiento de Dicer observado de ARN bicatenarios más grandes que dan como resultado los ARNsi que tienen estas características. El saliente 3' puede estar comprendido en la primera secuencia de ARN. El saliente 3' puede ser añadido a la primera secuencia de ARN. La longitud de las dos cadenas de las que está compuesto un ARNip puede ser de 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 ó 27 nucleótidos o más. Cada una de las dos cadenas comprende la primera y la segunda secuencia de ARN. La cadena que comprende la primera secuencia de ARN también puede consistir en la misma. La cadena que comprende la primera secuencia de ARN también puede consistir en la primera secuencia de ARN y la secuencia del saliente.

Los ARNip también pueden servir como sustratos Dicer. Por ejemplo, un sustrato Dicer puede ser un 27 unidades que consista en dos cadenas de ARN con 27 pares de bases consecutivas. La primera secuencia de ARN se coloca en el extremo 3' del dúplex de 27 unidades. En el extremo 3', como en el caso de los ARNip, hay un saliente de dos nucleótidos. El saliente 3' puede estar comprendido en la primera secuencia de ARN. El saliente 3' puede ser añadido a la primera secuencia de ARN. En el 5' de la primera secuencia de ARN, se pueden incluir secuencias adicionales que sean complementarias a la secuencia diana adyacente a la SEC ID NO.1 o no. El otro extremo del sustrato Dicer de ARNsi tiene un extremo romo. Este diseño de sustrato Dicer da como resultado una preferencia en el procesamiento por Dicer de tal manera que se forma un ARNip como el diseño de ARNip como se describió anteriormente, con 19 pares de bases consecutivas y 2 salientes de nucleótidos en ambos extremos 3'. En cualquier caso, los ARNip, o similares, están compuestos por dos cadenas de ARN separadas (Fire et al. 1998, *Nature*. 1998 19 de febrero; 391 (6669): 806-11) comprendiendo o consistiendo cada cadena en el ARN de la primera y la segunda secuencia de acuerdo con la invención.

El ARN bicatenario según la invención no requiere que tanto la primera como la segunda secuencia de ARN estén comprendidas en dos cadenas separadas. La primera y la segunda secuencia de ARN también pueden estar comprendidas en una sola cadena de ARN, como p. ej. un ARNhc. Un ARNhc puede comprender desde 5'- segunda secuencia de ARN - secuencia de bucle - primera secuencia de ARN - secuencia del saliente opcional de 2 nt - 3'. Alternativamente, un ARNhc puede comprender desde 5'- primera secuencia de ARN - secuencia de bucle - segunda secuencia de ARN - secuencia del saliente opcional de 2 nt - 3'. Dicha molécula de ARN forma pares de bases intramoleculares a través de la primera y segunda secuencia de ARN sustancialmente complementarias. Las secuencias bucle adecuadas son muy conocidas en la técnica (es decir, como se muestra en Dallas et al. 2012 *Nucleic Acids Res.* 2012 Oct; 40 (18): 9255-71 y Schopman et al., *Antiviral Res.* 2010 Mayo; 86 (2): 204-11).

La secuencia bucle también puede ser una secuencia de tallo-bucle, por lo que se extiende la región bicatenaria del ARNsh. Sin estar vinculado a ninguna teoría, como el sustrato de ARNip Dicer que se describe anteriormente, un ARNhc generalmente es procesado por Dicer para obtener, por ejemplo, un ARNsi que tiene un diseño de ARNsi tal como se describe anteriormente, que tiene, p. ej., 19 pares de bases consecutivas y saliente de 2 nucleótidos en ambos extremos 3'. En el caso de que el ARN bicatenario sea procesado por Dicer, se prefiere tener la primera y la segunda secuencia de ARN al final de.

Un ARN bicatenario según la invención también puede incorporarse en una estructura pre-miARN o pri-miARN. Los micro ARN, es decir, miARN, son cadenas guía que se originan a partir de moléculas de ARN bicatenario que se expresan, p. ej. en células de mamíferos. Un miARN se procesa a partir de una molécula precursora pre-miARN, similar al procesamiento de un ARNhc o un ARNip extendido como se describe anteriormente, por la maquinaria de ARNi y se incorpora en un complejo de silenciamiento inducido por ARN activado (RISC) (Tijsterman M, Plasterk RH. *Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. Cell.* 2 de abril de 2004; 117 (1):1-3). Sin estar limitado por ninguna teoría, un pre-miARN es una molécula en forma de horquilla que puede ser parte de una molécula de ARN más grande (pri-miARN), por ejemplo, comprendida en un intrón, que primero es procesado por Drosha para formar una molécula de horquilla pre-miARN. La molécula pre-miARN es una molécula similar a ARNhc que posteriormente puede ser procesada por Dicer para dar como resultado un dúplex bicatenario similar a ARNip. El miARN, es decir, la cadena guía, que forma parte del dúplex de ARN bicatenario se incorpora posteriormente en RISC. Una molécula de ARN tal como está presente en la naturaleza, es decir, un pri-miARN, un pre-miARN o un miARN dúplex, se puede usar como estructura para producir un miARN artificial que reconoce específicamente un gen de elección. Basado en la estructura de ARN predicha, por ej., como se predijo usando, por ejemplo, el software m-fold, la secuencia de miARN natural, tal como está presente en la estructura del ARN (es decir, dúplex, pre-miARN o pri-miARN), y la secuencia presente en la estructura que es complementaria con la misma se eliminan y reemplazan con una primera secuencia de ARN y una segunda secuencia de ARN de acuerdo con la invención. La primera secuencia de ARN y la segunda secuencia de ARN pueden seleccionarse de manera tal que las estructuras de ARN que se forman, es decir, pre-miARN, pri-miARN y/o el dúplex miARN, se parezcan a las secuencias originales predichas correspondientes. Los dúplex de pre-miARN, pri-miARN y miARN (que consisten en dos cadenas de ARN separadas que se hibridan a través del apareamiento de bases complementarias), como se encuentra en la naturaleza, a menudo no están completamente apareados por bases, es decir, no todos los nucleótidos que se corresponden con la primera y segunda cadena como se definió anteriormente están apareados, y la primera y la segunda cadena a menudo no tienen la misma longitud. La forma de usar moléculas precursoras de miARN como estructuras para cualquier secuencia diana seleccionada y la primera secuencia de ARN sustancialmente complementaria se describe, p. ej. en Liu YP *Nucleic Acids Res.* 2008 Mayo; 36 (9): 2811 -24.

En cualquier caso, como queda claro a partir de lo anterior, el ARN bicatenario que comprende la primera y la segunda secuencia de ARN puede comprender nucleótidos adicionales y/o secuencias de nucleótidos. El ARN bicatenario puede estar comprendido en una secuencia de ARN única o comprendido en dos cadenas de ARN separadas. Sin pretender imponer ninguna teoría, cualquiera que sea el diseño que se use para el ARN bicatenario, está diseñado de manera tal que una secuencia antisentido que comprende la primera secuencia de ARN de la invención puede procesarse por la máquina de ARNi de manera que pueda incorporarse en el complejo RISC para tener su acción. Dicha secuencia que comprende o consiste en la primera secuencia de ARN de la invención es capaz de reconocer específicamente la secuencia SEC ID NO.1. Por lo tanto, siempre que el ARN bicatenario sea capaz de inducir ARNi, tal ARN bicatenario se contempla en la invención. Por lo tanto, en una realización, el ARN bicatenario según la invención está comprendido en una estructura pre-miARN, una estructura pri-miARN, un ARNsh o un ARNip.

El término complementario se define en este documento como los nucleótidos de una secuencia de ácidos nucleicos que puede unirse a otra secuencia de ácido nucleico a través de enlaces de hidrógeno, es decir, nucleótidos que son capaces de emparejarse. Los ribonucleótidos, los bloques de construcción del ARN, están compuestos de monómeros (nucleótidos) que contienen un azúcar, fosfato y una base que es una purina (guanina, adenina) o pirimidina (uracilo, citosina). Las cadenas de ARN complementarias forman ARN bicatenario. Se puede formar un ARN bicatenario a partir de dos cadenas de ARN complementarias separadas o las dos cadenas de ARN complementarias pueden estar comprendidas en una cadena de ARN. En las cadenas de ARN complementarias, los nucleótidos citosina y guanina (C y G) pueden formar un par de bases, guanina y uracilo (G y U), y uracilo y adenina (U y A). El término complementariedad sustancial significa que no se requiere que la primera y la segunda secuencia de ARN sean completamente complementarias, o que la primera secuencia de ARN y la SEC ID NO.1 sean completamente complementarias. Por ejemplo, el primer y segundo nucleótidos, como se muestra en la figura 2A, son sustancialmente complementarios y no completamente complementarios.

De acuerdo con la invención, la complementariedad entre la primera secuencia de ARN y la SEC ID NO.1 consiste en no tener apareamientos erróneos. Se entiende que un nucleótido no apareado significa que, a lo largo de toda la longitud de la primera secuencia de ARN que se basa en la SEC ID NO.1, el nucleótido no se empareja con la SEC ID NO.1. No tener desajustes significa que todos los pares de bases de nucleótidos con SEC ID NO.1, y con 2 apareamientos erróneos significa que dos nucleótidos no se emparejan con SEC ID NO.1. La primera secuencia de ARN también puede ser más larga que 21 nucleótidos, en este escenario, la complementariedad sustancial se determina en toda la longitud de la SEC ID NO.1. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 3B y los ejemplos, se analizaron los ARNsi que tenían una longitud de la primera secuencia de nucleótidos de 22 y 23 nucleótidos. Estas primeras secuencias de nucleótidos no tenían apareamientos erróneos y eran completamente complementarias a la SEC ID NO.1. El ARN bicatenario de acuerdo con la invención es capaz de reducir la expresión de los transcritos que comprenden la SEC ID NO.1, como un indicador de luciferasa o, por ejemplo, una transcripción que comprende la SEC ID NO.1. De acuerdo con esta invención, la complementariedad entre la primera secuencia de ARN y la SEC ID NO.1 consiste en no tener apareamientos erróneos en toda la longitud de la primera secuencia de ARN o la SEC ID NO.1, la que sea la más corta.

En una realización, la primera secuencia de ARN y la SEC ID NO.1 tienen al menos 19 nucleótidos en ese par de bases. Preferiblemente, la primera secuencia de ARN y la SEC ID NO. 1 son sustancialmente complementarias, y dicha complementariedad comprende al menos 19 pares de bases. En otra realización, la primera secuencia de ARN tiene al menos 19 nucleótidos consecutivos que forman un par de bases con los nucleótidos consecutivos de la SEC ID NO.1. En otra realización, la primera secuencia de ARN tiene al menos 19 nucleótidos consecutivos que forman un par de bases con los 19 nucleótidos consecutivos de la SEC ID NO.1.

Como se dijo, un apareamiento erróneo de acuerdo con la invención significa que un nucleótido de la primera secuencia de ARN no se empareja con la SEC ID NO.1. Los nucleótidos que no forman pares de bases son A y C, C y U, o A y G. Un apareamiento erróneo también puede dar como resultado una eliminación de un nucleótido, o una inserción de un nucleótido. Cuando el apareamiento erróneo es una eliminación en la primera secuencia de ARN, esto significa que algún nucleótido de la SEC ID NO.1 no está emparejado con la primera secuencia de ARN cuando se compara con la longitud total de la primera secuencia de ARN. Los nucleótidos que pueden formar pares de bases son A-U, G-C y G-U. El par de bases G-U también se denomina apareamiento por balanceo G-U. En una realización, el número de pares de bases G-U entre la primera secuencia de ARN y la SEC ID NO.1 es 0, 1 ó 2. En una realización, no hay apareamientos erróneos entre la primera secuencia de ARN y SEC ID NO.1 y se permiten un par de bases G-U o pares G-U. Preferiblemente, no puede haber pares de bases G-U entre la primera secuencia de ARN y la SEC ID NO.1, o la primera secuencia de ARN y la SEC ID NO.1 solo tiene pares de bases que son A-U o G-C. Preferiblemente, no hay pares de bases G-U y no hay apareamientos erróneos entre la primera secuencia de ARN y la SEC ID NO.1. Por lo tanto, la primera secuencia de ARN del ARN bicatenario según la invención preferiblemente es completamente complementaria a la SEC ID NO.1, y dicha complementariedad consiste en las pares de bases G-C y A-U.

Sin estar ligado a ninguna teoría, tener una complementariedad completa entre la primera secuencia de ARN y la SEC ID NO.1 puede permitir que el complejo RISC activado que comprende dicha primera secuencia de ARN escinda su secuencia diana, mientras que tener apareamientos erróneos solo puede producir la inhibición de la traducción, dando como resultado esto último una inhibición menos potente.

La primera secuencia de ARN de acuerdo con la invención se selecciona de las SEC ID NO. 3-7.

SEQ ID NO.	Primera secuencia de ARN	longitud
3	5'-AAGGACUUGAGGGACUCGA-3'	19
4	5'-AAGGACUUGAGGGACUCGAA-3'	20
5	5'-AAGGACUUGAGGGACUCGAAG-3'	21
6	5'-AAGGACUUGAGGGACUCGAAGG-3'	22
7	5'-AAGGACUUGAGGGACUCGAAGGC-3'	23

Tabla 1: Primeras secuencias de ARN.

Se ha demostrado que las primeras secuencias de ARN de la tabla 1 inhiben específicamente los transcritos que comprenden la SEC ID NO.1 como se describe en la sección de ejemplos.

La primera secuencia de nucleótidos del ARN bicatenario según la invención es completamente complementaria con la SEC ID NO.1. Esto significa que no hay apareamientos erróneos entre la primera secuencia de ARN y la SEC ID NO.1 en toda la longitud de la primera secuencia de ARN o la SEC ID NO.1, cualquiera que sea la más corta. Preferiblemente, la primera secuencia de nucleótidos y la SEC ID NO.1 son completamente complementarias, y comprenden solo las pares de bases G-C y A-U. Preferiblemente, la primera secuencia de ARN se selecciona del grupo que consiste en las SEC ID NO 3-7, que son completamente complementarias con la SEC ID NO.1. Lo más preferiblemente, la primera secuencia de ARN es la SEC ID NO. 5. Cuando la primera secuencia de nucleótidos tiene 21 nucleótidos o menos (SEC ID NO. 3, 4 y 5), todos los nucleótidos de la primera secuencia de nucleótidos se aparean con SEC ID NO.1. Cuando la primera secuencia de nucleótidos es más larga que 21 nucleótidos (SEC ID NOs. 6 y 7), todos los nucleótidos de SEC ID NO.1 forman un par de bases con la primera secuencia de nucleótidos. Los nucleótidos adicionales que están comprendidos en la primera secuencia de ARN no forman pares de bases con la SEC ID NO.1. Cuando la primera secuencia de nucleótidos es más larga de 21 nucleótidos y otros nucleótidos deben ser parte de la cadena guía, preferiblemente los otros nucleótidos son complementarios con la secuencia que flanquea la secuencia de la SEC ID NO.1, cuando está presente en la SEC ID NO.2.

Con respecto a la segunda secuencia de ARN, la segunda secuencia de ARN es sustancialmente complementaria con la primera secuencia de ARN. La segunda secuencia de ARN combinada con la primera secuencia de ARN forma un ARN bicatenario. Como se ha dicho, esto es para formar un sustrato adecuado para la maquinaria de

interferencia de ARN, de modo que una secuencia guía derivada de la primera secuencia de ARN esté comprendida en el complejo RISC para secuenciar específicamente e inhibir la expresión de su diana, es decir, la expresión génica de la huntingtina. Como se ha dicho, dicho ARN bicatenario está comprendido preferiblemente en una estructura pre-miARN, una estructura de pri-miARN, un shARN o un ARNip.

5 La secuencia de la segunda secuencia de ARN tiene similitudes con la secuencia diana. Sin embargo, la complementariedad sustancial con la primera secuencia de ARN puede seleccionarse para disponer de una complementariedad menos sustancial en comparación con la complementariedad sustancial entre la primera secuencia de ARN y la SEC ID NO.1. Por lo tanto, la segunda secuencia de ARN puede comprender 0, 1, 2, 3, 4 o más apareamientos erróneos, 0, 1, 2, 3 o más pares de bases de balanceo de G-U, y puede comprender inserciones de 0, 1, 2, 3, 4 nucleótidos y/o deleciones de 0, 1, 2, 3, 4 nucleótidos. Preferiblemente, la primera secuencia de ARN y la segunda secuencia de ARN son sustancialmente complementarias, comprendiendo dicha complementariedad 0, 1, 2 ó 3 pares de bases G-U y/o en donde dicha complementariedad comprende al menos 17 pares de bases.

15 Estos apareamientos erróneos, los pares de bases de balanceo G-U, las inserciones y las eliminaciones, son con respecto a la primera secuencia de ARN, es decir, la región bicatenaria que se forma entre la primera y la segunda secuencia de ARN. Mientras la primera y la segunda secuencia de ARN pueden sustancialmente formar pares de bases, y son capaces de inducir una inhibición específica de secuencia de la SEC ID NO.1, se permite tal complementariedad sustancial de acuerdo con la invención. También se entiende que la complementariedad sustancial entre la primera secuencia de ARN y la segunda secuencia de ARN puede depender del diseño de ARN bicatenario elegido. Puede depender, por ejemplo, de la estructura de miARN que se elija para la incorporación del ARN bicatenario.

SEQ ID NO.	Segunda secuencia de ARN	longitud
8	5'-UCGAGUCCCUC AAGUCCUU-3'	19
9	5'-UUCGAGUCCCUC AAGUCCUU-3'	20
10	5'-CUUCGAGUCCCUC AAGUCCUU-3'	21
11	5'-CCUUCGAGUCCCUC AAGUCCUU-3'	22
12	5'-GCCUUCGAGUCCCUC AAGUCCUU-3'	23
13	5'-CUUCGAGUCUCAAGUCCUU-3'	19
14	5'-ACGAGUCCCUC AAGUCCUC-3'	19

Tabla 2. Segundas secuencias de ARN.

25 En una realización, la segunda secuencia de ARN se selecciona del grupo que consiste en las SEC ID NO. 8-14. En la Tabla 2, se enumeran ejemplos de dichas segundas secuencias de ARN de acuerdo con la invención. Las SEC ID NOs. 8, 9, 10, 11 y 12 son completamente complementarios con la SEC ID NO.1 en toda su longitud. Las SEC ID NOs. 13 y 14 pueden combinarse con un primer nucleótido que tiene una secuencia correspondiente a la SEC ID NO.5 de 21 nucleótidos, que es complementaria con la SEC ID NO.1 en toda su longitud. La SEC ID NO.13 es complementaria de la SEC ID NO.5 que tiene una deleción de dos nucleótidos (lo que da como resultado los 2 nucleótidos correspondientes de la SEC ID NO.5 no apareados) y 19 nucleótidos apareados. La SEC ID NO.14 es complementaria de la SEC ID NO.5 que tiene una deleción de dos nucleótidos, dos apareamientos erróneos y 17 nucleótidos apareados. La complementariedad también se puede ver en la figura 2B, ya que la combinación de SEC ID NO.5 y SEC ID NO.13 está presente en miH12\_155, y la combinación de SEC ID NO.5 y SEC ID NO.14 está presente en miH12\_451a. Por lo tanto, como queda claro a partir de lo anterior, la segunda secuencia de ARN no requiere complementariedad con la primera secuencia de ARN, pero puede comprender deleciones, inserciones y mutaciones que den lugar a apareamientos erróneos, en comparación con la SEC ID NO.1.

35 Como queda claro a partir de lo anterior, la complementariedad sustancial entre la primera secuencia de ARN y la segunda secuencia de ARN puede comprender apareamientos erróneos, deleciones y/o inserciones relativas con una primera y segunda secuencia de ARN que son completamente complementarias (es decir, completamente apareadas). En una realización, la primera y la segunda secuencia de ARN tienen al menos 11 pares de bases consecutivas. Por lo tanto, al menos 11 nucleótidos consecutivos de la primera secuencia de ARN y al menos 11 nucleótidos consecutivos de la segunda secuencia de ARN son completamente complementarios. En otra realización, la primera y la segunda secuencia de ARN tienen al menos 15 nucleótidos que forman un par de bases. Dicho apareamiento de bases entre al menos 15 nucleótidos de la primera secuencia de ARN y al menos 15 nucleótidos de la segunda secuencia de ARN puede consistir en pares de bases G-U, G-C y A-U, o puede consistir en las pares de bases G-C y A-U. En otra realización más, la primera y la segunda secuencia de ARN tienen al menos 15 nucleótidos que forman un par de bases y tienen al menos 11 pares de bases consecutivas. En otra

realización más, la primera secuencia de ARN y la segunda secuencia de ARN son sustancialmente complementarias, en donde dicha complementariedad comprende al menos 17 pares de bases. Dichos 17 pares de bases pueden ser preferiblemente 17 pares de bases consecutivos, consistiendo dicho apareamiento de bases en las pares de bases G-U, G-C y A-U o consistiendo en las pares de bases G-C y A-U.

- 5 En una realización, la primera y la segunda secuencia de nucleótidos se seleccionan del grupo de SEC ID NOs. 3 y 8; 4 y 9; 5 y 10; 5 y 13; 5 y 14; 6 y 11; y 7 y 12. Estas combinaciones de la primera y la segunda secuencia de nucleótidos demostraron ser efectivas cuando estaban comprendidas en estructuras de ARNsi o miARN.

La primera y la segunda secuencia de nucleótidos que son sustancialmente complementarias preferiblemente no forman un ARN bicatenario de 30 pares de bases consecutivos o más, ya que pueden desencadenar una respuesta inmune innata a través de la ruta de la proteína quinasa activada por el ARN bicatenario (ARNbc). Por lo tanto, el ARN bicatenario es preferiblemente menor que 30 pares de bases consecutivos. Preferiblemente, una estructura pre-miARN, una estructura pri-miARN, un ARNhc o un ARNip que comprende el ARN bicatenario según la invención no comprende 30 pares de bases consecutivas.

Preferiblemente, el ARN bicatenario según la invención está comprendido en una estructura de pre-miARN o pri-miARN. Un estructura pri-miARN comprende una estructura pre-miARN. La estructura pre-miARN comprende el ARN bicatenario de la invención, es decir, la primera secuencia de ARN y la segunda secuencia de ARN. Preferiblemente, el ADN bicatenario según la invención está comprendido en una estructura de pri-miARN derivada de miR-451a (también denominada miR-451) o miR-155. En la Figura 2A se muestran ejemplos de ARN bicatenarios de acuerdo con la invención comprendidos en una estructura pre-miARN. La secuencia de estos pre-miARN se enumeran en la tabla 3 a continuación.

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
15	pre-miR451a	5'-CUUGGAAUGGCAAGGAAGGACUUGAGGGACUCG AAGACGAGUCCUCAAGUCCUCUCUUGCUAUACCCAGA-3'
16	pre-miR155	5'-UGCUGAAGGACUUGAGGGACUCGAAGGUUUUGGCCA CUGACUGACCUUCGAGUCUCAAGUCCUUCAGGA-3'

Tabla 3. Estructuras pre-miARN con SEC ID NO. 5

La secuencia de pre-miARN de la SEC ID NO.15 consiste en un extremo 5' correspondiente a los nucleótidos 1-16 de la SEC ID NO.15, una primera secuencia de ARN correspondiente a la SEC ID NO.5 desde los nucleótidos 17-37 de la SEC ID NO.15, una segunda secuencia de ARN correspondiente a la SEC ID NO.14 desde los nucleótidos 38-56 de la SEC ID NO.15, y un extremo 3' correspondiente a los nucleótidos 57-72 de la SEC ID NO.15. La estructura pre-miR451a de acuerdo con la invención comprende el extremo 5' correspondiente a los nucleótidos 1-16 de la SEC ID NO.15, seguido de la primera secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención, la segunda secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención, y el extremo 3' correspondiente a los nucleótidos 57-72 de la SEC ID NO.15. Preferiblemente, la primera y la segunda secuencias de ARN se seleccionan de manera tal que, cuando están comprendidas en la estructura pri-miR451a, se obtiene una estructura predicha altamente similar o como se muestra en la Figura 2B. Preferiblemente, los pares de bases que se forman entre la primera y la segunda secuencia de ARN son los pares de bases G-C, G-U y A-U y, preferiblemente, la longitud de secuencia de la primera secuencia de ARN tiene 21 nucleótidos y la longitud de la segunda secuencia de ARN tiene preferiblemente 19 nucleótidos. Preferiblemente, los pares de bases que se forman entre la primera y la segunda secuencia de ARN son los pares de bases G-C y A-U y, preferiblemente, la longitud de secuencia de la primera secuencia de ARN tiene 21 nucleótidos y la longitud de la segunda secuencia de ARN tiene preferiblemente 19 nucleótidos. Sin pretender imponer ninguna teoría, esta estructura pri-R451a puede preferirse, ya que no permite que ninguna cadena pasajera sea procesada por la maquinaria de ARNi para incorporarse a RISC (Cheloufi et al., 3 de junio de 2010; 465 (7298): 584-9). A partir de un dúplex ARNip o miARN, en principio ambas cadenas pueden incorporarse en RISC. Como la cadena pasajera (correspondiente a la segunda secuencia) puede dar como resultado la selección de transcripciones distintas a una transcripción huntingtina, el uso de la estructura pri-miR451a o pre-miR451a puede permitir que se evite esa orientación no deseada. Cuando se probó la actividad potencial de la "cadena pasajera", no se detectó ninguna actividad con la estructura pri-451a (véanse las figuras 4A y 4B). Se entiende que el procesamiento de la horquilla pre-miARN es independiente de Dicer y que se divide por Ago2 (Yang et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 24 de agosto de 2010; 107 (34): 15163-8).

La secuencia de pre-miARN de la SEC ID NO.16 consiste en un extremo 5' correspondiente a los nucleótidos 1-5 de la SEC ID NO.16, una primera secuencia de ARN correspondiente a la SEC ID NO.5 de los nucleótidos 6-26 de la SEC ID NO.16, una secuencia bucle de los nucleótidos 27-45 de la SEC ID NO.16, una segunda secuencia de ARN correspondiente a la SEC ID NO.13 de los nucleótidos 46-64 de la SEC ID NO.16 y un extremo 3' correspondiente a los nucleótidos 65-69 de la SEC ID NO.16. La estructura pre-155 que comprende la primera y la segunda secuencia de ARN de acuerdo con la invención comprende el extremo 5' correspondiente a los nucleótidos 1-5 de la SEC ID

- NO.16, la primera secuencia de ARN, una secuencia bucle correspondiente a los nucleótidos 27-45 de la SEC ID NO.16, la segunda secuencia de ARN y un extremo 3' correspondiente a los nucleótidos 65-69 de la SEC ID NO.16. Preferiblemente, la primera y la segunda secuencia de ARN se seleccionan de manera tal que cuando están comprendidas en la estructura pre-miR155 (o la estructura de pri-miARN) se obtiene una estructura predicha muy similar a la mostrada en la Figura 2B. Preferiblemente, los pares de bases que se forman entre la primera y la segunda secuencia de ARN son pares de bases G-C o A-U y, preferiblemente, la longitud de la secuencia de la primera secuencia de ARN es de 21 nucleótidos y la longitud de la segunda secuencia de ARN es preferiblemente de 19 nucleótidos. Dichos 19 nucleótidos son preferiblemente completamente complementarios con los nucleótidos 2-18 de una primera secuencia de nucleótidos de 21 nucleótidos de longitud.
- Una secuencia pre-miARN, cuando está comprendida en una secuencia de ARN más grande, requiere secuencias flanqueantes monocatenarias de 5' y 3' que permiten el reconocimiento y la escisión de Drosha. Dichas secuencias, que son adecuadas para permitir el reconocimiento y la escisión de Drosha, son la secuencia 5'-pri-miARN y la secuencia 3'-pri-miARN. Por ejemplo, la secuencia pre-miH12\_155, expresada como se muestra en la figura 5A, está flanqueada por 5'-pri-miARN y las secuencias 3'-pri-miARN de miR155 en el vector de expresión CMV-miH12-155 (Figura 2C). La secuencia pri-miARN que comprende el miR12-155 se muestra en la Figura 2F, el 5'-pri-miARN correspondiente a los nucleótidos 1-87 y el 3'-pri-miARN correspondiente a 147-272. Del mismo modo, las secuencias de pri-miARN CAG-miH12-451 y PGK-miH12-451, que se expresan por sus respectivos vectores en las figuras 2D y 2E, se muestran en las figuras 2G y 2H. El 5'-pri-miARN y el 3'-pri-miARN del ARN de CAG-miH12-451 expresado, correspondientes a los nucleótidos 1-302 y 375-605, y el 5'-pri-miARN y el 3'-pri-miARN de la expresión de ARN de PGK-miH12-451 correspondiente respectivamente a los nucleótidos 1-516 y 589-819. La longitud de los flancos de una sola cadena puede variar, pero suele ser de alrededor de 80 nt (Zeng y Cullen, J Biol Chem. 29 de julio de 2005; 280 (30): 27595-603; Cullen, Mol Cell. 22 de diciembre de 2004; 16 (6): 861-5). La longitud mínima de los flancos monocatenarios se puede determinar fácilmente como cuando se hace demasiado corto, el procesamiento de Drosha puede fallar y la inhibición específica de la secuencia se reducirá o incluso estará ausente. En una realización, la estructura de pri-miARN que lleva la primera y la segunda secuencia de ARN de acuerdo con la invención tiene un flanco de la secuencia 5' y un flanco de la secuencia 3' con respecto a la estructura de re-miARN predicha de al menos 50 nucleótidos. Las secuencias derivadas de pre-miARN y de pri-miARN se derivan todas preferiblemente de la misma secuencia de pri-miARN de origen natural.
- La secuencia de pre-miARN de SEC ID NO.15 y SEC ID NO.16 está codificada por las secuencias de ADN como se muestra en las figuras 2C (SEC ID NO.16), 2D (SEC ID NO.15) y 2E (SEC ID NO.15). Las secuencias de Pri-miARN que comprenden dichas secuencias de pre-miARN se representan en las figuras 2F (SEC ID NO.16), G (SEC ID NO.15) y H (SEC ID NO.15). El pri-miARN codificado por CMV-miH12-155 corresponde a los nucleótidos 1433-1704 de la Figura 2C, de CAG-miH12-451 a los nucleótidos 1716-2320 de la Figura 2D y de PGK-miH12-451 a los nucleótidos 278-1097 de la Figura 2E. Del mismo modo, la primera y la segunda secuencia de ARN deben incorporarse como se describió anteriormente para los pre-ARNm.
- Los ARN bicatenarios de acuerdo con la invención, incorporados en un ARNip, ARNsh, una estructura de pri-ARNm o una estructura de pre-miARN pueden proporcionarse en una célula usando métodos conocidos en la técnica, tales como la lipofección, transfección o utilizando cualquier otro medio adecuado para ello. Los ARN bicatenarios según la invención pueden ser ARN bicatenarios sintéticos o ARN bicatenarios naturales. Los ARN sintéticos bicatenarios pueden comprender ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. Dicho ARN bicatenario tiene propiedades similares en comparación con sus contrapartes naturales y una actividad de interferencia de ARN similar o mejorada respecto a los ARN bicatenarios que consisten completamente en ARN bicatenario no sintético. Por ejemplo, los ARNip sintéticos pueden incluir en su diseño el uso de Ácidos Nucleicos Bloqueados (un anillo de ribosa conectado por un puente de metileno (naranja) entre los átomos de 2'-O y 4'-C), nucleótidos modificados, tales como los nucleótidos que comprenden fosforotioatos, 2'-O-Me, 2'-O-alilo y 2'-desoxi-fluorouridina. Es bien sabido que los ARN bicatenarios, p. ej. los ARNip, pueden acomodar un gran número de modificaciones en las posiciones apareadas y no apareadas sin una pérdida significativa de actividad. Preferiblemente, el ARN bicatenario de la invención es un ARN bicatenario que consiste en nucleótidos naturales, tales como los obtenidos a partir de la expresión de un ARN bicatenario a partir de.
- Por lo tanto, en una realización, dichos ARN bicatenarios de la invención están codificados por una secuencia de ADN. Dicha secuencia de ADN que codifica dicho ARN bicatenario, p. ej. como está comprendido en un ARNip, ARNhc, estructura de pri-ARNm o estructura de pre-miARN, está comprendida en un casete de expresión. Se entiende que cuando el ARN bicatenario debe ser, por ejemplo, un ARNip, que consta de dos cadenas de ARN, entonces se requieren dos casetes de expresión. Uno que codifica una cadena de ARN que comprende la primera secuencia de ARN, el otro casete que codifica una cadena de ARN que comprende la primera cadena de ARN. Cuando el ARN bicatenario está comprendido en una única molécula de ARN, p. ej. codificando un ARNhc, pre-miARN o pri-miARN, un casete de expresión puede ser suficiente. Un casete de expresión pol II puede comprender una secuencia promotora, secuencia que codifica el ARN a expresar seguido de una secuencia de poliadenilación. En el caso de que el ARN bicatenario que se expresa comprenda una estructura de pri-miARN, la secuencia de ARN codificada puede codificar secuencias de intrones y secuencias de exones y 3'-UTR y 3'-UTR. Un casete de expresión de pol III comprende en general una secuencia promotora, seguida por la secuencia de ADN que codifica el ARN (por ejemplo, la secuencia de ARNsh, el pre-miARN o una cadena de los ARN bicatenarios que deben estar comprendidos, por ejemplo, en un ARNsi o ARNsi extendido). Un casete de expresión pol I puede comprender un

promotor pol I, seguido de la secuencia de codificación de ARN y un 3'-Box. Los casetes de expresión para los ARN bicatenarios son bien conocidos en la técnica, y cualquier tipo de casete de expresión puede ser suficiente, por ejemplo, se puede usar un promotor pol III, un promotor pol II o un promotor pol I (es decir, ter Brake et al., Mol Ther. 2008 Mar; 16 (3): 557-64, Maczuga et al., BMC Biotechnol. 24 de julio de 2012; 12:42). Los ejemplos de casetes de expresión que expresan un ARN bicatenario según la invención se representan en las figuras 2C-E.

Preferiblemente, se usa un promotor pol II, tal como el promotor PGK, un promotor CBA o un promotor CMV (véanse las figuras 2C-D). Como la enfermedad de Huntington afecta a las neuronas, en particular, puede ser útil usar un promotor neuroespecífico. Ejemplos de promotores neuroespecíficos adecuados son la enolasa específica de neuronas (NSE), la sinapsina 1 humana, la quinasa caMK y la tubulina. Otros promotores adecuados que pueden contemplarse son promotores inducibles, es decir, un promotor que inicie la transcripción solo cuando la célula huésped esté expuesta a algún estímulo particular.

Dichos casetes de expresión de acuerdo con la invención pueden transferirse a una célula, usando, por ejemplo, métodos de transfección. Cualquier medio adecuado puede ser suficiente para transferir un casete de expresión de acuerdo con la invención. Preferiblemente, se usan vectores de terapia génica que transfieren de manera estable el casete de expresión a las células, de modo que se puede lograr una expresión estable de los ARN bicatenarios que inducen la inhibición específica de la secuencia del gen de la huntingtina como se describe anteriormente. Los vectores adecuados pueden ser vectores lentivirales, sistemas de vectores basados en retrotransposones, o vectores de AAV. Se entiende que cuando, por ej., los vectores lentivirales llevan un genoma de ARN, el genoma de ARN codificará dicho casete de expresión de tal manera que, después de la transducción de una célula, se formará dicha secuencia de ADN y dicho casete de expresión. Preferiblemente, se usa un vector viral tal como el AAV. Preferiblemente, el vector AAV que se usa es un vector AAV del serotipo 5. El AAV del serotipo 5 puede ser particularmente útil para transducir neuronas como se muestra en los ejemplos. La producción de vectores de AAV que comprende cualquier casete de expresión de interés está bien descrita en los documentos WO2007/046703, WO2007/148971, WO2009/014445, WO2009/104964, WO2011/122950, WO2013/036118.

Se pueden derivar las secuencias de AAV que se pueden usar en la presente invención para la producción de vectores de AAV, p. ej., producidas en líneas celulares de insectos o mamíferos, a partir del genoma de cualquier serotipo de AAV. En general, los serotipos de AAV tienen secuencias genómicas de homología significativa en los niveles de aminoácidos y ácidos nucleicos, proporcionan un conjunto idéntico de funciones genéticas, producen viriones que son esencialmente física y funcionalmente equivalentes, y se replican y ensamblan por mecanismos prácticamente idénticos. Para la secuencia genómica de los diversos serotipos de AAV y una descripción general de las similitudes genómicas, consúltense, por ejemplo, número de entrada de GenBank U89790; número de entrada de GenBank J01901; número de entrada de GenBank AF043303; número de entrada de GenBank AF085716; Chlorini et al. (1997, J. Vir. 71: 6823-33); Srivastava et al. (1983, J. Vir. 45:555-64); Chlorini et al. (1999, J. Vir. 73:1309-1319); Rutledge et al. (1998, J. Vir. 72: 309-319); y Wu et al. (2000, J. Vir. 74: 8635-47). Los serotipos 1, 2, 3, 4 y 5 de AAV son una fuente preferida de secuencias de nucleótidos de AAV para usar en el contexto de la presente invención. Preferiblemente, las secuencias ITR de AAV para usar en el contexto de la presente invención se derivan de AAV1, AAV2 y/o AAV5. Del mismo modo, las secuencias de codificación Rep52, Rep40, Rep78 y/o Rep68 se derivan preferiblemente de AAV1, AAV2 y AAV5. Sin embargo, las secuencias que codifican las proteínas de la cápside de VP1, VP2 y VP3 para usar en el contexto de la presente invención pueden tomarse de cualesquiera de los 42 serotipos conocidos, más preferiblemente de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9 o partículas similares a AAV recientemente desarrolladas obtenidas, por ejemplo, por técnicas de barajado de cápside y bibliotecas de cápside AAV.

En otra realización, se proporciona una célula huésped que comprende dicha secuencia de ADN, o dicho casete de expresión de acuerdo con la invención. Por ejemplo, dicho casete de expresión o secuencia de ADN puede estar comprendido en un plásmido contenido en bacterias. Dicho casete de expresión o secuencia de ADN también puede estar comprendido en una célula de producción que produce, p. ej., un vector viral.

Tal como se muestra en la sección de los Ejemplos, y como se explicó anteriormente, el ARN bicatenario según la invención, la secuencia de ADN según la invención, el casete de expresión según la invención y el vector de terapia génica según la invención son para uso en un tratamiento médico, en particular para usar en el tratamiento de la enfermedad de Huntington. Dicho tratamiento médico, cuando se usa un vector de AAV (o también para un vector de terapia génica) comprende una infusión directa del vector de AAV de la invención en el cerebro. Dicha infusión directa en otras realizaciones comprende una infusión intratecal del vector en el líquido cefalorraquídeo. Dicha infusión intratecal representa una forma eficiente de administrar el vector de terapia génica al SNC y de atacar las neuronas. Preferiblemente, las estructuras estriatales y corticales se atacan a través de una difusión por convección intraestriatal (CED) de la administración de vectores de AAV a través de inyecciones en el estriado. Más preferiblemente, para una mayor cobertura del SNC, las inyecciones son en el cuerpo estriado y también en el tálamo. Por lo tanto, los vectores de AAV se administran por vía intraestriatal, o se administran por vía intraestriatal e intratálamicamente a través de inyecciones mejoradas de difusión por convección (CED) en el cuerpo estriado, o el cuerpo estriado y el tálamo. Dichas inyecciones se llevan a cabo preferiblemente a través de inyecciones guiadas por MRI. Dichos métodos de tratamiento son particularmente útiles para sujetos humanos que tienen la enfermedad de Huntington. Se entiende que el tratamiento de la enfermedad de Huntington involucra a sujetos humanos que tienen la enfermedad de Huntington, incluidos los sujetos humanos que tienen una predisposición genética a

desarrollar la enfermedad de Huntington que aún no muestran signos de la enfermedad. Por lo tanto, el tratamiento de sujetos humanos con la enfermedad de Huntington incluye el tratamiento de cualquier sujeto humano que tenga un alelo de huntingtina con más de 35 repeticiones CAG.

### Ejemplos

#### 5 Construcciones de expresión de estructuras de miARN y ARNips

Para crear vectores con estructuras miARN basados en miR155, se incorporaron 21 secuencias de nucleótidos (pb) completamente complementarias con las secuencias diana seleccionadas en HTT como se indica en la Figura 1, en el esqueleto pri-mir-155 de pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR (Invitrogen, Carlsbad, CA) dando como resultado un pVD-CMV-miHTT-155 (en la Figura 2C se representa un ejemplo de una secuencia del casete de expresión, la secuencia de pre-miARN y pri-miARN como se describe en el ARN expresado se muestra en la figura 2B y 2F, respectivamente). Los constructos de pri-mir-155 se diseñaron según las instrucciones proporcionadas por Invitrogen (BLOCK-iT, Kits del Vector de expresión de ARNi de Pol II miR, Versión E, 22 de junio de 2007, 25-0857) por recocido de oligonucleótidos sintéticos bicatenarios en el sitio Bsal de pcDNA6.2-GW/emGFP-mir155. La estructura de todos los pre-miARNs artificiales codificados por las construcciones de miHtt se verificó utilizando el software Mfold (Nucleic Acids Res. 31 (13), 3406-15, (2003), usando mfold versión 3.5, disponible en línea en <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>). La estructura predicha de la estructura pre-miARN-155 que lleva la secuencia correspondiente con la SEC ID NO.5 se muestra en la figura 2B. La secuencia de ADN que codifica el constructo de expresión para la estructura pri-miARN-155 con la SEC ID NO.5 como una primera secuencia seleccionada se muestra en la figura 2C (SEC ID NO. 17); este constructo también se conoce como miH12 y su diana H12. Para las otras 20 secuencias diana seleccionadas, las secuencias se diseñaron para ser completamente complementarias con las secuencias diana como se muestra en la Figura 1, y la estructura de miARN tiene las mismas características estructurales que se muestran en la Figura 2B, es decir, la segunda secuencia de ARN incluida en la estructura corresponde a la secuencia en la que la primera secuencia de ARN seleccionada es completamente complementaria, pero con una delección de 2 nucleótidos en el centro. De manera similar, como control, se usó una secuencia de ARN aleatorizada como primera secuencia de ARN, y al igual que anteriormente, se diseñó una segunda secuencia de ARN para crear un vector pVD-CMV-miScr-155. Las construcciones contenían GFP para permitir la expresión de miARN y la visualización de la transducción in vitro e in vivo.

Se creó un vector de estructura miARN basado en miR451a. La secuencia de ADN que codifica la estructura pri-miR-451 se sintetizó en base a que la secuencia de mir-451 madura predicha se reemplazó por la secuencia diana H12, es decir, SEC ID NO.5 como primera secuencia de ARN. La segunda secuencia de ARN se diseñó para ser completamente complementaria a los nucleótidos 2-18 de la primera secuencia de ARN. La segunda secuencia de ARN se seleccionó de manera que la estructura de ARN predicha de la secuencia de pre-miARN artificial adoptó una estructura similar a la estructura natural original. La estructura del pre-miARN codificada por las construcciones se verificó utilizando el software Mfold (Nucleic Acids Res. 31 (13), 3406-15, (2003), usando mfold versión 3.5, disponible en línea en <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>). La estructura predicha que utiliza la SEC ID NO.5 se muestra en la Figura 2B. Se hicieron dos vectores que expresaban estructuras miR451a diferentes. Las secuencias de ADN de las construcciones de expresión se representan en las figuras 2D y 2E, las correspondientes secuencias de la estructura de pri-miARN respectivas según lo comprendido en el ARN expresado, se muestran en las figuras 2G y 2H. La Figura 2D muestra la secuencia de ADN del casete de expresión de pVD-CAG-miH12-451, que expresa la estructura de miARN con un promotor CAG, y en la figura 2E, la secuencia de ADN del casete de expresión de pVD-PGK-miH12-451 es mostrada, que utiliza un promotor PGK.

Se diseñó un siARN sintético dirigido a HTT en la diana miH12, es decir, SEC ID NO.1 con longitudes de 19-23 pb (Tabla 1). Los ARNip comprendían la primera y la segunda secuencia de nucleótidos correspondientes a las SEC ID NO. 3 y 8; 4 y 9; 5 y 10; 6 y 11; y 7 y 12. Los ARNip fueron diseñados para tener los salientes 3'-UU en ambas cadenas.

#### Construcciones del indicador

Se diseñaron y clonaron construcciones de psiCheck-2 LucHTT que contienen la secuencia completa del exón 1 de HTT siguiendo las instrucciones proporcionadas por Promega (siCHECK™ Vectors, C8011, Promega Benelux b.v., Leiden, Países Bajos). LucHTT comprende la SEC ID NO.1 y las secuencias de flaqueo de la misma como están presentes en la SEC ID NO.2 (véase Fig. 1B). El indicador LucH12\_451a comprende la secuencia complementaria con la segunda secuencia de ARN diseñada para ser expresada por pVD-CAG-miH12-451 y pVD-PGK-miH12-451. Todas las construcciones han sido secuenciadas y la secuencia correcta ha sido verificada. La eficacia del bloqueo de todas las estructuras de miARN y ARNip se determinó en indicadores específicos de luciferasa in vitro. Las células Hek293T se cotransfectaron con el miHtt y el indicador de luciferasa en una relación 1:1 (miR-155, PGK-miH12-451), o una relación 1:10 (CAG-miH12-451, es decir, el promotor CAG es muy fuerte). El bloqueo de la luciferasa de Renilla se midió 48 h después de la transfección (p.t), y el de luciérnaga se midió como control interno. Se utilizó miScr como control negativo y se estableció en 100%.

## Resultados in vitro

Entre las construcciones de miH1-miH21 que reconocen al exón 1, miH12 indujo el bloqueo del indicador de luciferasa más fuerte con una reducción del 75-80% (Figura 3A). Los ARNip que reconocen a H12, es decir, SEC ID NO.1, se demostró que todos tenían una eficiencia de bloqueo similar, mostrando que, con un aumento en la dosis, había un bloqueo más fuerte. Los siARN de 19 y 21 pares de bases mostraron un poco más de inhibición en comparación con los otros ARNip probados. Se realizó un análisis de secuenciación de la siguiente generación (NGS) del ARN expresado a partir de pVD-CMV-miHTT-155 y se mostró una preferencia en las cadenas guía y pasajera (véase, por ejemplo, la fig. 2B (7)) correspondiente a la primera secuencia de ARN y la segunda secuencia de ARN tal como se diseñó para formar parte de la estructura de miARN. Se probaron pVD-CAG-miH12-451 y pVD-PGK-miH12-451 para determinar tanto la diana de LucHTT como de LucH12\_451a. Tanto la construcción CAG como la PGK mostraron una inhibición específica de la secuencia (Figura 4A), mientras que no se redujo el indicador de Luc que comprendía una secuencia totalmente complementaria con la segunda secuencia de ARN de las construcciones.

## Bloqueo in vivo utilizando vectores AAV en ratones

El constructo de expresión CMV-miH12-155 de pVD-CMV-miHTT-155 se clonó en un esqueleto de vector AAV5 y AAV5 producido usando el sistema de producción de baculovirus. Como control, CMV-miScr-155 también se incorporó en una estructura AAV5 para servir como control negativo. Para controlar la eficiencia de la transducción cerebral, los casetes de expresión contenían GFP (Figura 5A). Un vector AAV-5 que transporta un constructo indicador de luciferasa, Luc73QHtt, que comprende la secuencia diana SEC ID NO.1 (es decir, la secuencia completa del exón 1 de HTT con 73 repeticiones CAG) y las secuencias flanqueantes de la misma como están presentes en la SEC ID NO.2 (véase Fig.1 B). A ratones Balb/6 (N5) se les inyectó de forma intraestriaral 2 µl de AAV5-Luc73QHtt/SNP (3,6 x 10<sup>12</sup> gc/ml) y AAV5-miScr (1,8x10<sup>13</sup> gc/ml) o AAV5-miH12 (1,8x10<sup>13</sup> gc/ml) en una proporción de 1:5. Un grupo separado se inyectó con AAV5-Luc73QHtt/SNP y PBS. La expresión de luciferasa se controló a las 2, 4 y 6 p.i. por MS.). Ya a la semana p.i., hubo un claro bloqueo de Luc19QHtt/wt por miH12 en comparación con los animales miScr y solo Luc19QHtt/wt (Figura 7b y c). Se mostró una tendencia que indicaba una disminución significativa en la expresión del indicador de luciferasa con el tiempo, siendo casi indetectable (miH12 N°. 1 y N°. 2) en el cerebro en comparación con los grupos de control que indicaban un fuerte bloqueo de la diana HTT por CMV-miH12-155. Al final del experimento, la fluorescencia de Luc73QHtt/SNP en el grupo CMV-miH12-155 fue aproximadamente 1 log más bajo en comparación con miScr.

## Bloqueo in vivo utilizando vectores AAV en modelos de animales HD

AAV5-CMV-miH12-155 se probó en un modelo de rata HD LV-171-82Q (Drouet et al. 2009, Ann Neurol. 2009 Mar; 65 (3): 276-85). El modelo se basa en la sobreexpresión estriaral de los primeros 171 aminoácidos del fragmento mutante de HTT con 82 repeticiones CAG vinculadas a un fragmento del exón 67 que contiene el SNP C/T. A las ratas HD se les inyectó AAV5-CMV-miH12-155 o un control AAV5-CMV-miScr-155 (Figura 6A). A las ratas se les inyectó intraestriaralmente LV-171 -82Q y, una semana después, AAV5-CMV-miH12-155 o AAV5-CMV-miScr-155. El efecto neuroprotector de AAV5-CMV-miH12-155 se determinó en función de la tinción histológica (DARP32, EM48, GFP e Iba1) de las secciones de cerebro de rata HD en los puntos de tiempo iniciales y finales (Figuras 6B, 6C y 6D, 2 semanas p.i.). Las lesiones DARP32 (fig. 6B, panel superior) indican cierta neurodegeneración y se pueden observar como manchas blancas en las secciones del cerebro. El panel muestra claramente menos muerte neuronal y, por lo tanto, no hay manchas blancas en las secciones cerebrales de ratas AAV5-CMV-miH12-155. Las secciones del cerebro se tiñeron para los agregados de HTT mutantes (EM48, Figura 6B) vistos como pequeños puntos marrones en los portaobjetos. Claramente, hubo menos neurodegeneración y menos agregados de HTT mutantes en ratas HD inyectadas con AAV5-CMV-miH12-155 en comparación con el grupo de control (Figura 6B, paneles medio y más bajo). Se obtuvieron resultados similares en el punto de tiempo final de 8 semanas después de la inyección (datos no mostrados). Los resultados histológicos de GFP (tinción marrón) indicaron una transducción estriaral eficiente con todos los vectores utilizados en el presente estudio (Figura 6C). Además, casi no se detectó respuesta inmune a las 8 semanas p.i. según la tinción de Iba1 (Figura 6D).

AAV5-CMV-miH12-155 se probó posteriormente en el modelo de ratón Hu97/18 HD humanizado (Southwell et al. 2013, Hum Mol Genet. 1 de enero de 2013; 22(1): 18-34). Este modelo tiene el gen Hdh murino reemplazado por dos copias del HTT humano, uno con 97 repeticiones CAG y el otro con 18. Se ha realizado una caracterización detallada de los cambios motores, psiquiátricos, cognitivos, electrofisiológicos, neuropatológicos y bioquímicos en el modelo de ratón Hu97/18 como resultado de la progresión de la enfermedad. AAV5-CMV-miH12-155 se inyectó en un modelo de ratón Hu97/18 HD humanizado de 2 meses de edad mediante la administración por vía intracerebral mediante difusión por convección mejorada (IC-CED) en el estriado o lento (suministro lento de IC) en el estriado o administración intracerebroventricular (ICV) en los ventrículos del cerebro. La fluorescencia de GFP indicó la transducción completa del cuerpo estriado de ratón en la administración lenta y CED (Figura 7A). El análisis de transferencia Western del HTT humano mostró un bloqueo por AAV5-CMV-miH12-155 en el cuerpo estriado cuando se aplicó la administración de CED (Figura 7B).

## Comparación H12 con secuencias diana de la técnica anterior

Las secuencias diana de la técnica anterior en la proximidad de la secuencia H12 se compararon con las secuencias H12. Se construyeron estructuras de ARNsi y miARN y se llevó a cabo una comparación directa utilizando el sistema

5 indicador de luciferasa como se describió anteriormente. Se transfectaron bajas concentraciones de ARNsi (0,25 nM) por triplicado para evitar efectos fuera del diana que sesgaban los resultados. Se fabricaron ARNip con cadenas guía y pasajero completamente complementarias (pares de bases G-C y A-U) y con un saliente UU-3' en ambas cadenas. Se utilizó un ARNip barajado como control y los valores se midieron en relación con el control. El ARNip de H12 mostró la inhibición más fuerte (véase la figura 8A). Del mismo modo, los estructuras de miARN se hicieron en base a miR-155 como se describe anteriormente de acuerdo con las instrucciones de Invitrogen y también se hizo una comparación directa. Las estructuras R6.1 y R6.2 se hicieron reemplazando 19 y 18 nucleótidos que eran perfectamente complementarios con las secuencias diana R6.1 y R6.2 en la secuencia guía de la estructura miR-155 diseñada a partir de Invitrogen. Por lo tanto, dependiendo del procesamiento de pre-miARN por parte de Dicer, la cadena guía R6 procesada puede contener nucleótidos de la estructura de miR-155 al final de la secuencia. Las estructuras de miARN se transfectaron como se describe anteriormente utilizando diferentes relaciones entre la construcción de miARN y el indicador (constructo de estructuras de miARN: indicador de luciferasa). Se usó una construcción de miARN mezclada como control y los valores se midieron en relación con el control. La Figura 8B muestra una relación de 1:1, mientras que la figura 8C muestra una relación de 1:10. La estructura miARN H12 mostró la inhibición más fuerte. H12 mostró una fuerte inhibición pronunciada tanto para los ARNip como los miARN, en particular a bajas concentraciones, que pueden considerarse más relevantes para la aplicación in vivo.

Diana	Secuencia diana	Sl.	L.	Id.
H12	5'- <u>CUUCGAGUCCCUCAAGUCCUU</u> -3'	34	21	21
H11	5'-GAAGGCC <u>UUCGAGUCCCUCAA</u> -3'	33	21	15
R1 (siHUNT-2)	5'-GG <u>CCUUCGAGUCCCUCAAGUCC</u> -3'	46	21	18
R2 (shD2)	5'-GG <u>CCUUCGAGUCCCUCAAGUC</u> -3'	47	21	18
R3 (ARNip-DExon1)	5'-AGG <u>CCUUCGAGUCCCUCAAGU</u> -3'	48	21	17
R4 (HDAS 07)	5'-AUGAAGGCC <u>UUCGAGUCUCUCUC</u> -3'	49	21	13
R6.1 (54)	5'-G <u>CCUUCGAGUCCCUCAAGU</u> -3'	50	19	17
R6.2 (55)	5'- <u>CCUUCGAGUCCCUCAAGU</u> -3'	51	18	17

20 Tabla 4. Dianas de la técnica anterior en comparación con H12. Se muestran las secuencias diana. Los nucleótidos diana que tienen identidad con la secuencia diana H12 están subrayados. (Sl. indica SEC ID NO.; L. indica la longitud del nucleótido, Id. Indica el número de nucleótidos que tienen identidad con H12). (R1 se deriva del ARNip siHUNT-2 de Rodríguez-Lebron et al., 2005, Mol Ther. Vol 12 No.4: 618-633, R2 se deriva de un ARNhc shD2 expresado de Franich et al., 2008, Mol Ther, vol. 16 Numero 5; 947-956), R3 se deriva de ARNip-DExon1 del documento US20080015158, R4 se deriva de HDAS 07 del documento WO2008134646, R6.1 y R6.2 se derivan de una lista de aproximadamente 1750 ARNips hipotéticos diseñados para reconocer al gen de la huntingtina (documento WO2005105995).

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> uniQure IP B.V.

5 <120> Supresión del gen de la huntingtina  
 <130> P32194PC00  
 <160> 51

10 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1

15 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> homo sapiens

20 <400> 1  
 cuucgagucc cucaaguccu u 21  
 <210> 2

25 <211> 614  
 <212> ARN  
 <213> Homo Sapiens

<400> 2  
 uugcugugug aggcagaacc ugcgggggca ggggcgggcu gguucccugg ccagccauug 60  
 gcagaguccg caggcuaggg cugucaauca ugcuggccgg cguggccccg ccuccgccgg 120  
 cgcgccccg ccuccgccgg cgcacgucug ggacgcaagg cgccgugggg gcugccggga 180  
 cggguccaag auggacggcc gcucagguuc ugcuuuuacc ugcggcccag agccccauuc 240  
 auugccccgg ugcugagcgg cgccgcgagu cggccccgagg ccuccgggga cugccgugcc 300  
 gggcgggaga ccgccauggc gaccucggaa aagcugauga aggccuucga gucccucaag 360  
 uccuuccagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 420  
 cagcagcagc aacagccgcc accgccgccg ccgccgccgc cgccuccuca gcuuccucag 480  
 ccgccgccgc aggcacagcc gcugcugccu cagccgcagc cgccccgcc gccgccccg 540  
 ccgccacccg gcccggcugu ggcugaggag ccgcugcacc gaccgugagu uggggccccg 600  
 ugcagcuccc uguc 614

40 <210> 3

<211> 19  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial

45 <220>  
 <223> primera secuencia que se dirige a huntingtina (guía)

<400> 3

50 aaggacuuga gggacucga 19  
 <210> 4

<211> 20  
 <212> ARN

55

<213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> primera secuencia que se dirige a huntingtina (guía)  
 5  
 <400> 4  
 aaggacuuga gggacucgaa 20  
 <210> 5  
 10  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> primera secuencia que se dirige a huntingtina (guía)  
 <400> 5  
 aaggacuuga gggacucgaa g 21  
 20  
 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 25  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> primera secuencia que se dirige a huntingtina (guía)  
 30  
 <400> 6  
 aaggacuuga gggacucgaa gg 22  
 <210> 7  
 35  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 40  
 <223> primera secuencia que se dirige a huntingtina (guía)  
 <400> 7  
 aaggacuuga gggacucgaa ggc 23  
 45  
 <210> 8  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> segunda secuencia (pasajera)  
 <400> 8  
 55  
 ucgagucccu caaguccuu 19  
 <210> 9  
 <211> 20  
 60  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> segunda secuencia (pasajera)  
 65  
 <400> 9

uucgagucc ucaaguccuu 20  
 <210> 10  
 5 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> segunda secuencia (pasajera)  
 <400> 10  
 cuucgagucc cucaaguccu u 21  
 15 <210> 11  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> segunda secuencia (pasajera)  
 <400> 11  
 25 ccuucgaguc ccucaagucc uu 22  
 <210> 12  
 <211> 23  
 30 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> segunda secuencia (pasajera)  
 35 <400> 12  
 gccuucgagu ccucaaguc cuu 23  
 <210> 13  
 40 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> segunda secuencia (pasajera)  
 <400> 13  
 50 cuucgagucu caaguccuu 19  
 <210> 14  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 55 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> segunda secuencia (pasajera)  
 60 <400> 14  
 acgagucccu caaguccuc 19  
 <210> 15  
 65 <211> 72  
 <212> ARN

ES 2 732 023 T3

	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> estructura pre-miR451a	
5	<400> 15	
	cuugggaaug gcaaggaagg acuugaggga cucgaagacg agucccucaa guccucucuu	60
	gcuauaccca ga	72
10	<210> 16	
	<211> 69	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> estructura pre-miR155	
	<400> 16	
	ugcugaagga cuugagggac ucgaagguuu uggccacuga cugaccuucg agucucaagu	60
	ccuucagga	69
20	<210> 17	
	<211> 1989	
	<212> ADN	
25	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> pVD-CMV-miH12-155	
30	<400> 17	
	gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata	60
	gccccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggccccgct ggctgaccgc	120
	ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag	180
	ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac	240
	atcaagtgta tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aatggcccg	300
	cctggcatta tgcccagtac atgacctat gggactttcc tacttggcag tacatctacg	360
	tattagtcat cgtattacc atgggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat	420
	agcggtttga ctacagggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt	480
	tttgaccaca aatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc	540
	aatggggcgg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctctc tggctaacta	600
	gagaacccac tgcttactgg cttatcgaaa ttaatacgac tcaactatagg gagtcccaag	660

ES 2 732 023 T3

ctggctagtt aagctatcaa caagtttgta caaaaaagca ggctttaaaa ccatggtgag 720  
 caagggcgag gagctgttca ccgggggtggt gcccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt 780  
 aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct acggcaagct 840  
 gacctgaag ttcattctgca ccaccgcaa gctgcccgtg ccctggcca ccctcgtgac 900  
 caccttacc tacggcgtgc agtgcttcgc ccgctacccc gaccacatga agcagcacga 960  
 cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga 1020  
 cgacggcaac tacaagacct gcgcccaggt gaagtctgag ggcgacacct tgggtaaccg 1080  
 catcgagctg aagggcatcg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga 1140  
 gtacaactac aacagccaca aggtctatat caccgccgac aagcagaaga acggcatcaa 1200  
 ggtgaacttc aagaccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta 1260  
 ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg ccgacaacc actacctgag 1320  
 caccagtc ccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tcctgctgga 1380  
 gttcgtgacc gccgccgga tcaactctcg catggacgag ctgtacaagt aagctaagca 1440  
 cttcgtggcc gtcgatcgtt taaagggagg tagtgagctg accagtgat cctggaggct 1500  
 tgctgaaggc tgtatgctga aggacttgag ggactogaag gttttggcca ctgactgacc 1560  
 ttcgagtctc aagtccttca ggacacaagg cctgttacta gcactcacat ggaacaaatg 1620  
 gccagatct gccgcactc gagatatcta gaccagctt tcttgtaca agtggtgat 1680  
 ctagagggcc cgcggttcgc tgatggggga ggtaactga aacacggaag gagacaatac 1740  
 cggaaggaac ccgcgctatg acggcaataa aaagacagaa taaaacgcac ggggtgtggg 1800  
 tcgtttgttc ataaacgcgg ggttcggtcc cagggtggc actctgtcga taccaccg 1860  
 tgaccatt ggggccaata cgcgcggtt tcttcctttt cccacccca cccccaagt 1920  
 tcgggtgaag gccagggct cgcagccaac gtcggggcgg caggccctgc catagcatcc 1980  
 cctatagtg 1989

<210> 18

- 5 <211> 2444
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

<220>

- 10 <223> pVD-CAG-miH12-451

<400> 18

cagtcacgac gttgtaaac gacggccagt gaattcgccc ttaattcgtt accctagtta 60  
 ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac 120  
 ataacttac gtaaatggcc cgcctggctg accgccaac gacccccgcc cattgacgtc 180

ES 2 732 023 T3

aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt	240
ggactattta cggtaaacctg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac	300
gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg gcccgctgg cattatgccc agtacatgac	360
cttatgggac tttcctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt	420
cgaggtgagc cccacgttct gcttcactct ccccatctcc cccccctccc caccccaat	480
tttgtattta tttatTTTTT aattatTTTg tgcagcgatg ggggcggggg gggggggggg	540
gcgcgcgcca gggcgggcg ggcggggcga ggggcggggc ggggcgaggc ggagaggtgc	600
ggcgcgagcc aatcagagcg gcgcgctccg aaagtTtct tttatggcga ggcggcgcg	660
gcgcgggccc tataaaaagc gaagcgcgcg gcggcgggga gtcgctgcga cgtgccttc	720
gccccgtgcc ccgctccgcc gccgcctcgc gccgccgcc ccggctctga ctgaccgct	780
tactcccaca agtgagcggg cgggacggcc cttctcctcc gggtgtaat tagcgttgg	840
tttaatgacg gcttgttct tttctgtggc tgcgtgaaag ccttgagggg ctccgggagg	900
gccctttgtg cgggggggag cggctcgggg ggtgcgtgcg tgtgtgtgtg cgtggggagc	960
gcccgctgcg gcccgcgctg cccggcggt gtgagcgtg cggcgcggc gcggggcttt	1020
gtgcgctccg cagtgtgcgc gaggggagcg cggccgggg cggtgccccg cggtgcgggg	1080
ggggctgcga ggggaacaaa ggctgcgtgc ggggtgtgtg cgtggggggg tgagcagggg	1140
gtgtgggcbc ggcggtcggg ctgtaacccc ccctgcacc cccctccccg agttgctgag	1200
cacggccccg cttcgggtgc ggggctccgt acggggcgtg gcgcgggct cgcctgccg	1260
ggcggggggt ggcgagcggg ggggggtgcc ggcggggcgg gccgcctcg gccgggggag	1320
ggctcggggg aggggcgcg cggcccccg agcgccggcg gctgtcgagg cgcggcgcg	1380
cgcagccatt gccttttatg gtaatcgtgc gagagggcgc agggacttcc tttgtccaa	1440
atctgtcgg agccgaaatc tgggagggc cgccgcaacc cctctagcgg gcgcgggcg	1500
aagcgggtgc gcgccggcag gaaggaatg ggcggggagg gccttcgtgc gtcgccgcgc	1560
cgccgtcccc ttctccctct ccagcctcgg ggctgtccgc ggggggacgg ctgcctcgg	1620
gggggacggg gcagggcggg gttcggcttc tggcgtgtga ccggcgctc tagagcctct	1680
gctaaccatg ttcatgcctt cttctttttc ctacagctcc tgggcaactg gctggttatt	1740
gtgctgtctc atcatTTTtg caaagaatta agggcgaatt cgagctcggg acctcgcgaa	1800
tgcactataga tatcggcgct atgcttctg tccccagc ggggccctgg ctgggatttc	1860
atcatatact gtaagtttgc gatgagacac tacagtatag atgatgtact agtcgggca	1920
ccccagctc tggagcctga caaggaggac aggagatg ctgcaagccc aagaagctct	1980
ctgctcagcc tgtcacaacc tactgactgc cagggcactt gggaatggca aggaaggact	2040
tgagggactc gaagacgagt ccctcaagtc ctctcttct ataccagaa aacgtgccag	2100
gaagagaact caggacctg aagcagacta ctggaaggga gactccagct caaacaaggc	2160
aggggtgggg gcgtgggatt gggggtaggg gagggaatag atacattttc tctttcctgt	2220
tgtaaagaaa taaagataag ccaggcacag tggctcacgc ctgtaatccc accactttca	2280
gaggccaag cgctggatcc agatctcgag cggccgccg tggcatccct gtgaccctc	2340
cccagtcct ctctggccc tggaaagtgc cactccagtg cccaccagcc ttgtcctaat	2400
aaaattaagt tgcatacaga tcgacgggcc cgctcgactgc agag	2444

ES 2 732 023 T3

<210> 19

5 <211> 1224  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial

10 <220>  
<223> pVD-PGK-miH12-451

<400> 19

gttgtaaaac gacggccagt gaattctacc gggtagggga ggcgcttttc ccaaggcagt	60
ctggagcatg cgcttttagca gccccgctgg gcacttggcg ctacacaagt ggcctctggc	120
ctcgcacaca ttccacatcc accggtaggc gccaacccggc tccgttcttt ggtggcccct	180
tcgcgccacc ttctactcct cccctagtca ggaagtcccc ccccgccccg cagctcgcgt	240
cgtgcaggac gtgacaaatg gaagtagcac gtctcactag tctcgtgcag atggacagca	300
ccgctgagca atggaagcgg gtaggccttt ggggcagcgg ccaatagcag ctttgctcct	360
tcgctttctg ggtcagagg ctgggaaggg gtgggtccgg gggcgggctc aggggcgggc	420
tcagggcggg ggcgggcgcc cgaaggtcct ccggaggccc ggcattctgc acgcttcaaa	480
agcgcacgctc tgccgcgctg ttctcctctt cctcatctcc gggcctttcg acccggatcc	540
cccgggtgc aggaattcga gctcgtacc tcgcgaatgc atctagatat cggcgctatg	600
cttcctgtgc ccccagtggg gccctggctg ggatttcatc atatactgta agtttgcat	660
gagacactac agtatagatg atgtactagt ccgggcaccc ccagctctgg agcctgacaa	720
ggaggacagg agagatgctg caagcccaag aagctctctg ctcagcctgt cacaacctac	780
tgactgccag ggcacttggg aatggcaagg aaggacttga gggactcgaa gacgagtccc	840
tcaagtccctc tcttgctata cccagaaaac gtgccaggaa gagaactcag gaccctgaag	900
cagactactg gaaggagac tccagctcaa acaaggcagg ggtgggggcg tgggattggg	960
ggtaggggag ggaatagata cattttctct ttctgttgt aaagaaataa agataagcca	1020
ggcacagtgg ctcaagcctg taatcccacc actttcagag gccaaaggcg tggatccaga	1080
tctcgagcgg ccgcccgtgg catccctgtg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg	1140
aagttgccac tccagtgcc accagccttg tcctaataaa attaagttgc atcaagatcg	1200
acgggcccgt cgactgcaga ggcc	1224

15 <210> 20

20 <211> 272  
<212> ARN  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> estructura pri-miH12-155

25 <400> 20

ES 2 732 023 T3

	gcuaagcacu ucguggccgu cgauCGuuua aaggaggua gugagucgac caguggaucc	60
	uggaggcuug cugaaggcug uaugcugaag gacuugaggg acucgaaggu uuuggccacu	120
	gacugaccuu cgagucucuaa guccuucagg acacaaggcc uguuacuagc acucacaugg	180
	aacaaauggc ccagaucugg cgcacucga gauaucuaga cccagcuuuc uuguacaaag	240
	ugguugaucu agagggcccg cgguucgcug au	272
	<210> 21	
5	<211> 605	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> estructura pri-miH12-451	
	<400> 21	
	gcuccugggc aacgugcugg uuauugugcu gucucaucau uuuggcaaag aaauaagggc	60
	gaauucgagc ucgguaccuc gcgaaugcau cuagauaucg gcgcuaugcu uccugugccc	120
	ccaguggggc ccuggcuggg auuucucau auacuguaag uuugcgauga gacacuacag	180
	uauagaugau guacuagucc gggcaccccc agcucuggag ccugacaagg aggacaggag	240
	agaugcugca agcccaagaa gcucucugcu cagccuguca caaccuacug acugccaggg	300
	cacuugggaa uggcaaggaa ggacuugagg gacucgaaga cgagucccuc aagucccuc	360
	uugcuauacc cagaaaacgu gccaggaaaga gaacucagga cccugaagca gacuacugga	420
	agggagacuc cagcucuaac aaggcagggg uggggcgug ggauuggggg uaggggaggg	480
	aaugauaca uuucucuuu ccuguuguaa agaaaauaag auaagccagg cacaguggcu	540
	cacgccugua aucccaccac uuucagaggg caaggcgug gauccagauc ucgagcggcc	600
	gcccg	605
15	<210> 22	
	<211> 819	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> estructura pri-miH12-451	
	<400> 22	

ES 2 732 023 T3

agucucgugc agauggacag caccgcugag caauggaagc gguaggccu uuggggcagc 60  
 ggccaauagc agcuuugcuc cuucgcuuuc uggrcucaga ggcugggaag gggugggucc 120  
 gggggcgggc ucagggcgcg gcucaggggc gggcgggcg cccgaagguc cuccggaggc 180  
 ccggcauucu gcacgcuca aaagcgcagc ucugccgcgc uguucuccuc uuccucauc 240  
 ccgggccuuu cgacccggau cccccggcu gcaggaauc gagcucgua ccucgcgau 300  
 gcaucuagau aucggcgua ugcuuccugu gccccagug gggccuggc ugggauuua 360  
 ucauauacug uaaguuugcg augagacacu acaguauaga ugauguacua guccgggac 420  
 cccagcucu ggagccgac aaggaggaca ggagagaugc ugcaagcca agaagcuc 480  
 ugcucagccu gucacaaccu acugacugcc agggcacuug ggaaugcaa ggaagcucu 540  
 gagggacucg aagacgaguc ccucaagucc ucucuugcua uaccagaaa acgugccag 600  
 aagagaacuc aggaccuga agcagacuac uggaaggag acuccagcuc aaacaaggca 660  
 gggguggggg cgugggauug gggguagggg aggaauga uacauuuucu cuuuccugu 720  
 guaaagaaau aaagauaagc caggcacagu ggcucagcc uguaauccca ccacuuucag 780  
 agccaaggc gcuggauca gaucucgagc ggccgccg 819

<210> 23

5 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

10 <400> 23  
 tccaagatgg acggccgctc a 21

<210> 24

15 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

20 <400> 24  
 ccaagatgga cggccgctca g 21

<210> 25

25 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

30 <400> 25  
 agatggacgg ccgctcaggt t 21

<210> 26

35 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

40 <400> 26  
 atggacggcc gctcaggtt t 21

<210> 27

40 <211> 21  
 <212> ADN

ES 2 732 023 T3

<213> homo sapiens  
 <400> 27  
 5 gacggccgct caggttctgc t 21  
 <210> 28  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 10 <213> homo sapiens  
 <400> 28  
 15 cggccgctca ggttctgctt t 21  
 <210> 29  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> homo sapiens  
 <400> 29  
 gtgctgagcg gcgcccgcgag t 21  
 <210> 30  
 25 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 30 <400> 30  
 cgccgcgagt cggcccgcagg c 21  
 <210> 31  
 35 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 <400> 31  
 40 accgcatgg cgaccctgga a 21  
 <210> 32  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 45 <213> homo sapiens  
 <400> 32  
 50 ccgcatggc gaccctgga a 21  
 <210> 33  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 55 <213> homo sapiens  
 <400> 33  
 gaaggccttc gaggccctca a 21  
 60 <210> 34  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 65 <400> 34

ES 2 732 023 T3

cttcgagtcct ccaagtcct t 21  
 <210> 35  
 5 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 <400> 35  
 10 ccgccgccgc ctctcagct t 21  
 <210> 36  
 <211> 21  
 15 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 <400> 36  
 20 gccgcctcct cagcttctc a 21  
 <210> 37  
 <211> 21  
 25 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 <400> 37  
 tcagccgccg ccgcaggcac a 21  
 30 <210> 38  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 35 <400> 38  
 gccgcaggca cagccgctgc t 21  
 <210> 39  
 40 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 45 <400> 39  
 ggcacagccg ctgctgctc a 21  
 <210> 40  
 50 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 <400> 40  
 55 gccgctgctg cctcagccgc a 21  
 <210> 41  
 <211> 21  
 60 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 <400> 41  
 65 cggcccggct gtggctgagg a 21  
 <210> 42

ES 2 732 023 T3

<211> 21  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 5  
 <400> 42  
 ctgtggctga ggagccgctg c 21  
 <210> 43  
 10  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens  
 15  
 <400> 43  
 tgtggctgag gagccgctgc a 21  
 <210> 44  
 20  
 <211> 69  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 25  
 <223> secuencia de estructura miH12\_155 de la figura 2A  
 <400> 44  
 ugcugaagga cuugagggac ucgaagguuu uggccacuga cugaccuucg agucucaagu 60  
 ccuucagga 69  
 30  
 <210> 45  
 <211> 72  
 <212> ARN  
 <213> secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> secuencia de estructura miH12\_451a de la figura 2A  
 <400> 45  
 cuugggaaug gcaaggaagg acuugagggga cucgaagacg agucccucaa guccucucuu 60  
 40  
 gcuaauaccca ga 72  
 <210> 46  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 46  
 50  
 ggccucgagu cccucaaguc c 21  
 <210> 47  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 55  
 <213> homo sapiens  
 <400> 47  
 ggccuucgag ucccucaagu c 21  
 60  
 <210> 48  
 <211> 21

# ES 2 732 023 T3

<212> ARN  
<213> homo sapiens

5 <400> 48  
aggccuucga guccucaag u 21

<210> 49

10 <211> 21  
<212> ARN  
<213> homo sapiens

15 <400> 49  
augaaggccu ucgaguccu c 21

<210> 50

20 <211> 19  
<212> ARN  
<213> homo sapiens

25 <400> 50  
gccuucgagu ccucaagu 19

<210> 51

30 <211> 18  
<212> ARN  
<213> homo sapiens

35 <400> 51  
ccuucgaguc ccucaagu 18

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un ARN bicatenario que comprende una primera secuencia de ARN y una segunda secuencia de ARN, en donde la primera y la segunda secuencia de ARN son sustancialmente complementarias, en donde la primera secuencia de ARN tiene una longitud de secuencia de al menos 19 nucleótidos y es complementaria a la SEC ID NO. 1, en donde la primera secuencia de ARN se selecciona del grupo que consiste en la SEC ID NO.3, la SEC ID NO.4, la SEC ID NO.5, la SEC ID NO.6 y la SEC ID NO.7, y en la que dicho ARN bicatenario es capaz de reducir la expresión del gen de la huntingtina.
2. Un ARN bicatenario según la reivindicación 1, en el que el ARN bicatenario está comprendido en una estructura pre-miARN, una estructura pri-miARN, un ARNhc o un ARNip, preferiblemente una estructura pre-miARN.
- 10 3. Un ARN bicatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la primera secuencia de ARN y la segunda secuencia de ARN se seleccionan del grupo que consiste en las combinaciones de SEC ID NO. 3 y 8; SEC ID NO. 4 y 9; SEC ID NO. 5 y 10; SEC ID NO. 5 y 13; SEC ID NO. 5 y 14; SEC ID NO. 6 y 11; y SEC ID NO. 7 y 12.
- 15 4. Un ARN bicatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el ARN bicatenario está comprendido en una estructura pre-miARN de miR-451a o miR-155.
5. Un ARN bicatenario según la reivindicación 4, en el que el ARN bicatenario está comprendido en un ARN que comprende la SEC ID NO. 15, SEC ID NO. 16, SEC ID NO. 20, SEC ID NO. 21 o SEC ID NO. 22.
6. Un ADN que codifica el ARN bicatenario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Un casete de expresión que codifica un ARN bicatenario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 20 8. Un casete de expresión según la reivindicación 7, en el que el casete de expresión comprende el promotor PGK, un promotor de CMV, un promotor neuroespecífico o un promotor de CBA.
9. Un casete de expresión según la reivindicación 8, en el que el casete de expresión comprende las SEC ID NO.17, 18 ó 19.
- 25 10. Un vector de terapia génica que comprende el casete de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
11. Un vector de terapia génica según la reivindicación 10, en el que el vector de terapia génica es un vector AAV, preferiblemente un vector AAV del serotipo 5.
12. Una célula huésped que comprende el ADN de acuerdo con la reivindicación 6 o el casete de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
- 30 13. Un ARN bicatenario según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un ADN según la reivindicación 6, un casete de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, un vector de terapia génica según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, para usar en un tratamiento médico.
- 35 14. Un ARN bicatenario según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un ADN según la reivindicación 6, un casete de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, un vector de terapia génica según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, para usar en el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

Fig. 1

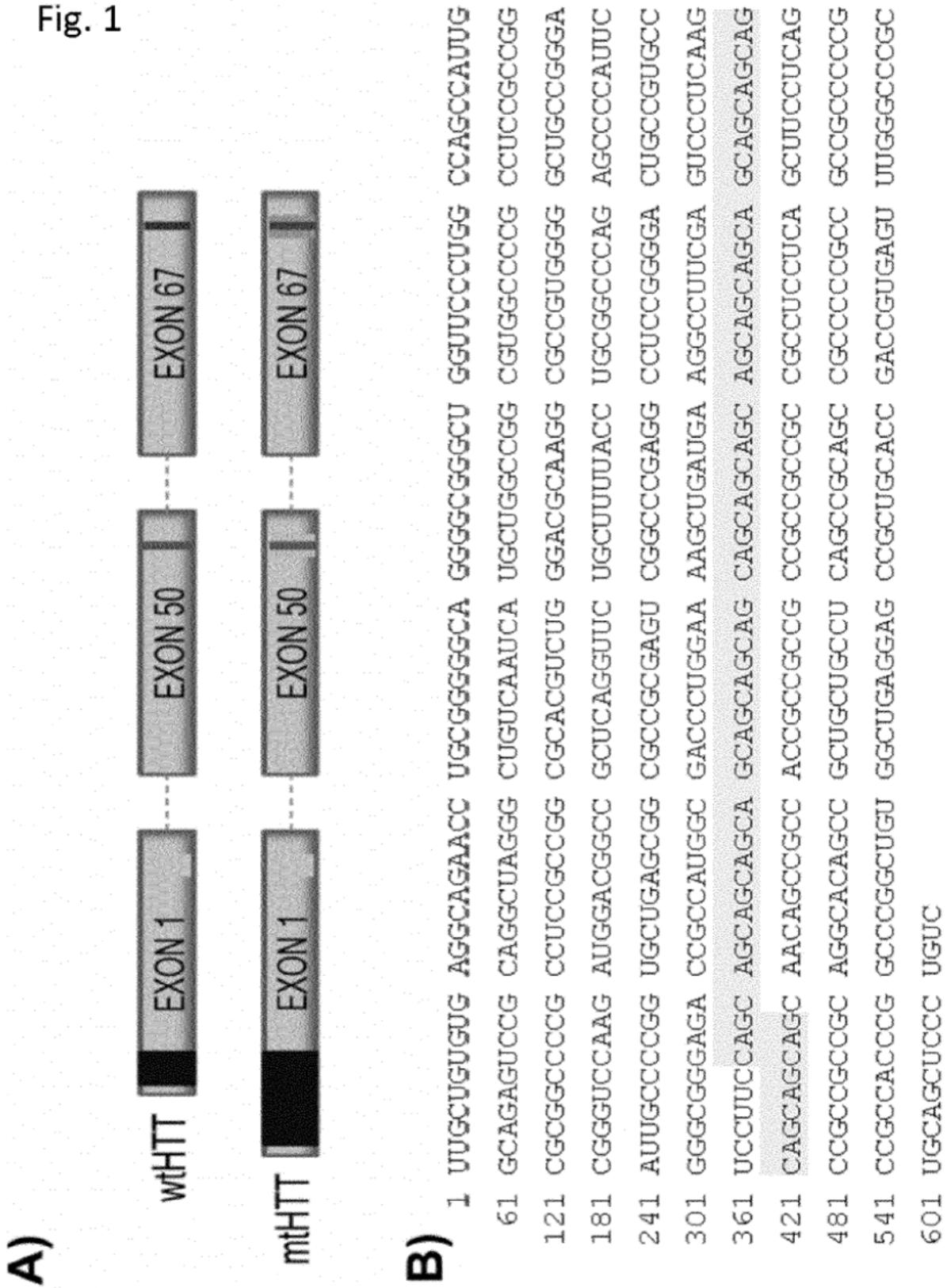


Fig. 1C

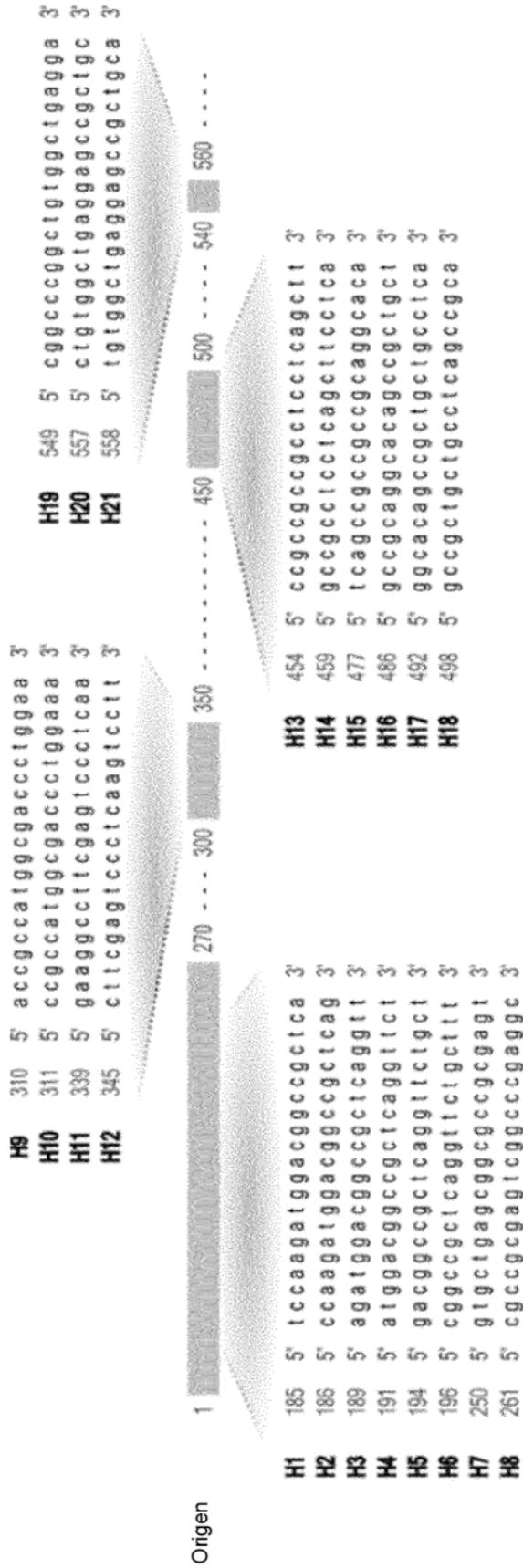


Fig. 2A

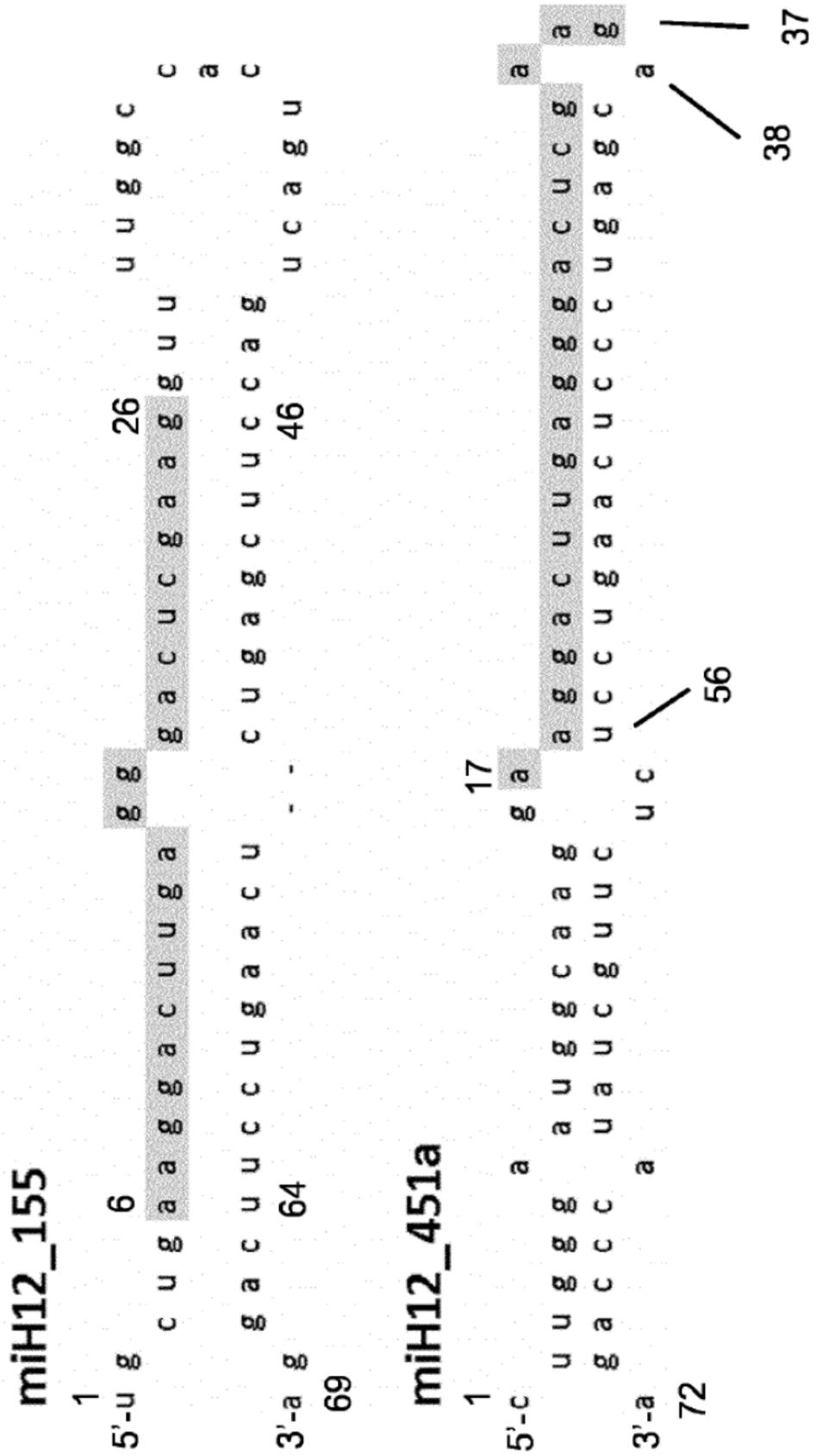


Fig.2B

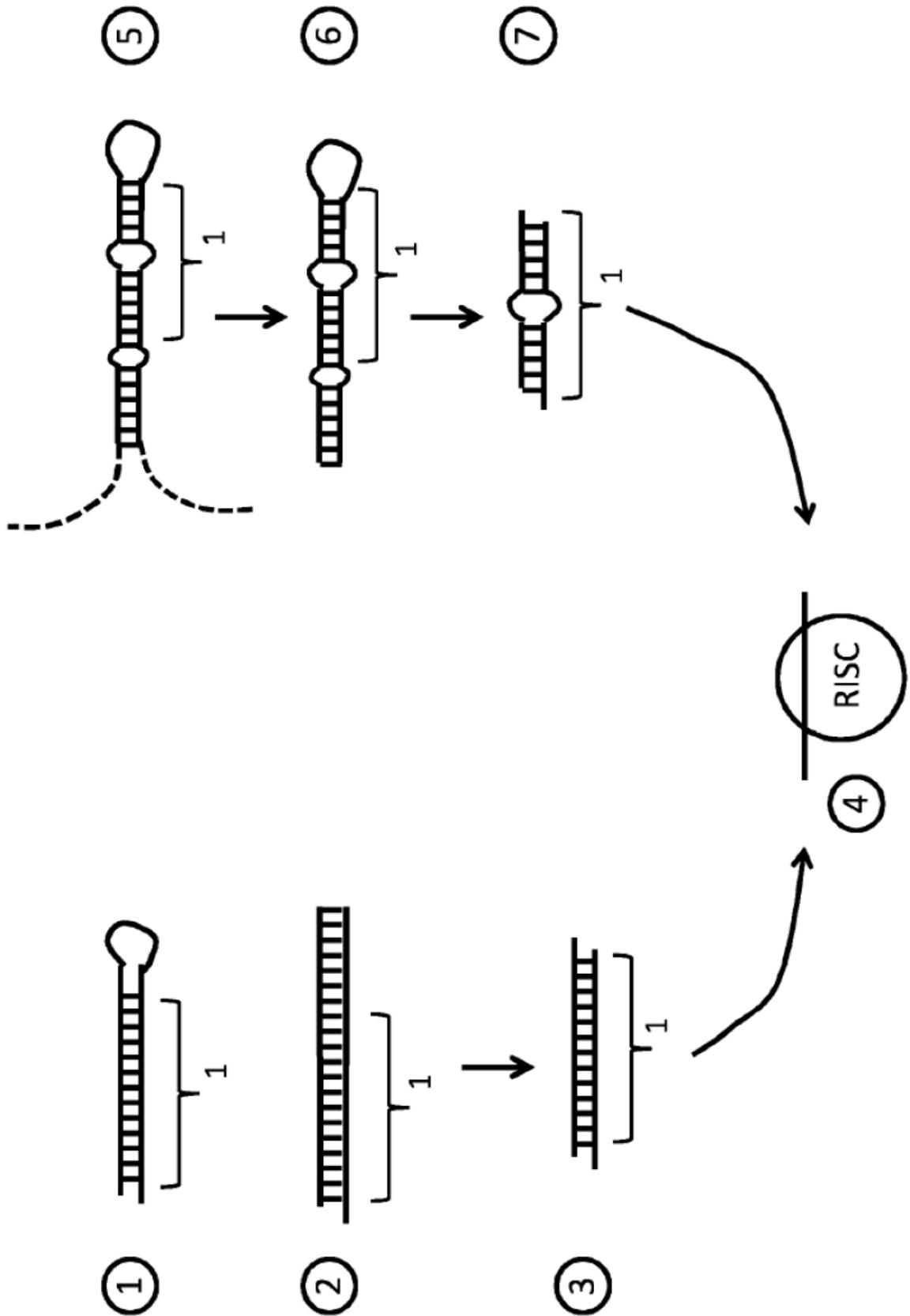


Fig. 2C (SEC ID NO.17)

**GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGT**  
**CATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGG**  
**TAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGT**  
**CAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATT**  
**GACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTAC**  
**ATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG**  
**GTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACT**  
**TTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG**  
**TGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACT**  
**CACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTTGT**  
**TTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCG**  
**CCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATA**  
**TAAGCAGAGCTC***CTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTA*  
*TCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGTCCCAAGCTGGCTAGTTAA*  
*GCTATCAACAAGTTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTAAAACCATGGTGAG*  
*CAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCT*  
*GGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGA*  
*GGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAC*  
*CGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCTCGTGACCACCTTCACCTA*  
*CGGCGTGCAGTGCTTCGCCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGA*  
*CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCAT*  
*CTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTT*  
*CGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTT*  
*CAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAA*  
*CAGCCACAAGGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAA*  
*GGTGAAC TTCAAGACCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCT*  
*CGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCGACGGCCCCGTGCT*  
*GCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGA*  
*CCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGC*

Fig. 2C continuación

CGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGCTAAGCA  
CTTCGTGGCCGTCGATCGTTTAAAGGGAGGTAGTGAGTCGACCAGTGG  
ATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTG**AAGGACTTGAGGGACTC**  
**GAAG**TTTTGGCCACTGACTGACCTTCGAGTCTCAAGTCCTTCAGGAC  
ACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCAGATCTGG  
CCGCACTCGAGATATCTAGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTTGAT  
CTAGAGGGCCCGCGGTTTCGCTGAT**GGGGGAGGCTAACTGAAACACGGA**  
**AGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGAC**  
**AGAATAAACGCACGGGTGTTGGGTTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTT**  
**CGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATACCCACCGTGACCCCATTTGG**  
**GGCCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACCCACCCCAAGT**  
**TCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCT**  
**GCCATAGC**ATCCCCTATAGTG

Fig.2 D (SED ID NO.18)

CAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGCGCCCTTAATTCG  
 GTACCCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAG  
 CCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCC  
 TGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTA  
 TGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT  
 GGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA  
 TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC  
 CTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA  
 GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCC  
 CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCACCCCCAAT  
 TTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGG  
 GGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCG  
 GGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGGCGC  
 GCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGGCGGGCCCTA  
 TAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTGCCTGCGACGCTGCCTTC  
 GCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCT  
 GACTGACCGCGTTACTCCCACAAGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTC  
 CTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTTCTTTTC  
 TGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCG  
 GGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGGGGAGC  
 GCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCG  
 GCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCG  
 GGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCT  
 GCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGG  
 CGGTCGGGCTGTAACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAG  
 CACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGG  
 CTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGG  
 GCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGCGGC  
 CCCCAGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGGCGCGCCGACCCATTGC

Fig. 2D continuación

**CTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAA**  
**ATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGC**  
**GGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGG**  
**GAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGTCCCCTTCTCCCTCTCCAG**  
**CCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGC**  
**AGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGGCGGCTCTAGAGCCTCT**  
**GCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCTACAGCTCCTGGGCAAC**  
**GTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTAAGGGCG**  
**AATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGATATCGGCGCTATGC**  
**TTCTGTGCCCCAGTGGGGCCCTGGCTGGGATTTTCATCATATACTGT**  
**AAGTTTGCATGAGACACTACAGTATAGATGATGTACTAGTCCGGGCA**  
**CCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGGAGGACAGGAGAGATGCTGCAAGC**  
**CCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTGTCACAACCTACTGACTGCCAGGGC**  
**ACTTGGGAATGGCAAGGA**AAGGACTTGAGGGACTCGAAGACGAGTCCCT****  
**CAAGTCCCTCTCTTGCTATAACCCAGAAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCA**  
**GGACCCTGAAGCAGACTACTGGAAGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGC**  
**AGGGGTGGGGGCGTGGGATTGGGGGTAGGGGAGGGAATAGATACATTT**  
**TCTCTTTCCTGTTGTAAAGAAATAAAGATAAGCCAGGCACAGTGGCTC**  
**ACGCCTGTAATCCCACCACTTTCAGAGGCCAAGGCGCTGGATCCAGAT**  
**CTCGAGCGGCCGCCCG**TGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCT****  
****CCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCACCAGCCTTGTCCTAAT****  
****AAAATTAAGTTGCATCA**AGATCGACGGGGCCCGTCGACTGCAGAG**

Fig. 2E (SEQ ID NO.19)

GTTGTAAAACGACGGCCAGTGA**ATTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTT**  
**TCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACTT**  
**GGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACATCCACCG**  
**GTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCCCTTCGCGCCACCTT**  
**CTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTCCCCCCCCGCCCCGAGCTCGCGT**  
**CGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCAC**TAGTCTCGTGC  
 AGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCA  
 GCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGG  
 GAAGGGGTGGGTCCGGGGGGCGGGCTCAGGGGGCGGGCTCAGGGGGCGGGG  
 CGGGCGCCCGAAGGTCCTCCGGAGGCCCGGCATTCTGCACGCTTCAAA  
 AGCGCACGTCTGCCGCGCTGTTCTCCTCTTCCTCATCTCCGGGCCTTT  
 CGACCCGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGA  
 ATGCATCTAGATATCGGCGCTATGCTTCCTGTGCCCCCAGTGGGGCCC  
 TGGCTGGGATTTTCATCATATACTGTAAGTTTGCGATGAGACACTACAG  
 TATAGATGATGTACTAGTCCGGGCACCCCCAGCTCTGGAGCCTGACAA  
 GGAGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCT  
 GTCACAACCTACTGACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGG**AAGGAC**  
**TTGAGGGACTCGAAGACGAGTCCCTCAAGTCCTCTCTTGCTATACCCA**  
GAAAACGTGCCAGGAAGAGAACTCAGGACCCTGAAGCAGACTACTGGA  
 AGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGGCGTGGGATTGGG  
 GGTAGGGGAGGGAATAGATACATTTTCTCTTTCCTGTTGTAAAGAAAT  
 AAAGATAAGCCAGGCACAGTGGCTCACGCCTGTAATCCCACCACTTTC  
 AGAGGCCAAGGCGCTGGATCCAGATCTCGAGCGGCCGCCCG**TGGCATC**  
**CCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTC**  
**CAGTGCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCA**AGATCG  
 ACGGGCCCGTCTGACTGCAGAGGCC

Fig. 2F - pri-miH12-155 (SEQ ID NO.20)

GCUAAGCACUUCGUGGCCGUCGAUCGUUUAAAGGGAGGUAGUGAGUCG  
ACCAGUGGAUCCUGGAGGCUUGCUGAAGGCUGUAUGCUG**AAGGACUUG**  
**AGGGACUCGAAG**GUUUUGGCCACUGACUGACCUUCGAGUCUCAAGUCC  
UUCAGGACACAAGGCCUGUUAUCUAGCACUCACAUGGAACAAAUGGCC  
AGAUCUGGCCGCACUCGAGAUUUCUAGACCCAGCUUUCUUGUACAAAG  
UGGUUGAUCUAGAGGGCCCGCGGUUCGCUGAU

Fig. 2G-pri-miH12-451 (constructo CAG, SEC ID NO.21)

GCUCCUGGGCAACGUGCUGGUUAUUGUGCUGUCUCAUCAUUUUGGCAA  
AGAAUUAAGGGCGAAUUCGAGCUCGGUACCUCGCGAAUGCAUCUAGAU  
AUCGGCGCUAUGCUUCCUGUGCCCCAGUGGGGCCUGGCUGGGAUUU  
CAUCAUAUACUGUAAGUUUGCGAUGAGACACUACAGUAUAGAUGAUGU  
ACUAGUCCGGGCACCCCCAGCUCUGGAGCCUGACAAGGAGGACAGGAG  
AGAUGCUGCAAGCCCAAGAAGCUCUCUGCUCAGCCUGUCACAACCUAC  
UGACUGCCAGGGCACUUGGGAAUUGGCAAGG**AAGGACUUGAGGGACUCG**  
**AAGACGAGUCCCUCAAGUCCUCUCUUGCUAUACCCAGAAAACGUGCCA**  
GGAAGAGAACUCAGGACCCUGAAGCAGACUACUGGAAGGGAGACUCCA  
GCUCAACAAGGCAGGGGUGGGGGCGUGGGAUUGGGGGUAGGGGAGGG  
AAUAGAUACAUUUCUCUUUCCUGUUGUAAAGAAAUAAAGAUAAAGCCA  
GGCACAGUGGCUCACGCCUGUAAUCCCACCACUUUCAGAGGCCAAGGC  
GCUGGAUCCAGAUCUCGAGCGGCCGCCCCG

Fig. 2H - pri-miH12-451

(constructo PGK, SEC ID NO.22)

AGUCUCGUGCAGAUUGGACAGCACCGCUGAGCAAUGGAAGCGGGUAGGC  
CUUUGGGGCAGCGGCCAAUAGCAGCUUUGCUCUUCGCUUUCUGGGCU  
CAGAGGCUGGGAAAGGGGUGGGUCCGGGGGCGGGCUCAGGGGCGGGCUC  
AGGGGCGGGGCGGGCGCCGAAGGUCCUCCGGAGGCCCGGCAUUCUGC  
ACGCUUCAAAAGCGCACGUCUGCCGCGCUGUUCUCCUCUUCUCAUCU  
CCGGGCCUUUCGACCCGGAUCCCCCGGGCUGCAGGAAUUCGAGCUCGG  
UACCUCGCGAAUGCAUCUAGAUUAUCGGCGCUAUGCUUCCUGUGCCCC  
AGUGGGGGCCUGGCUGGGAUUUCAUCAUAUACUGUAAGUUUGCGAUGA  
GACACUACAGUAUAGAUGAUGUACUAGUCCGGGCACCCCCAGCUCUGG  
AGCCUGACAAGGAGGACAGGAGAGAUGCUGCAAGCCCAAGAAGCUCUC  
UGCUCAGCCUGUCACAACCUACUGACUGCCAGGGCACUUGGGAAUGGC  
AAGGAAGGACUUGAGGGACUCGAAGACGAGUCCCUCAAGUCCUCUCU  
U  
GCUAUACCCAGAAAACGUGCCAGGAAGAGAACUCAGGACCCUGAAGCA  
GACUACUGGAAGGGAGACUCCAGCUCAAACAAGGCAGGGGUGGGGGCG  
UGGGAUUGGGGGUAGGGGAGGGAAUAGAUACAUUUUCUCUUUCCUGUU  
GUAAAGAAAUAAGAUAAAGCCAGGCACAGUGGCUCACGCCUGUAAUCC  
CACCACUUUCAGAGGCCAAGGCGCUGGAUCCAGAUUCGAGCGGCCGC  
CCG

Fig. 3A

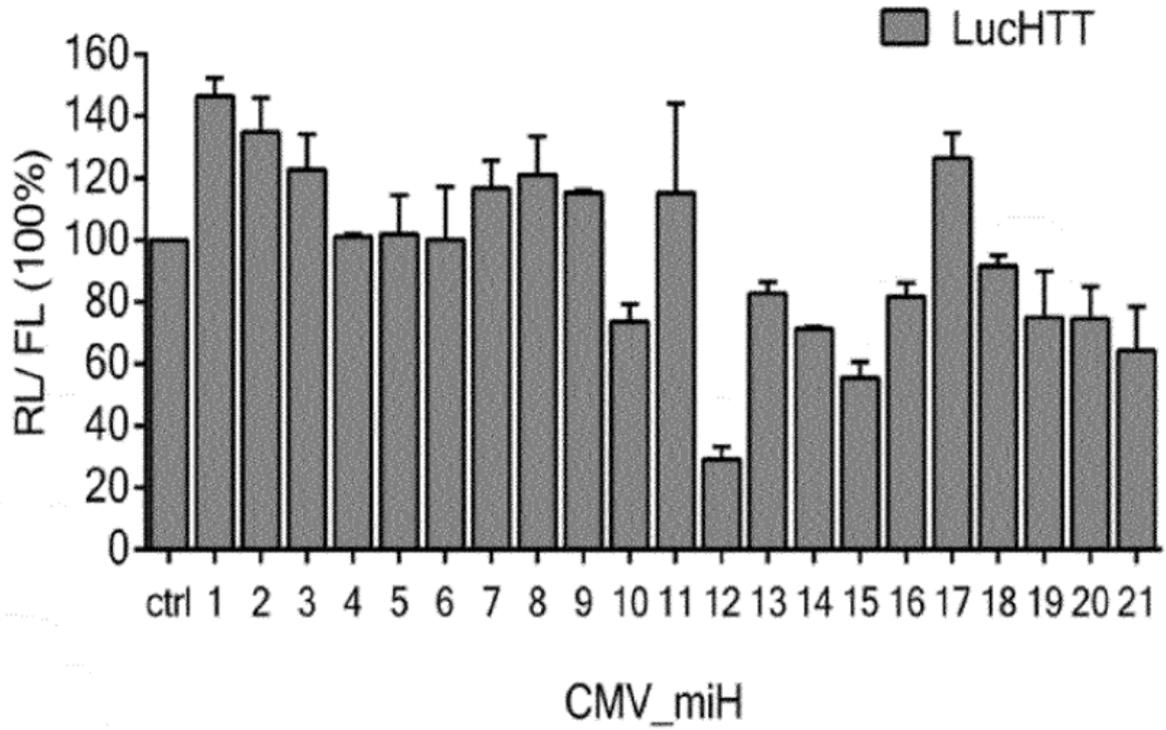


Fig. 3B

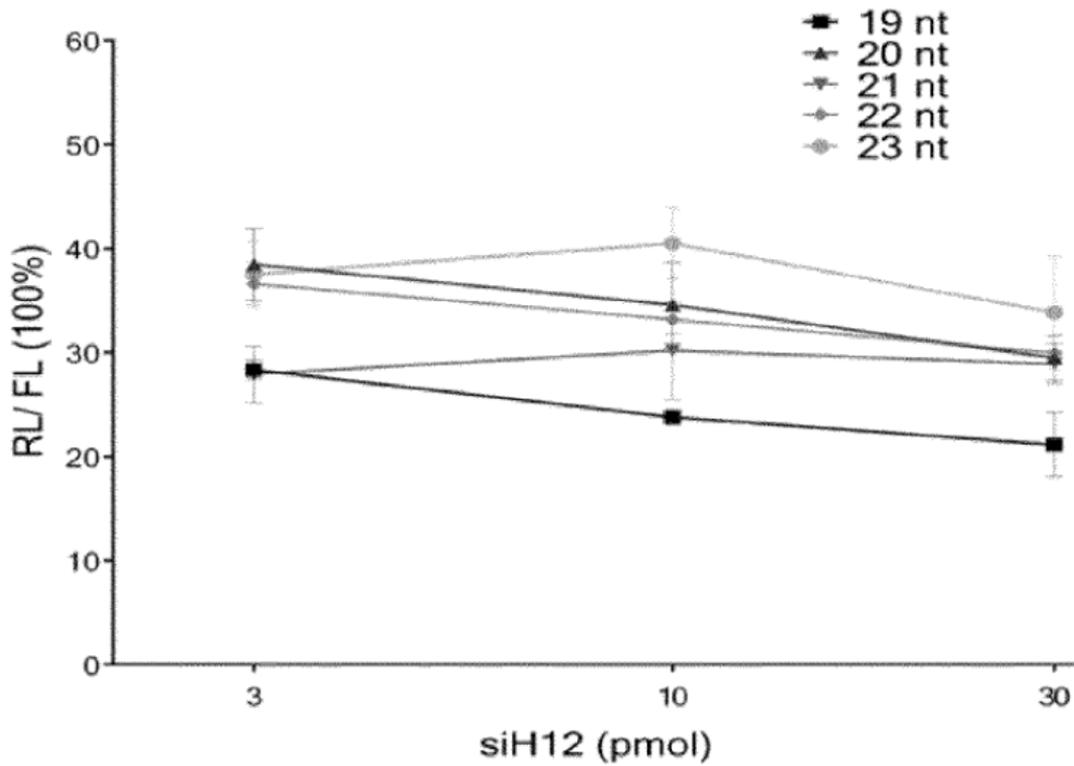


Fig. 4A

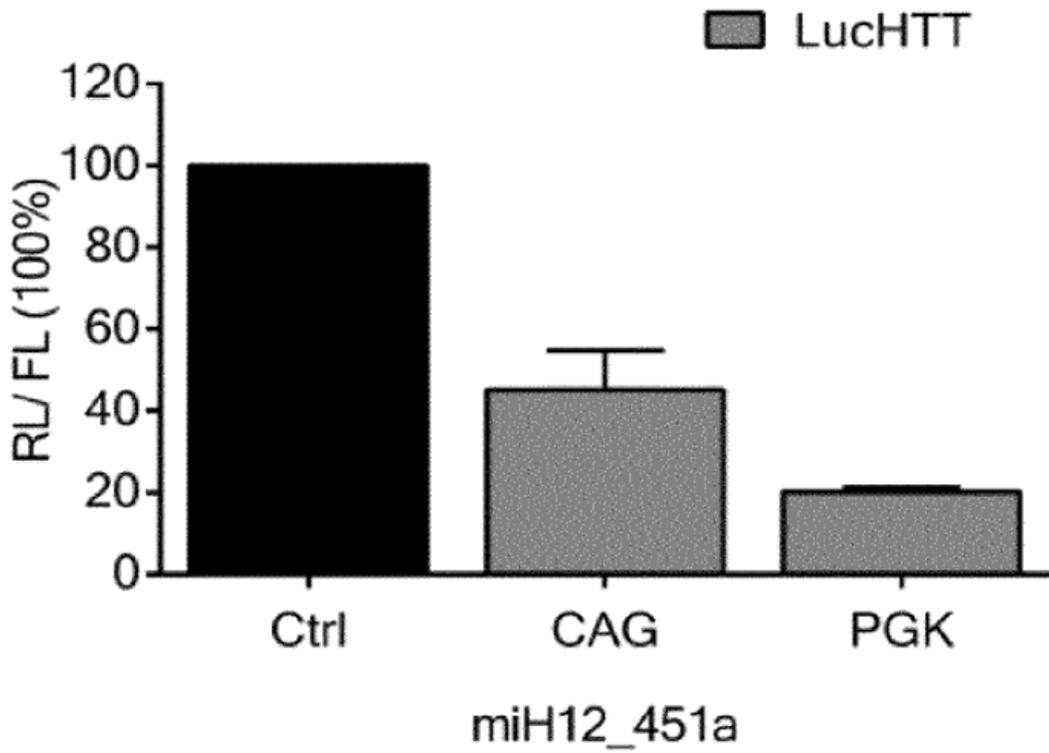


Fig. 4B

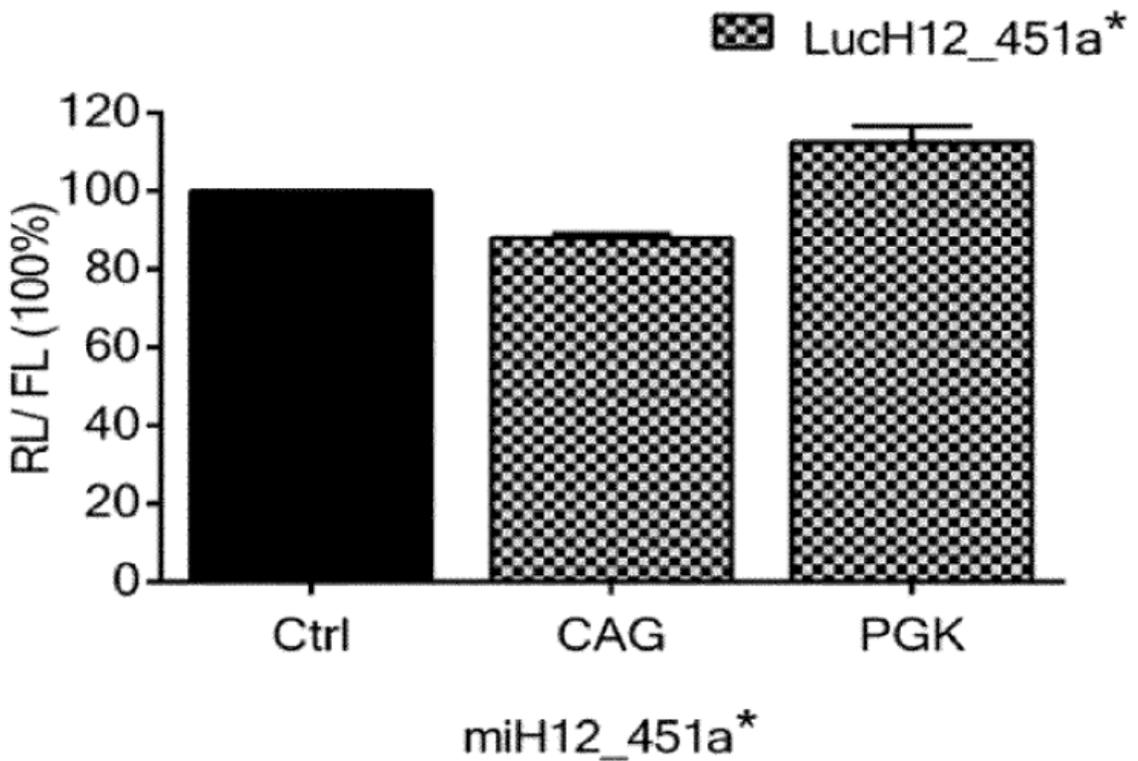


Fig. 5

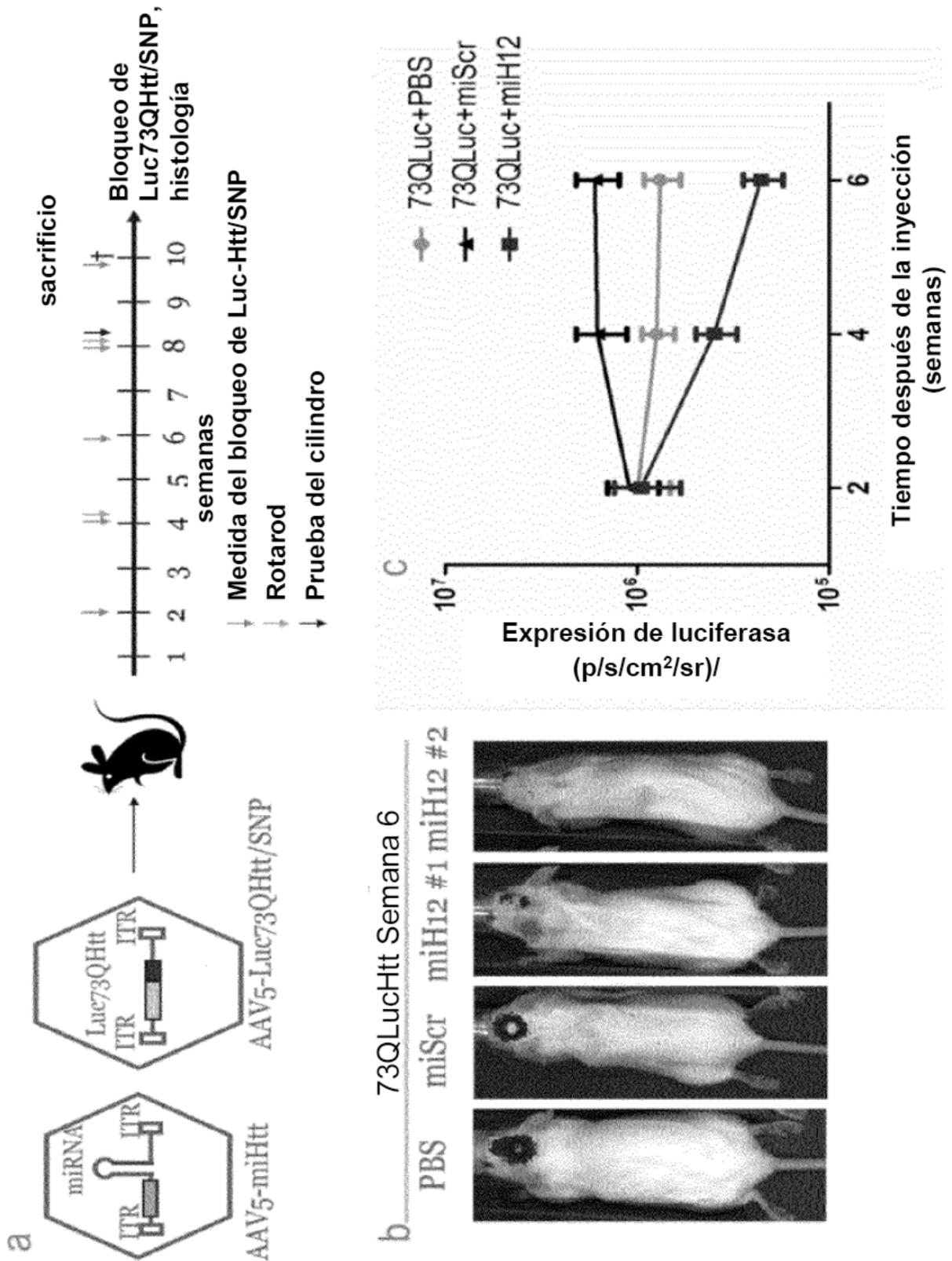


Fig. 6A

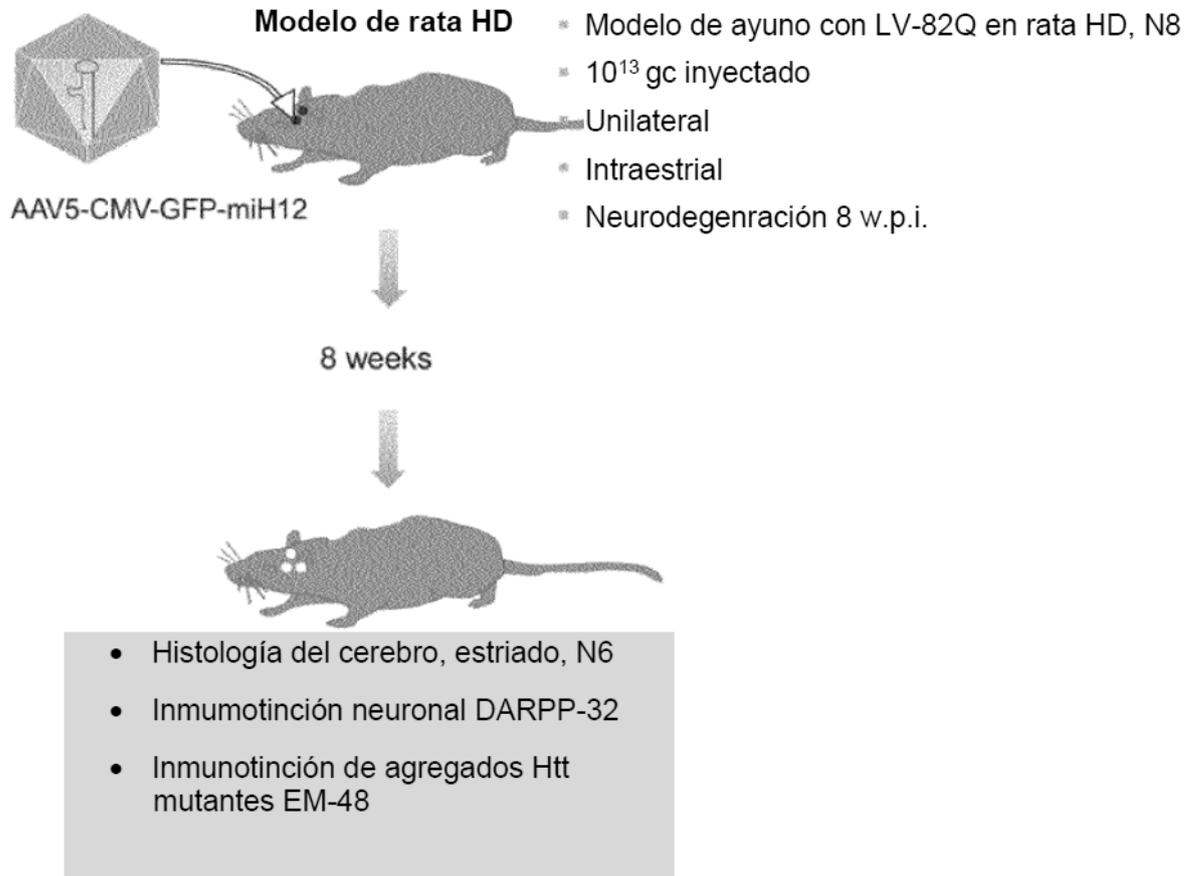
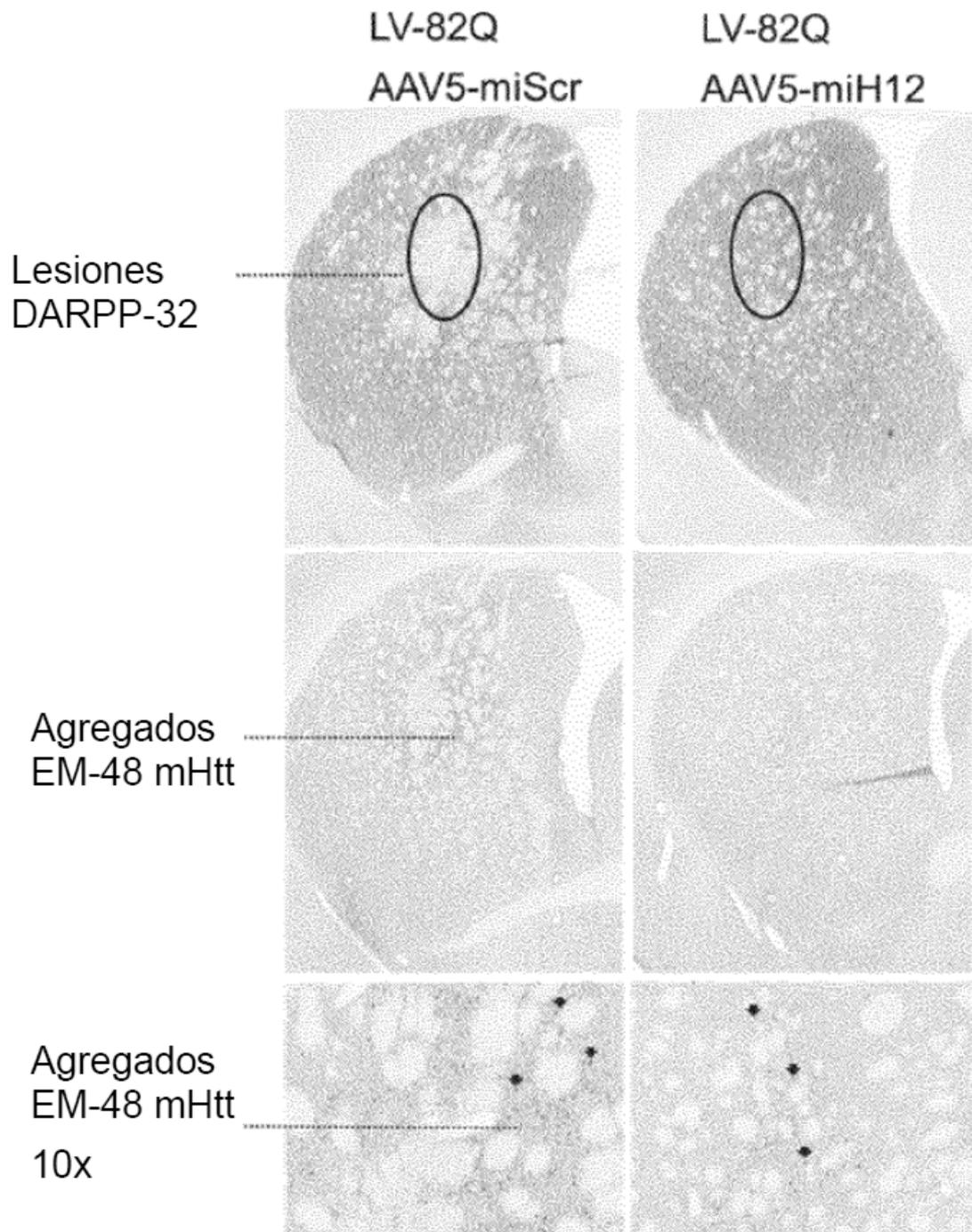


Fig. 6B

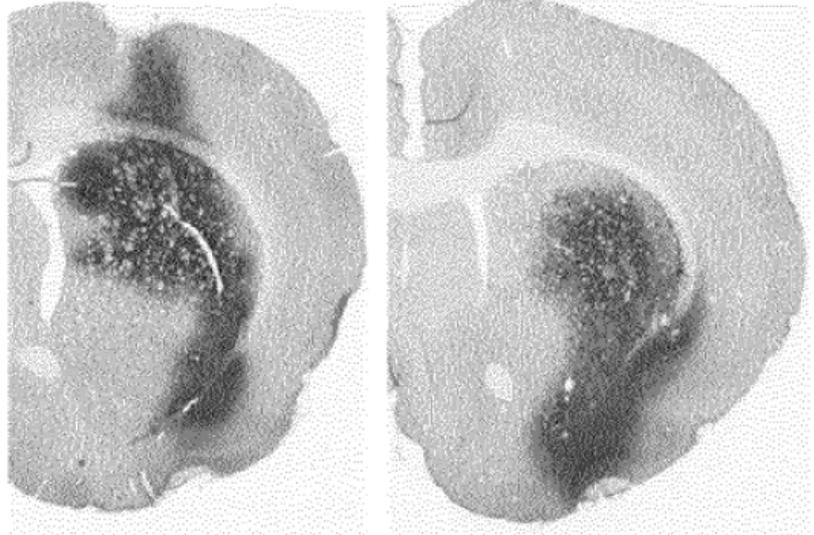


**Fig. 6C**

LV-82Q  
AAV5-miScr

LV-82Q  
AAV5-miH12

Tinción GFP



**Fig. 6D**

Tinción Iba1

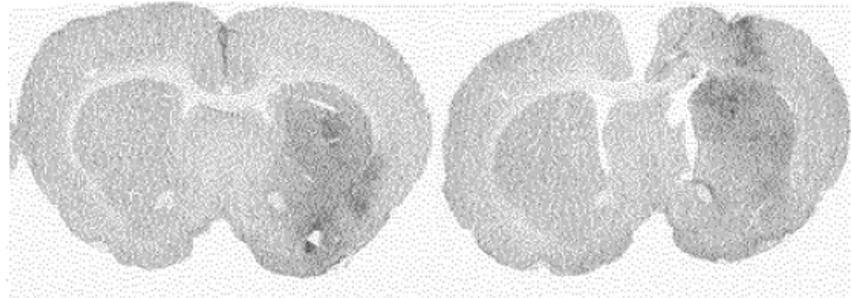


Fig. 7A

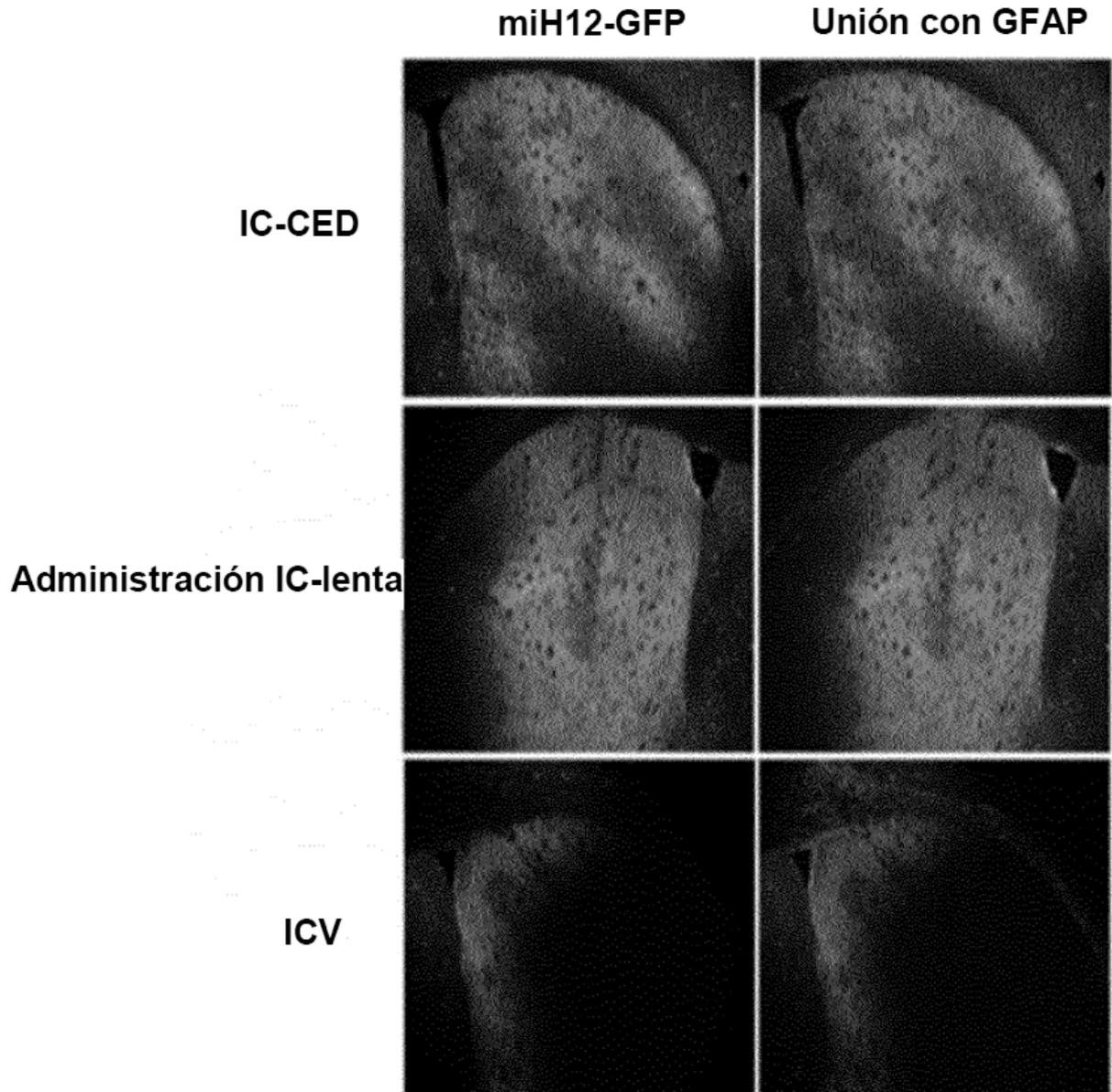


Fig. 7B

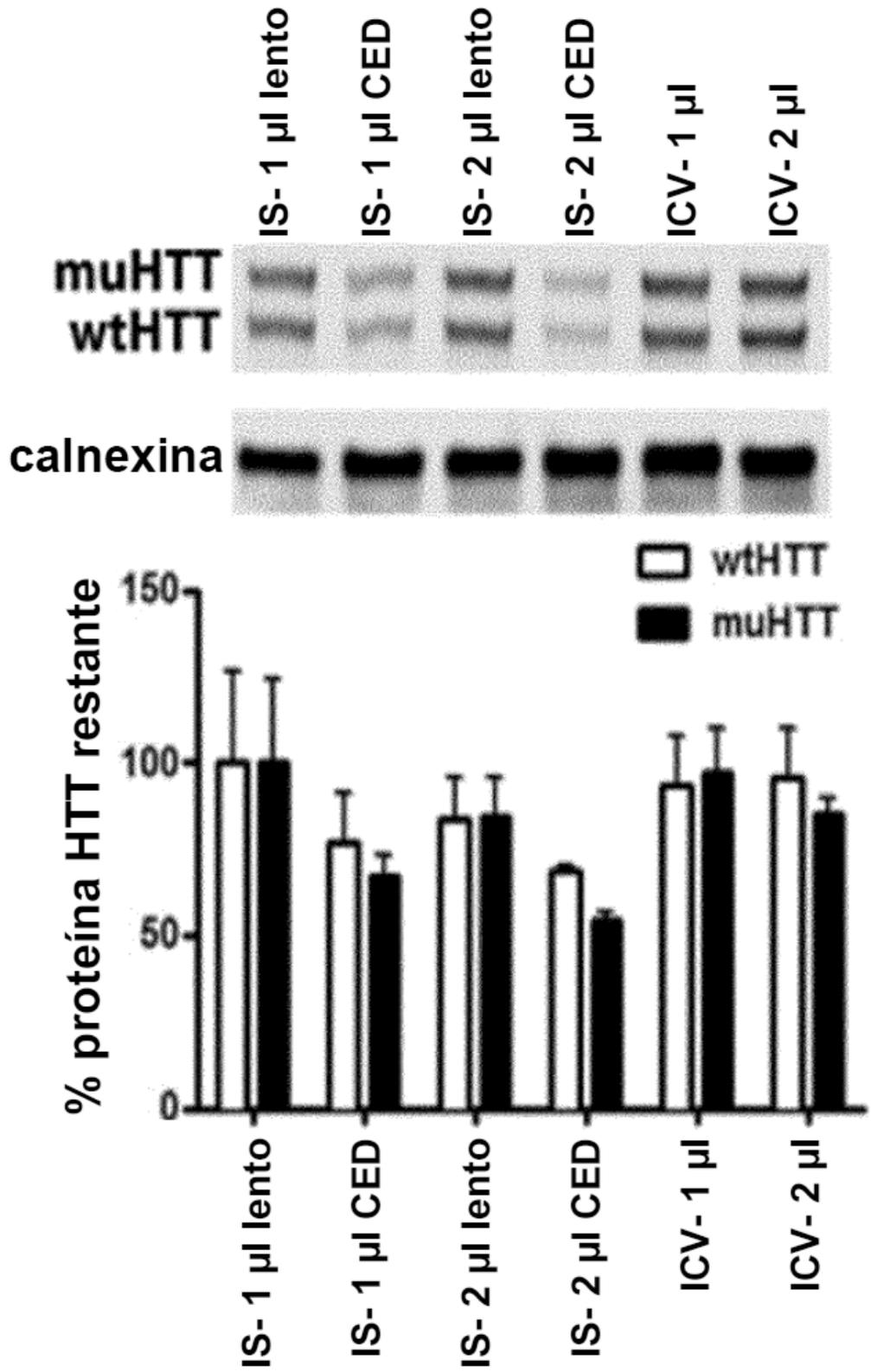


Fig.8A

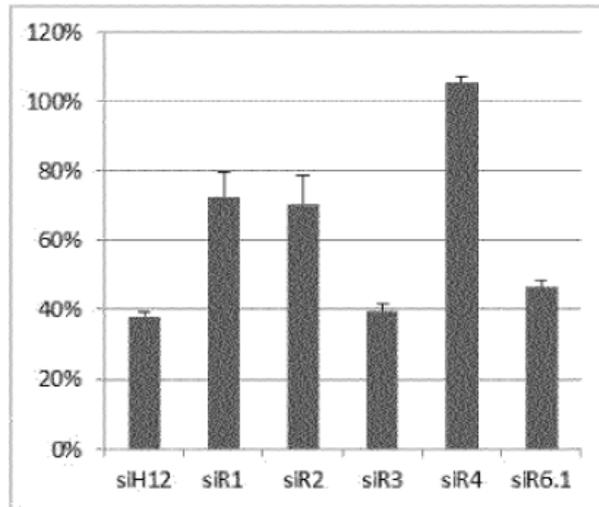


Fig.8B

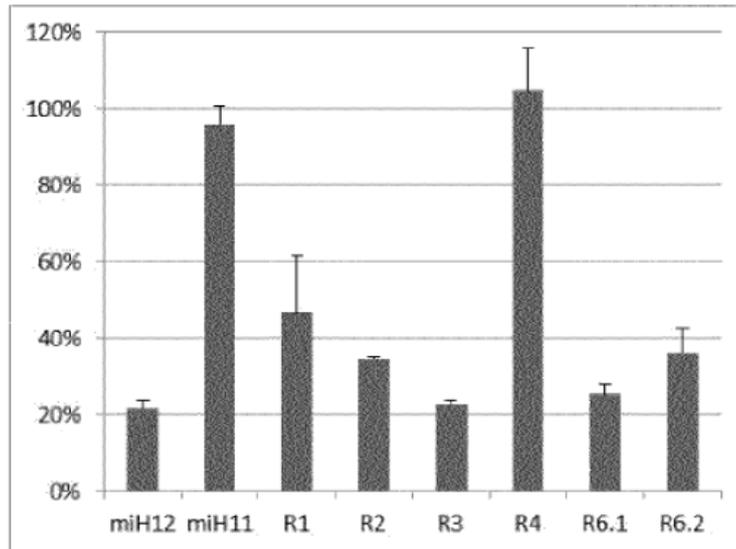


Fig.8C

