

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 804**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2012** **PCT/US2012/024904**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012** **WO12109667**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2012** **E 12745030 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019** **EP 2673286**

54 Título: **Compuestos terapéuticos**

30 Prioridad:

12.02.2011 US 201161442218 P

11.08.2011 US 201161522632 P

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

04.02.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)**

**Iowa Centers for Enterprise, 112 N. Capitol Street,
6 Gilmore Hall
Iowa City, IA 52242-5500, US**

72 Inventor/es:

**DAVIDSON, BEVERLY, L. y
BOUDREAU, RYAN, L.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 739 804 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

Compuestos terapéuticos

5 REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N.º 61/442.218, presentada el 12 de febrero de 2011, y la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 61/522.632, presentada el 11 de agosto de 2011.

10 APOYO GUBERNAMENTAL

La invención se realizó con apoyo gubernamental en virtud de las subvenciones N.º NS-50210, NS-068099, y DK-54759. El Gobierno tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

15 Antecedentes de la invención

El ARNi dirige el silenciamiento génico específico de secuencia mediante ARN bicatenario (ARNds) que se procesa en ARN inhibidores pequeños funcionales (~21 nt). En la naturaleza, el ARNi para la regulación de la expresión génica se produce principalmente a través de pequeños ARN conocidos como microARN (miARN). Los microARN maduros (~19-25 nt) se procesan a partir de transcritos de miARN primario más grandes (pri-miARN) que contienen regiones de tallo-bucle. A través de una serie de eventos de procesamiento catalizados por las ribonucleasas, Drosha y Dicer, la región dúplex de miARN se libera y después se incorpora una sola hebra (la hebra "guía" antisentido) en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), generando así un complejo funcional capaz de emparejar bases y silenciar transcritos diana. El modo de represión diana depende principalmente del grado de complementariedad; la escisión de la transcripción típicamente requiere un alto grado de emparejamiento de bases, mientras que la represión de la traducción y la desestabilización del ARNm se producen cuando los ARN pequeños se unen de manera imperfecta a transcritos diana (la mayoría de las veces en la UTR 3'). De hecho para esto último, los tramos cortos de complementariedad (tan solo 6 pb) pueden ser suficientes para causar el silenciamiento génico.

30 El documento WO 2007/051045 se refiere a un ácido ribonucleico bicatenario (ARNds) para inhibir la expresión del gen de Huntingtina (gen de la EH), que comprende una cadena antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene una longitud menor de 25 nucleótidos y que es sustancialmente complementaria al menos a una parte del gen de la EH.

35 El documento WO 2008/150897 se refiere a moléculas de interferencia de ARN (ARNi) dirigidas contra una secuencia de ácido nucleico, y métodos de uso de estas moléculas de ARNi para reducir la toxicidad inespecífica.

Sumario de la invención

40 La presente divulgación proporciona un vector lanzadera de miARN aislado que expresa un ARNsi terapéutico con una toxicidad inespecífica limitada. En ciertas realizaciones de la divulgación, incrustar un ARNsi que exhibe una toxicidad inespecífica en el contexto de un vector lanzadera de miARN de la presente divulgación limita la toxicidad inespecífica del ARNsi. En ciertas realizaciones de la divulgación, el vector lanzadera de miARN expresa un ARNsi terapéutico en el cerebro con una toxicidad inespecífica limitada. En ciertas realizaciones de la divulgación, el vector lanzadera de miARN expresa un ARNsi terapéutico en el estriado con una toxicidad inespecífica limitada. En ciertas realizaciones de la divulgación, el vector lanzadera de miARN expresa un ARNsi terapéutico en el cerebro con una toxicidad inespecífica limitada.

50 La presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica un transcrito de miARN primario artificial (pri-miARN) que consiste en, en orden de posición, una región flanqueante 5', una región no guía, una región de bucle, una región guía, y una región flanqueante 3', en el que la región guía es un 100 % idéntica a cgaccaugcgagccagca (guía de miHDS.1, SEQ ID NO:7), o al menos un 90 % idéntica a agucgcugaugaccggga (guía de miHDS.2, SEQ ID NO:8), y la región no guía es al menos un 80 % complementaria a la región guía.

55 La presente divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un transcrito primario (pri-miARN) que incluye, en orden de posición, una región flanqueante 5', una región no guía (pasajera), una región de bucle, una región guía, y una región flanqueante 3', en el que la región guía es al menos un 90 % idéntica a CGACCAUGCGAGCCAGCA (guía de miHDS.1, SEQ ID NO:7), AGUCGUGAUGACCGGGA (guía de miHDS.2, SEQ ID NO:8) o ACGUCGUAACAAGAGGA (guía de miHDS.5, SEQ ID NO:9) y la región no guía es al menos un 80 % complementaria a la región guía.

65 En ciertas realizaciones, la región flanqueante 5' está unida de forma contigua a la región no guía, la región de bucle está posicionada entre la región no guía y la región guía, y la región guía está unida de forma contigua a la región flanqueante 3'. Como se usa en el presente documento, el término "región guía de ARNsi" es una secuencia de ARN monocatenaria que es complementaria con una secuencia diana. Como se usa en el presente documento, el término "región no guía de ARNsi" es una secuencia monocatenaria de ARN que es complementaria con la "región guía de

ARNsi". Por lo tanto, en las condiciones adecuadas, La región guía de ARNsi y la región no guía de ARNsi se asocian para formar un dúplex de ARN. Como se usa en el presente documento, se enumeran todas las secuencias de ácido nucleico, como es habitual, en una dirección de 5' a 3'.

- 5 En ciertas realizaciones de la divulgación, la región no guía tiene una longitud de aproximadamente 15-30 nucleótidos, y es aproximadamente un 70-100 % complementaria con la región guía, que tiene aproximadamente 15-30 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones de la divulgación, la región guía es al menos un 90 % idéntica a CGACCAUGCGAGCCAGCA (guía de miHDS.1, SEQ ID NO:7), AGUCGCUGAUGACCGGGA (guía de miHDS.2, SEQ ID NO:8) o ACGUCGUAAACAAGAGGA (guía de miHDS.5, SEQ ID NO:9) y la región no guía es al menos un 80 %
10 complementaria a la región guía.

- En ciertas realizaciones, La región flanqueante 5' contiene una secuencia de unión 5' unida de forma contigua a la región no guía. Como se usa en el presente documento, el término "sitio de unión" o una "secuencia de unión" es una secuencia de ácido nucleico corto de menos de 60 nucleótidos que conecta otras secuencias de ácido nucleico diferentes. En ciertas realizaciones, el sitio de unión tiene una longitud de cualquier número entero entre 4 y 50, inclusive. En ciertas realizaciones, la secuencia de unión 5' consiste en 5-8 nucleótidos (por ejemplo, consiste en 6 nucleótidos). En ciertas realizaciones, la secuencia de unión 5' codifica GUGAGCGA (SEQ ID NO:12) o GUGAGCGC (SEQ ID NO: 13).

- 20 En ciertas realizaciones, la región flanqueante 5' comprende además una secuencia de bulto 5' posicionada aguas arriba de la secuencia de unión 5'. Como se usa en el presente documento, el término "secuencia de bulto" es una región de ácido nucleico que no es complementaria con el ácido nucleico opuesto a éste en un dúplex. Por ejemplo, un dúplex contendrá una región de ácidos nucleicos complementarios, después una región de ácidos nucleicos no complementarios, seguido de una segunda región de ácidos nucleicos complementarios. Las regiones de los ácidos nucleicos complementarios se unirán entre sí, mientras que la región central no complementaria no se unirá, formando así un "bulto". En ciertas realizaciones, las dos hebras de ácido nucleico posicionadas entre las dos regiones complementarias serán de diferentes longitudes, formando así un "bulto". En ciertas realizaciones, La secuencia de bulto 5' contendrá de 2 a 15 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la secuencia de bulto 5' consiste en aproximadamente 1-10 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la secuencia de bulto 5' codifica UAAACUCGA (SEQ ID NO:14). En ciertas realizaciones, la secuencia de bulto 5' tiene del 0-50 % de complementariedad con la secuencia de bulto 3'. El sitio de restricción XhoI es CTCGAG (SEQ ID NO:15) (estando "U" en forma de ARN en esta y en todas las demás secuencias enumeradas en el presente documento).

- 35 En ciertas realizaciones, la región flanqueante 5' contiene además una secuencia espaciadora 5' posicionada aguas arriba de la secuencia de bulto 5'. En ciertas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' consiste en 9-12 nucleótidos, tales como 10-12 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' tiene del 60-100 % de complementariedad con una secuencia espaciadora 3'. En ciertas realizaciones, la secuencia de bulto 5' comprende un sitio de clonación, tal como un sitio XhoI. En ciertas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' es UGGUACCGUU (SEQ ID NO:16).

- 40 En ciertas realizaciones, la región flanqueante 5' contiene además una secuencia aguas arriba 5' posicionada aguas arriba de la secuencia espaciadora 5'. En ciertas realizaciones, la secuencia aguas arriba 5' tiene una longitud de aproximadamente 5-5000 nucleótidos, tal como 30-2000 nucleótidos de longitud.

- 45 En ciertas realizaciones, la región flanqueante 3' contiene una secuencia de unión 3' de forma contigua unida a la región guía. En ciertas realizaciones, el sitio de unión tiene una longitud de cualquier número entero entre 4 y 50, inclusive. En ciertas realizaciones, la secuencia de unión 3' consiste en 5-8 nucleótidos, (por ejemplo, consiste en 6 nucleótidos). En ciertas realizaciones, la secuencia de unión 3' es al menos aproximadamente un 85 % complementaria con una secuencia de unión 5'. En ciertas realizaciones, la secuencia de unión 3' codifica CGCYUAC (SEQ ID NO:17), en la que Y es C o U. En ciertas realizaciones, la secuencia de unión 3' codifica CGCCUAC (SEQ ID NO:18).

- 55 En ciertas realizaciones, la región flanqueante 3' comprende además una secuencia de bulto 3' posicionada aguas abajo de la secuencia de unión 3'. En ciertas realizaciones, la secuencia de bulto 3' comprende un sitio de clonación, tal como un sitio SpeI/XbaI o un sitio SpeI. El sitio SpeI/XbaI está codificado por CTCAGA (SEQ ID NO:19), y el sitio SpeI está codificado por CTCAGT (SEQ ID NO:20). En ciertas realizaciones, la secuencia de bulto 3' consiste en aproximadamente 1-15 nucleótidos (tal como 2-15 nucleótidos o 1-10 nucleótidos). En ciertas realizaciones, la secuencia de bulto 3' codifica UAG (SEQ ID NO: 32). En ciertas realizaciones, la secuencia de bulto 5' es complementaria con la secuencia de bulto 3' en solo un nucleótido en cada extremo de la secuencia.

- 60 En ciertas realizaciones, la región flanqueante 3' contiene además una secuencia espaciadora 3' posicionada aguas abajo de la secuencia de bulto 3'. En ciertas realizaciones, la secuencia espaciadora 3' consiste en 9-12 nucleótidos, tales como 10-12 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la secuencia espaciadora 3' es AGCGGCCGCCA (SEQ ID NO:21). En ciertas realizaciones, la secuencia espaciadora 3' es al menos aproximadamente un 70 % complementaria con una secuencia espaciadora 5'.
65

En ciertas realizaciones, la región flanqueante 3' contiene además una secuencia aguas abajo 3' posicionada aguas abajo de la secuencia espaciadora 3'. En ciertas realizaciones, una secuencia aguas arriba 5' no se empareja significativamente con la secuencia aguas abajo 3'. Como se usa en el presente documento, el término "no se empareja significativamente con" significa que las dos hebras tienen menos del 20 % de homología. En ciertas realizaciones, la secuencia aguas abajo 3' tiene una longitud de aproximadamente 5-5000 nucleótidos, tal como 30-2000 nucleótidos de longitud.

En ciertas realizaciones, la región de bucle tiene de 4-20 nucleótidos de longitud, tal como 15-19 nucleótidos de longitud. Del 0-50 % de la región de bucle puede ser complementaria con otra porción de la región de bucle. Como se usa en el presente documento, el término "región de bucle" es una secuencia que une dos hebras complementarias de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, 1-3 nucleótidos de la región de bucle son inmediatamente contiguos a las hebras complementarias de ácido nucleico y pueden ser complementarios con los últimos 1-3 nucleótidos de la región de bucle. Por ejemplo, los dos primeros ácidos nucleicos en la región de bucle pueden ser complementarios con los dos últimos nucleótidos de la región de bucle. En ciertas realizaciones, la región de bucle tiene 17 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, la región de bucle codifica CUNNNNNNNNNNNNNNGG (SEQ ID NO:22) o CCNNNNNNNNNNNNNNNGG (SEQ ID NO:23). En ciertas realizaciones, la región de bucle codifica CUGUGAAGCCACAGAUGGG (SEQ ID NO:24) o CCGUGAAGCCACAGAUGGG (SEQ ID NO:25).

La presente divulgación proporciona además un ARN codificado por ácido nucleico descrito en el presente documento.

La presente invención proporciona además un casete de expresión que contiene un promotor unido de forma contigua a un ácido nucleico descrito en el presente documento. En ciertas realizaciones, el promotor es un promotor polII o un promotor polIII, tal como un promotor U6 (por ejemplo, un promotor U6 de ratón). En ciertas realizaciones, el casete de expresión contiene además un gen marcador. En ciertas realizaciones, el promotor es un promotor polII. En ciertas realizaciones, el promotor es un promotor específico de tejido. En ciertas realizaciones, el promotor es un promotor inducible. En ciertas realizaciones, el promotor es un promotor polIII.

La presente invención proporciona un vector que contiene un casete de expresión descrito en el presente documento. En ciertas realizaciones, el vector es un vector de virus adenoasociado (AAV).

La presente divulgación proporciona un animal no humano que comprende el ácido nucleico, el casete de expresión, o el vector descrito en el presente documento.

La presente divulgación proporciona un ácido nucleico aislado con una longitud de 80-4000 nucleótidos que comprende (o consiste en) una guía de miHDS.1 GUCGACCAUGCGAGCCAGCAC (SEQ ID NO:4); una guía de miHDS.2 AUAGUCGCUGAUGACCGGGAU (SEQ ID NO:5); una guía de miHDS.5 UUACGUCGUAAACAAGAGGAA (SEQ ID NO:6); un miHDS.1

CUCGAGUGAGCGAUGCUGGCUCGCAUGGUCGAUACUGUAAAGCCACAG
AUGGGUGUCGACCAUGCGAGCCAGCACCGCCUACUAGA (SEQ ID NO:1),

5

GCGUUUAGUGAACCGUCAGAUUGGUACCGUUUAAACUCGAGUGAGCGA
UGCUGGCUCGCAUGGUCGAUACUGUAAAGCCACAGAUGGGUGUCGACC
AUGCGAGCCAGCACCGCCUACUAGAGCGGCCGCCACAGCGGGGAGAUC
CAGACAUGAUAAAGAUACAUC (SEQ ID NO:10),

o

CUCGAGUGAGCGAUGCUGGCUCGCAUGGUCGAUACUGUAAAGCCACAG
AUGGGUGUCGACCAUGCGAGCCAGCACCGCCUACUAGA (SEQ ID
NO:33);

un miHDS.2

CUCGAGUGAGCGCUCCCGGUCAUCAGCGACUAUUCCGUAAAGCCACAG
 AUGGGGAUAGUCGCGUGAUGACCGGGGAUCGCCUACUAG (SEQ ID NO:2) or
 GCGUUUAGUGAACCGUCAGAUUGGUACCGUUUAAACUCGAGUGAGCGC
 UCCCGGUCAUCAGCGACUAUUCCGUAAAGCCACAGAUGGGGAUAGUCG
 CUGAUGACCGGGGAUCGCCUACUAGAGCGGGCCGACAGCGGGGAGAUC
 CAGACAUGAUAAGAUACAUU (SEQ ID NO:11);

o un miHDS.5

CUCGAGUGAGCGCUCCUCUUGUUUACGACGUGAUCUGUAAAGCCACAG
 5 AUGGGAUUACGUCGUAAACAAGAGGAACGCCUACUAGU (SEQ ID NO:3).

La presente divulgación proporciona un dúplex de ARN aislado que comprende una región de guía de ácido nucleico y una región no guía de ácido nucleico, en el que la región guía es al menos un 90 % idéntica a CGACCAUGCGAGCCAGCA (guía de miHDS.1, SEQ ID NO:7), AGUCGUGAUGACCGGGA (guía de miHDS.2, SEQ ID NO:8) o ACGUCGUAAACAAGAGGA (guía de miHDS.5, SEQ ID NO:9) y la región no guía es al menos un 80 % complementaria a la región guía. En ciertas realizaciones de la divulgación, El dúplex de ARN aislado tiene entre 19-30 pares de bases de longitud. Ciertas realizaciones incluyen un casete de expresión que codifica el ácido nucleico aislado descrito anteriormente. En ciertas realizaciones, el casete de expresión comprende además un gen marcador.

15 La presente invención proporciona un casete de expresión que codifica el ácido nucleico aislado de la invención.

La presente divulgación proporciona un método para inducir la interferencia de ARN administrando a un sujeto un ácido nucleico, un casete de expresión, un vector, o una composición descrita en el presente documento.

20 La presente divulgación proporciona un vector que contiene un promotor U6 unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un miARN. Los sitios de inicio de la transcripción predichos de las construcciones de la presente invención son diferentes de los utilizados por los investigadores en el pasado. En ciertas realizaciones de la presente invención, el U6miARN tiene un extremo 5' extendido. Si el extremo 5' se trunca para parecerse a la estrategia anterior basada en CMV, la eficacia del silenciamiento se reduce gravemente. La presente divulgación también proporciona secuencias flaqueantes mejoradas que muestran una eficacia mejorada sobre las secuencias flaqueantes de miR-30 naturales. El uso de la presente estrategia de miARN parece aliviar la toxicidad asociada con los enfoques tradicionales de ARNsh. La estrategia de miARN generalmente no genera cantidades excesivas de ARNi como lo hacen los enfoques de U6ARNsh.

30 Como se usa en el presente documento, el término "secuencia de tallo" es una secuencia que es complementaria con otra secuencia en la misma molécula, donde las dos hebras complementarias se hibridan para formar un dúplex (por ejemplo, las regiones no guía y guía). El dúplex que se forma puede ser completamente complementario, o puede ser menos que totalmente complementario, tal como un 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 %, 80 %, 75 %, o un 70 % complementarios entre sí. Además, en ciertas realizaciones, una hebra puede contener más nucleótidos que la otra hebra, permitiendo la formación de un bucle lateral.

La presente invención también proporciona vectores que contienen los casetes de expresión descritos en el presente documento. Los ejemplos de vectores apropiados incluyen vectores adenovirales, lentivirales, virales adenoasociados (AAV), poliovirus, del virus del herpes simple (HSV), o virales basados en Maloney murinos. En una realización, el vector es un vector de virus adenoasociado. Estos casetes y vectores pueden estar contenidos en una célula, tal como una célula de mamífero. Como se divulga en el presente documento, un mamífero no humano puede contener el casete o el vector.

45 La presente divulgación proporciona células (tal como una célula de mamífero) que contienen las moléculas de ácido nucleico, casetes de expresión o vectores descritos en el presente documento. La presente divulgación también proporciona un mamífero no humano que contiene las moléculas de ácido nucleico, casetes de expresión o vectores descritos en el presente documento.

50 La presente invención proporciona un ácido nucleico, un casete de expresión, o un vector como se describe en el presente documento para su uso en terapia, tal como para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. La presente invención proporciona el ácido nucleico de la invención, el casete de expresión de la invención, o el vector de la invención, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Huntington. La presente divulgación proporciona

una composición como se describe en el presente documento para su uso en terapia, tal como para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

5 La presente invención proporciona un microARN aislado que comprende el ácido nucleico de la invención, en el que la molécula de microARN produce un nivel disminuido de toxicidad inespecífica.

10 La presente divulgación proporciona una molécula de ARNi aislado que tiene un microARN que tiene un saliente en el extremo 3'. En ciertas realizaciones de la divulgación, el saliente es una repetición de 2 a 5 nucleótidos. En ciertas realizaciones de la divulgación, el saliente es una secuencia UU (SEQ ID NO:26), UUU (SEQ ID NO:27), UUUU (SEQ ID NO:28), CUU (SEQ ID NO:29), CUUU (SEQ ID NO:30) o CUUUU (SEQ ID NO:31). En ciertas realizaciones de la divulgación, el microARN es un microARN de origen natural. En ciertas realizaciones de la divulgación, el microARN es un microARN artificial. En ciertas realizaciones de la divulgación, la molécula de ARNi produce un nivel disminuido de toxicidad inespecífica.

15 La presente divulgación proporciona un método para inducir interferencia de ARN de baja toxicidad administrando a un sujeto un ácido nucleico, un casete de expresión, un vector, o una composición como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones de la divulgación, el casete de expresión contiene un promotor polII.

20 La presente divulgación proporciona un método para inducir interferencia de ARN de baja toxicidad administrando a un sujeto un casete de expresión que codifica un promotor polIII unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un miARN. En ciertas realizaciones de la divulgación, el miARN comprende un saliente 5' o 3' de 2 o 3 nucleótidos. En ciertas realizaciones de la divulgación, el miARN comprende un saliente 3' de 2 nucleótidos. En ciertas realizaciones de la divulgación, el miARN es un miARN artificial.

25 La presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto con una enfermedad de Huntington administrando al sujeto un ácido nucleico, un casete de expresión, un vector, o una composición como se describe en el presente documento para tratar la enfermedad de Huntington.

30 La presente divulgación proporciona un método para suprimir la acumulación de huntingtina en una célula mediante la introducción de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, un ácido ribonucleico (ARN)) descrito en el presente documento en la célula en una cantidad suficiente para suprimir la acumulación de huntingtina en la célula. En ciertas realizaciones de la divulgación, la acumulación de huntingtina se suprime en al menos un 10 %. En ciertas realizaciones de la divulgación, la acumulación de huntingtina se suprime en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o un 99 %. En ciertas realizaciones de la divulgación, la supresión de la acumulación de la proteína es en una cantidad suficiente para causar un efecto terapéutico, por ejemplo, para reducir la formación de enredos.

40 La presente divulgación proporciona un método para prevenir los efectos citotóxicos de la huntingtina mutante en una célula mediante la introducción de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, un ácido ribonucleico (ARN)) descritas en el presente documento, en la célula en una cantidad suficiente para suprimir la acumulación de huntingtina. En ciertas realizaciones de la divulgación, las moléculas de ácido nucleico previenen los efectos citotóxicos de la huntingtina, por ejemplo, en una célula neuronal.

45 La presente divulgación proporciona un método para inhibir la expresión de un gen de huntingtina en una célula mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un ácido ribonucleico (ARN)) descrita en el presente documento, en la célula en una cantidad suficiente para inhibir la expresión de la huntingtina, y en el que el ARN inhibe la expresión del gen de la huntingtina. En ciertas realizaciones de la divulgación, la huntingtina se inhibe al menos en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o un 99 %.

50 La presente divulgación proporciona un método para inhibir la expresión de un gen de huntingtina en un mamífero (por ejemplo, un mamífero humano o no humano) (a) proporcionando un mamífero que contiene una célula neuronal, en el que la célula neuronal contiene el gen de huntingtina, y la célula neuronal es susceptible a la interferencia de ARN, y el gen de huntingtina se expresa en la célula neuronal; (b) poniendo en contacto el mamífero con un ácido ribonucleico (ARN) o un vector descrito en el presente documento, inhibiendo así la expresión del gen de huntingtina.

55 En ciertas realizaciones de la divulgación, la acumulación de huntingtina se suprime en al menos un 10 %. En ciertas realizaciones de la divulgación, la huntingtina se inhibe en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o un 99 %. En ciertas realizaciones de la divulgación, La célula se localiza *in vivo* en un mamífero.

60 La presente divulgación proporciona un vector viral que comprende un promotor y una lanzadera de micro ARN (miARN) que contiene un ARNsi incrustado específico para una secuencia diana. En ciertas realizaciones de la divulgación, el promotor es un promotor inducible. En ciertas realizaciones de la divulgación, el vector es un vector adenoviral, lentiviral, viral adenoasociado (AAV), poliovirus, VHS, o un vector viral murino basado en Maloney. En ciertas realizaciones de la divulgación, la secuencia dirigida es una secuencia asociada con la enfermedad de Huntington. La secuencia diana, en ciertas realizaciones de la divulgación, es una secuencia que codifica la huntingtina.

65

La presente divulgación proporciona un método para prevenir los efectos citotóxicos de una enfermedad neurodegenerativa en un mamífero que lo necesite, introduciendo el vector que codifica un miARN descrito en el presente documento en una célula en una cantidad suficiente para suprimir la acumulación de una proteína asociada con la enfermedad de Huntington, y en el que el ARN previene los efectos citotóxicos de la enfermedad de Huntington (también denominada EH, y la proteína involucrada es la huntingtina, también denominada htt).

La presente divulgación también proporciona un método para inhibir la expresión de una proteína asociada con la enfermedad de Huntington en un mamífero que lo necesite, introduciendo el vector que codifica un miARN descrito en el presente documento en una célula en una cantidad suficiente para inhibir la expresión de la proteína huntingtina, en el que el ARN inhibe la expresión de la proteína huntingtina. La proteína huntingtina se inhibe en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o un 99 %.

Esta divulgación se refiere a compuestos, composiciones y métodos útiles para modular la expresión génica de la enfermedad de Huntington utilizando moléculas de ácido nucleico de interferencia cortos (ARNsi). Esta divulgación también se refiere a compuestos, composiciones y métodos útiles para modular la expresión y la actividad de otros genes involucrados en las vías de la expresión génica de la EH y/o la actividad mediante la interferencia del ARN (ARNi) utilizando moléculas pequeñas de ácido nucleico. En particular, la presente divulgación presenta moléculas pequeñas de ácido nucleico, tal como moléculas de ácido nucleico interferente corto (ARNsi), ARN interferente corto (ARNsi), ARN bicatenario (ARNds), micro-ARN (miARN), y ARN de horquilla corta (ARNsh), y métodos utilizados para modular la expresión de los genes de EH. Una molécula de ARNsi de la presente divulgación puede, por ejemplo, sintetizarse químicamente, expresarse a partir de un vector, o sintetizarse enzimáticamente.

Como se usa en el presente documento, cuando una reivindicación indica un ARN "correspondiente a" se refiere al ARN que tiene la misma secuencia que el ADN, excepto que el uracilo está sustituido por timina.

La presente divulgación proporciona además un método para silenciar sustancialmente un gen diana de interés o un alelo dirigido para el gen de interés con el fin de proporcionar un efecto terapéutico. Como se usa en el presente documento, el término "silenciar sustancialmente" o "silenciado sustancialmente" se refiere a disminuir, reducir, o inhibir la expresión del gen diana o alelo diana en al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % al 100 %. Como se usa en el presente documento, el término "efecto terapéutico" se refiere a un cambio en las anomalías asociadas de la patología, incluyendo deficiencias patológicas y de comportamiento; un cambio en el tiempo hasta la progresión de la patología; una reducción, disminución o alteración de un síntoma de la enfermedad; o una mejora en la calidad de vida de la persona afectada con la enfermedad. Los efectos terapéuticos pueden medirse cuantitativamente por un médico o cualitativamente por un paciente afectado por la patología dirigida por el ARNsi. En ciertas realizaciones en las que tanto el alelo mutante como el de tipo silvestre están sustancialmente silenciados, el término efecto terapéutico define una condición en la que el silenciamiento de la expresión del alelo de tipo silvestre no tiene un efecto perjudicial o dañino en las funciones normales, de tal forma que el paciente no tendría un efecto terapéutico.

En una realización, la divulgación presenta un método para tratar o prevenir la enfermedad de Huntington en un sujeto u organismo que comprende poner en contacto al sujeto u organismo con un ARNsi de la divulgación en condiciones adecuadas para modular la expresión del gen de EH en el sujeto u organismo, por lo que el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Huntington se puede lograr. En una realización de la divulgación, la diana del gen de EH comprende tanto el alelo de EH (por ejemplo, un alelo que comprende una expansión de repetición de trinucleótido (CAG) como un alelo de tipo silvestre). La molécula de ARNsi de la divulgación puede expresarse a partir de vectores como se describe en el presente documento o se sabe de otro modo en la técnica que se dirige a los tejidos o células apropiadas en el sujeto u organismo.

En una realización, la divulgación presenta un método para tratar o prevenir la enfermedad de Huntington en un sujeto u organismo que comprende, poner en contacto al sujeto u organismo con una molécula de ARNsi de la invención a través de administración local a tejidos o células relevantes, tal como células y tejidos del cerebro (por ejemplo, ganglios basales, cuerpo estriado o corteza), por ejemplo, mediante la administración de vectores o casetes de expresión de la invención que proporcionan moléculas de ARNsi de la invención a las células relevantes (por ejemplo, ganglios basales, cuerpo estriado o corteza). En una realización, el ARNsi, vector, o casete de expresión, se administra al sujeto u organismo mediante administración estereotáctica o mejorada por convección al cerebro. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 5.720.720 proporciona métodos y dispositivos útiles para la administración estereotáctica y mejorada por convección de reactivos al cerebro. Dichos métodos y dispositivos se pueden usar fácilmente para la administración de ARNsi, vectores, o casetes de expresión de la invención a un sujeto u organismo. Las Solicitudes de Patente de EE.UU. N.º 2002/0141980; 2002/0114780; y 2002/0187127, proporcionan en su totalidad métodos y dispositivos útiles para la administración estereotáctica y mejorada por convección de reactivos que pueden adaptarse fácilmente para la administración de ARNsi, vectores, o casetes de expresión de la invención a un sujeto u organismo. Dispositivos particulares que pueden ser útiles en la administración de ARNsi, vectores, o casetes de expresión de la invención a un sujeto u organismo se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de EE.UU. 2004/0162255. La molécula de ARNsi de la divulgación puede expresarse a partir de vectores como se describe en el presente documento o se sabe de otro modo en la técnica que se dirige a los tejidos o células apropiadas en el sujeto u organismo.

Los métodos de administración de vectores virales incluyen, pero sin limitación, rutas intraarterial, intramuscular, intravenosa, intranasal y oral. Generalmente, los viriones de AAV pueden introducirse en células del SNC utilizando técnicas de transducción *in vivo* o *in vitro*. Si se transduce *in vitro*, la célula receptora deseada se eliminará del sujeto, se transducirá con viriones de AAV y reintroducirá en el sujeto. Como alternativa, se pueden usar células singénicas o xenogénicas cuando estas células no generen una respuesta inmunológica inapropiada en el sujeto.

Se han descrito métodos adecuados para la administración y la introducción de células transducidas en un sujeto. Por ejemplo, las células pueden transducirse *in vitro* combinando viriones de AAV recombinantes con células del SNC, por ejemplo, en medios apropiados, y el cribado de estas células que albergan el ADN de interés puede cribarse utilizando técnicas convencionales tales como transferencias Southern y/o PCR, o mediante el uso de marcadores seleccionables. Las células transducidas pueden formularse entonces en composiciones farmacéuticas, descritas más detalladamente a continuación, y la composición puede introducirse en el sujeto mediante diversas técnicas, tal como por injerto, inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal.

En una realización, para la administración *in vivo*, los viriones de AAV se formulan en composiciones farmacéuticas y generalmente se administrarán por vía parenteral, por ejemplo, por inyección intramuscular directamente en el músculo esquelético o cardíaco, o por inyección en el SNC.

En una realización, los vectores virales de la invención se administran al SNC a través de sistemas de administración mejorada por convección (CED) que pueden administrar de manera eficiente vectores virales, por ejemplo, AAV, en grandes regiones del cerebro de un sujeto (por ejemplo, el cuerpo estriado y/o la corteza). Como se describe en detalle y se ilustra a continuación, estos métodos son adecuados para una diversidad de vectores virales, por ejemplo, vectores de AAV que portan genes terapéuticos (por ejemplo, ARNsi).

Cualquier dispositivo de administración mejorado por convección puede ser apropiado para la administración de vectores virales. En una realización, el dispositivo es una bomba osmótica o una bomba de infusión. Tanto las bombas osmóticas como las de infusión están disponibles comercialmente en una diversidad de proveedores, por ejemplo, Alzet Corporation, Hamilton Corporation, Aiza, Inc., Palo Alto, Calif.). Típicamente, un vector viral se administra a través de dispositivos CED de la siguiente manera. Un catéter, una cánula u otro dispositivo de inyección se inserta en el tejido del SNC en el sujeto elegido. En vista de las enseñanzas en el presente documento, un experto en la técnica podría determinar fácilmente qué área general del SNC es un objetivo apropiado. Por ejemplo, cuando se administra un vector de AAV que codifica un gen terapéutico para tratar la EH, el cuerpo estriado es un área adecuada del cerebro a la que dirigirse. Están disponibles mapas estereotácticos y dispositivos de posicionamiento, por ejemplo, en ASI Instruments, Warren, Mich. El posicionamiento también se puede realizar mediante el uso de mapas anatómicos obtenidos por TC y/o imagen por RM del cerebro del sujeto para ayudar a guiar el dispositivo de inyección hacia el objetivo elegido. Además, debido a que los métodos descritos en el presente documento se pueden poner en práctica de tal forma que áreas relativamente grandes del cerebro capten los vectores virales, se necesitan menos cánulas de infusión. Dado que las complicaciones quirúrgicas están relacionadas con el número de penetraciones, los métodos descritos en el presente también sirven para reducir los efectos secundarios observados con las técnicas de administración convencionales.

En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenderán material genético suficiente para producir una cantidad terapéuticamente eficaz del ARNsi de interés, es decir, una cantidad suficiente para reducir o mejorar los síntomas de la patología en cuestión o una cantidad suficiente para conferir el beneficio deseado. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos excipientes incluyen cualquier agente farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición, y que se pueda administrar sin demasiada toxicidad. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, sorbitol, Tween80, y líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Sales farmacéuticamente aceptables pueden incluirse en los mismos, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Además, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH y similares, en dichos vehículos. Un análisis exhaustivo de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Como es evidente para los expertos en la técnica en vista de las enseñanzas de esta memoria descriptiva, se puede determinar empíricamente una cantidad eficaz de vector viral que debe añadirse. La administración puede realizarse en una dosis, continua o intermitentemente a lo largo del tratamiento. Los métodos para determinar los medios y dosificaciones de administración más eficaces se conocen bien por los expertos en la técnica y variarán con el vector viral, la composición de la terapia, las células diana, y el sujeto a tratar. Las administraciones únicas y múltiples pueden realizarse con el nivel de dosis y el patrón a seleccionar por el tratamiento médico.

Debe entenderse que más de un transgén podría expresarse por el vector viral administrado. Como alternativa, también pueden administrarse vectores separados, cada uno expresando uno o más transgenes diferentes, al SNC como se describe en el presente documento. Además, también se pretende que los vectores virales administrados por los métodos de la presente invención se combinen con otras composiciones y terapias adecuadas.

La presente invención proporciona además un miARN o ARNsh, un casete de expresión y/o un vector como se describe en el presente documento para su uso en un tratamiento médico o diagnóstico.

La presente divulgación proporciona el uso de un miARN o ARNsh, un casete de expresión y/o un vector como se describe en el presente documento para preparar un medicamento útil para tratar una afección susceptible de ARNi en un animal, por ejemplo, útil para el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

La presente invención también proporciona un ácido nucleico, casete de expresión, o vector de la invención para su uso en terapia.

La presente invención también proporciona un ácido nucleico, casete de expresión, o vector de la invención para el tratamiento, por ejemplo, para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de, la enfermedad de Huntington.

La presente divulgación también proporciona una composición divulgada en el presente documento para su uso en terapia. La presente divulgación también proporciona una composición divulgada en el presente documento para tratar, por ejemplo, para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de, la enfermedad de Huntington.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. El miARN artificial, miSCR, causa neurotoxicidad en el cerebro de ratón. A ratones de tipo silvestre se les inyectó en el cuerpo estriado AAV-GFP (expresa solamente GFP) o AAV-miSCR-GFP (expresa tanto miARN artificial como GFP), y se realizaron análisis histológicos en los cerebros recogidos a los 6 meses después del tratamiento. Se muestran fotomicrográficas que representan la autofluorescencia de GFP y la tinción inmunohistoquímica de la microglía Iba1 positiva. Barras de escala = 200 y 50 μ m para imágenes 10X y 40X respectivamente.

Figura 2. Visión general de la inespecificidad relacionada con la semilla: Mecanismo y probabilidades. (a) Diagrama que representa la expresión y el procesamiento de un miARN artificial para producir el dúplex de ARNsi maduro. La hembra guía antisentido se carga en RISC y puede dirigir el silenciamiento específico (intencionado) y el silenciamiento inespecífico (no intencionado). (b) Dibujo que resalta la relación entre las frecuencias de los sitios de unión al complemento de la semilla en el 3'-UTRome y el potencial de inespecificidad para los ARNsi. (c) Se determinó el número de 3'-UTR de ARNm humanas que contiene un hexámero dado para los 4096 hexámeros posibles y se muestra una distribución agrupada. También se presentan las probabilidades de que los ARNsi seleccionados al azar que se dirigen a la secuencia codificante humana (CDS) contengan complementos de semilla en un rango determinado (sombreado de color blanco y gris). Por ejemplo, solo hay un 10 % de probabilidad de que un ARNsi seleccionado al azar contenga un complemento de semilla para un hexámero presente en -1500 3'-UTR humanas o menos. Nota: Las secuencias probadas en este manuscrito se colocan por encima de sus respectivos rangos.

Figura 3. Selección y cribado de los ARNsi de direccionamiento a htt con bajos potenciales de inespecificidad. (a) Esquema que describe la selección de los ARNsi de semilla "safe" con un sesgo de hebra adecuado. (b) Los plásmidos que expresan miARN artificiales, que albergan las secuencias de ARNsi indicadas, se transfectaron en células HEK293 y se realizó un análisis de QPCR 24 h más tarde para medir los niveles de ARNm de htt endógeno. U6 (solamente promotor) y HD2.4 (una secuencia de ARNi de htt previamente publicada) sirven como controles negativo y positivo, respectivamente. Los resultados se muestran como media $\pm$ SEM (N = 6, * indica $P < 0,001$, con respecto a U6).

Figura 4. Evaluación de los datos de micromatrices para el silenciamiento de htt y la inespecificidad. Las células HEK293 se transfectaron con plásmidos de expresión de miARN artificial impulsados por el promotor U6 en solitario o por U6 ($n = 4$ para cada tratamiento), y el ARN se recogió 72 h más tarde para el análisis de micromatrices. Se realizó un ANOVA bidireccional para detectar genes expresados diferencialmente entre los grupos de tratamiento. (a) Los niveles de ARNm de htt determinados por micromatriz (barras de color gris) fueron consistentes con los medidos por QPCR (barras de color negro) utilizando las mismas muestras de ARN, (b) La agrupación jerárquica y los mapas de calor se generaron utilizando genes expresados diferencialmente ($P < 0,0001$, 825 genes) para visualizar las relaciones entre los grupos de tratamiento. Curiosamente, todas las secuencias semilla "safe" están más relacionadas con U6 que las secuencias restantes que se predice que tienen mayores potenciales de inespecificidad (límite marcado por una línea de color blanco). (c) La agrupación jerárquica y los mapas de calor se generaron utilizando genes expresados diferencialmente ($P < 0,01$, 992 genes) para visualizar las relaciones entre los grupos de tratamiento. El impacto de la secuencia semilla en la expresión génica se puede apreciar mediante el agrupamiento de 8.2 y 8.2mis que comparten la misma semilla. De forma destacable, las secuencias de baja inespecificidad predichas (Safe, HDS1 y HDS2) son más similares a U6, y tienen firmas de inespecificidad más pequeñas en comparación con 2.4 y 8.2. Se evaluó la inespecificidad relacionada con la semilla mediante análisis de distribución acumulativa (d) y descubrimiento de motivos (e). (d) Las gráficas de distribución acumulativa para los valores de expresión génica se muestran para los transcritos que contienen (1 sitio o más de 2+ sitios) o que carecen (valor inicial) de los sitios de unión al complemento de la semilla en 3'-UTR para la secuencia y hebra indicadas. Un desfase a la izquierda indica una mayor probabilidad de regulación descendente. AS = antisentido, S = sentido. Se muestran los valores P de la prueba KS; N.S. = sin significancia estadística ($P > 0,1$). (e) Los análisis de descubrimiento de motivos identificaron un enriquecimiento de los sitios de unión al complemento de la semilla en las 3'-UTR de genes regulados negativamente ($>1,1$ veces) únicos para cada tratamiento. Aquí se muestran los

ejemplos de 8.2-124a y Terror; los datos similares para las secuencias restantes admiten que cada uno media la inespecificidad relacionada con la semilla detectable en cierta medida (véase la Figura 6 a continuación).

Figura 5. Eficacia del silenciamiento y seguridad de las secuencias HDS en el cerebro de ratón. A ratones de tipo silvestre se les inyectaron en el cuerpo estriado virus de AAV que expresaban conjuntamente miARN artificiales y GFP. (a) 3 semanas después de la inyección, se recogieron cuerpos estriados positivos para GFP y se realizó un análisis de QPCR para medir los niveles de ARNm de Htt de ratón endógenos. Los resultados se muestran como media $\pm$ SEM ($n \geq 3$, * indica $P = 0,001$, con respecto a los cuerpos estriados no inyectados). (b) Los cerebros de cohortes adicionales de ratones inyectados se recogieron a los 6 meses posteriores a la inyección y se realizaron análisis histológicos para evaluar la neurotoxicidad. Se muestran fotomicrografías que representan la autofluorescencia de GFP y la tinción inmunohistoquímica de la microglía Ibal positiva. Barras de escala = 200 y 50 μ m para imágenes 10X y 40X respectivamente.

Figura 6. Evaluación de los datos de micromatrices para determinar la inespecificidad. Se evaluó la inespecificidad relacionada con la semilla mediante análisis de distribución acumulativa (a) y descubrimiento de motivos (b). (a) Las gráficas de distribución acumulativa para los valores de expresión génica se muestran para los transcritos que contienen (1 sitio o más de 2+ sitios) o que carecen (valor inicial) de los sitios de unión al complemento de la semilla en 3'-UTR para la secuencia y hebra indicadas. Un desfase a la izquierda indica una mayor probabilidad de regulación descendente. AS = antisentido. Se muestran los valores P de la prueba KS; N.S. = sin significancia estadística ($P > 0,1$). (b) Los análisis de descubrimiento de motivos identificaron un enriquecimiento de los sitios de unión al complemento de la semilla en las 3'-UTR de genes regulados negativamente ($>1,1$ veces) únicos para cada tratamiento.

Figura 7. Secuencias de longitud completa y estructuras para pri-miHDS.1.

Figura 8. Secuencias de longitud completa y estructuras para pri-miHDS.2.

Descripción detallada de la invención

La interferencia de ARN (ARNi) es un proceso de regulación génica mediado por pequeños ARNs. El ARNi se usa como una herramienta biológica común para estudiar la función génica, y está bajo investigación como un producto terapéutico para tratar diversas enfermedades. La administración o expresión de ARNi puede realizarse a través de la administración de ARNs exógenos (silenciamiento génico transitorio) o a través de la administración de vectores que expresan ARN de tallo-bucle (silenciamiento génico persistente). La especificidad absoluta del ARNi es cuestionable. Los problemas que deben abordarse incluyen las respuestas celulares al ARNs (IFN- β , PKR, OAS1) y los efectos inespecíficos debido a la saturación de la maquinaria del ARNi o a través de la complementariedad parcial con ARNm no intencionados. Existe una necesidad constante de optimización de los vectores de ARNi y desarrollo estrategias de expresión específicas de tejido y reguladas.

El uso de ARNi como producto terapéutico depende de la elucidación de varios factores, incluyendo i) la administración y la persistencia de la construcción de ARNi para el silenciamiento eficaz de la secuencia del gen diana; ii) el diseño del ARNs para lograr una atenuación o supresión génica eficaz de la secuencia diana, y iii) el sistema óptimo de expresión de ARNs (ARNsh o miARN) para la administración del ARNs terapéutico. Si bien muchos estudios han evaluado el uso de ARNi administrados como estructuras de oligonucleótidos sintetizadas químicamente, para muchas afecciones clínicas y patologías, tal como la enfermedad de Huntington, se cree que para lograr un beneficio terapéutico es necesario un alto nivel de expresión a largo plazo y persistente del ARNs terapéutico como se consigue mediante la producción endógena del ARNs expresado. Hasta ahora, las estrategias basadas en ARNsh y miARN artificial se han comparado con resultados contradictorios. La utilidad terapéutica del ARNi expresado no está resuelta debido a problemas de seguridad como resultado de la toxicidad inespecífica que surge de las respuestas celulares al ARNs (IFN- β , PKR, OAS1), la saturación de la maquinaria de ARNi o silenciamiento de dianas inespecíficas a través de la complementariedad parcial con los ARNm no intencionados. Por lo tanto, existe una necesidad continua de optimizar los vectores de ARNi expresados que sean seguros y eficaces.

Los ARNsh están compuestos por estructuras de tallo-bucle que están diseñadas para contener una región flanqueante 5', segmentos de la región de ARNs, una región de bucle, una región de ARNs 3' y una región flanqueante 3'. La mayoría de las estrategias de expresión de ARNi han utilizado ARN de horquilla corta (ARNsh) impulsados por promotores fuertes basados en polIII. Muchos ARNsh han demostrado una atenuación eficaz de las secuencias diana *in vitro*, así como *in vivo*, sin embargo, también se encontró que algunos ARNsh que demostraron una atenuación eficaz del gen diana tenían toxicidad *in vivo*. Un enfoque alternativo recientemente descubierto es el uso de miARN artificiales (andamios de pri-miARN que transportan secuencias de ARNs) como vectores de ARNi. Los miARN artificiales se asemejan más naturalmente a los sustratos de ARNi endógenos y son más susceptibles a la transcripción de Pol-II (por ejemplo, permitiendo la expresión específica de tejido de ARNi) y estrategias policistrónicas (por ejemplo, permitiendo la administración de múltiples secuencias de ARNs). Hasta la fecha, la eficacia de los sistemas de vectores basados en miARN en comparación con el ARNsh ha sido confundida por resultados contradictorios. De manera importante, la cuestión de la toxicidad inespecífica producida por los dos sistemas no se ha evaluado.

Una consideración importante para el desarrollo del ARNs expresado es el concepto de "dosificar" la célula huésped con la construcción de ARNs expresada. "Dosificación" para un ARNs expresado en el contexto de la presente invención se refiere y puede depender del vehículo de administración (por ejemplo, viral o no viral), las cantidades relativas o la concentración del vehículo de administración, y la fuerza y especificidad del promotor utilizado para

impulsar la expresión de la secuencia de ARNsi.

Los inventores han desarrollado vectores lanzadera de miARN artificiales que incorporan las secuencias de tallo-bucle contenidas en los ARNsh dentro de las modificaciones de una secuencia de microARN 30 humana de origen natural o la secuencia de mi30 que sirve para transportar estas secuencias de ARN interferente pequeño (ARNsi). Véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 2008/150897.

Lanzaderas de microARN para ARNi

Los miARN son ARN celulares pequeños (~22 nt) que se procesan a partir de transcritos precursoras de tallo-bucle. Los tallos-bucles de miARN conocidos pueden modificarse para que contengan secuencias de ARNi específicas para genes de interés. Las moléculas de miARN pueden ser preferibles a las moléculas de ARNsh porque los miARN se expresan de manera endógena. Por lo tanto, Es poco probable que las moléculas de miARN induzcan vías de interferón de respuesta a ARNd, se procesan más eficientemente que los ARNsh, y se ha demostrado que silencian un 80 % más eficazmente.

Además, las funciones del promotor son diferentes para las moléculas de miARN en comparación con las moléculas de ARNsh. La expresión inducible específica de tejido de los ARNsh implica el truncamiento de los promotores polII al sitio de inicio de la transcripción. Por el contrario, los miARN pueden expresarse desde cualquier promotor polII porque los sitios de inicio y detención de la transcripción pueden ser relativamente arbitrarios.

Tratamiento de la enfermedad de Huntington

Las enfermedades de expansión de poliglutamina dominantes, que incluyen la ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1) y la enfermedad de Huntington (EH), son trastornos neurodegenerativos progresivos y no tratables. En modelos de ratón inducibles de EH, la represión de la expresión de alelo mutante mejora los fenotipos de la enfermedad. Por lo tanto, las terapias diseñadas para inhibir la expresión génica de la enfermedad serían beneficiosas. La presente divulgación proporciona métodos para usar ARNi *in vivo* para tratar la enfermedad de Huntington. "Tratar", como se usa en el presente documento, se refiere a mejorar al menos un síntoma de, curar y/o prevenir el desarrollo de una enfermedad o afección.

En ciertas realizaciones de la invención, las moléculas de ARNi se emplean para inhibir la expresión de un gen diana. Por "inhibir la expresión" significa reducir, disminuir o suprimir la expresión de un gen diana. La expresión de un gen diana puede inhibirse a través del "silenciamiento génico". El silenciamiento de genes se refiere a la supresión de la expresión génica, por ejemplo, un transgén, gen heterólogo y/o expresión génica endógena, que puede mediar a través de procesos que afectan a la transcripción y/o a través de procesos que afectan a los mecanismos postranscripcionales. En algunas realizaciones, el silenciamiento génico se produce cuando una molécula de ARNi inicia la inhibición o degradación del ARNm transcrito de un gen de interés de una manera específica de secuencia a través de la interferencia de ARN, impidiendo así la traducción del producto del gen.

La referencia a los ARNsi en el presente documento pretende incluir los ARNsh y otros ARN pequeños que pueden, o son capaces de, modular la expresión de un gen diana, por ejemplo, el gen de la EH, por ejemplo, a través de la interferencia de ARN. Dichos ARN pequeños incluyen, sin limitación, ARNsh y microARN (miARN).

En el presente documento se divulga una estrategia que da como resultado un silenciamiento sustancial de genes dirigidos a través de ARNi. El uso de esta estrategia da como resultado una disminución marcada de la expresión *in vitro* e *in vivo* de genes dirigidos. Esta estrategia es útil para reducir la expresión de genes dirigidos para modelar procesos biológicos o para proporcionar terapia para enfermedades humanas. Por ejemplo, esta estrategia se puede aplicar a la enfermedad de Huntington. Como se usa en el presente documento, el término "silenciamiento sustancial" significa que el ARNm del gen dirigido se inhibe y/o se degrada por la presencia del ARNsi introducido, de tal manera que la expresión del gen dirigido se reduce en aproximadamente el 10 % al 100 % en comparación con el nivel de expresión observado cuando el ARNsi no está presente. Generalmente, cuando un gen está sustancialmente silenciado, tendrá al menos un 40 %, 50 %, 60 %, al 70 %, por ejemplo, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, al 79 %, generalmente al menos un 80 %, por ejemplo, un 81 %-84 %, al menos un 85 %, por ejemplo, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso un 100 % de expresión de reducción en comparación con cuando el ARNsi no está presente. Como se usa en el presente documento, el término "actividad sustancialmente normal" significa el nivel de expresión de un gen cuando un ARNsi no se ha introducido en una célula.

La enfermedad de Huntington (EH) es un fuerte candidato para la terapia basada en ARNsi. La EH es causada por expansiones repetidas de CAG que codifican poliQ en la proteína de la enfermedad. La expansión de PolyQ confiere una propiedad tóxica dominante sobre la proteína mutante que se asocia con la acumulación aberrante de la proteína de la enfermedad en las neuronas. La EH es progresiva, en última instancia, un trastorno mortal que suele comenzar en la edad adulta. La expansión del dominio de repetición CAG/polyQ confiere a la proteína codificada una propiedad tóxica dominante. Por lo tanto, como estrategia terapéutica, los esfuerzos para reducir la expresión del producto génico mutante antes de la muerte celular podrían ser altamente beneficiosos para los pacientes.

Moléculas de interferencia de ARN (ARNi)

Una "interferencia de ARN", "ARNi", "ARN interferente pequeño" o "ARN interferente corto" o "ARNsi" o "ARN de horquilla corta" o "molécula de ARNsh", o "miARN" es un dúplex de ARN de nucleótidos que se dirige a una secuencia de ácido nucleico de interés, por ejemplo, huntingtina (htt). Como se usa en el presente documento, el término "ARNsi" es un término genérico que abarca el subconjunto de ARNsh y miARN. Un "dúplex de ARN" se refiere a la estructura formada por el emparejamiento complementario entre dos regiones de una molécula de ARN. ARNsi está "dirigido" a un gen ya que la secuencia de nucleótidos de la porción dúplex del ARNsi es complementaria a una secuencia de nucleótidos del gen dirigido. En ciertas realizaciones, los ARNsi están dirigidos a la secuencia que codifica ataxina-1 o huntingtina. En algunas realizaciones, la longitud del dúplex de los ARNsi es inferior a 30 pares de bases. En algunas realizaciones, el dúplex puede tener 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 pares de bases de longitud. En algunas realizaciones, la longitud del dúplex tiene de 19 a 25 pares de bases de longitud. En cierta realización, la longitud del dúplex tiene de 19 o 21 pares de bases de longitud. La porción dúplex de ARN del ARNsi puede ser parte de una estructura de horquilla. Además de la porción dúplex, la estructura de horquilla puede contener una porción de bucle posicionada entre las dos secuencias que forman el dúplex. El bucle puede variar en longitud. En algunas realizaciones, el bucle tiene 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, el bucle tiene 18 nucleótidos de longitud. La estructura de horquilla también puede contener porciones salientes 3' y/o 5'. En algunas realizaciones, el saliente es un saliente 3' y/o 5' de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de longitud.

La unidad transcripcional de un "ARNsh" está compuesta por secuencias sentido y antisentido conectadas por un bucle de nucleótidos no emparejados. Los ARNsh se exportan desde el núcleo por la Exportina-5, y una vez en el citoplasma, se procesan por Dicer para generar ARNsi funcionales. Los tallos-bucles de "miARN" están compuestos por secuencias sentido y antisentido conectadas por un bucle de nucleótidos no emparejados expresados típicamente como parte de transcritos primarios más grandes (pri-miARN), que se eliminan por el complejo Drosha-DGCR8 que genera intermedios conocidos como pre-miARN, que después se exportan desde el núcleo por la Exportina-5, y una vez en el citoplasma, se procesan por Dicer para generar ARNsi funcionales. "miARN artificial" o un "vector lanzadera de miARN artificial" como se usa en el presente documento de manera intercambiable, se refiere a un transcrito de miARN primario que ha tenido una región de tallo-bucle dúplex (al menos aproximadamente 9-20 nucleótidos) que se eliminó a través de un procesamiento Drosha y Dicer reemplazado con las secuencias de ARNsi para el gen diana manteniendo al mismo tiempo los elementos estructurales dentro del tallo-bucle necesario para un procesamiento Drosha eficaz. El término "artificial" surge del hecho de que las secuencias flanqueantes (~35 nucleótidos aguas arriba y ~40 nucleótidos aguas abajo) surgen de sitios de enzimas de restricción dentro del sitio de clonación múltiple del ARNsi. Como se usa en el presente documento, el término "miARN" incluye tanto las secuencias de miARN de origen natural como los vectores lanzadera de miARN generados artificialmente.

El ARNsi puede codificarse por una secuencia de ácido nucleico, y la secuencia de ácido nucleico también puede incluir un promotor. La secuencia de ácido nucleico también puede incluir una señal de poliadenilación. En algunas realizaciones, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación mínima sintética o una secuencia de seis Ts.

"Toxicidad inespecífica" se refiere a cambios fenotípicos perjudiciales, no deseados o no intencionados de una célula huésped que expresa o contiene un ARNsi. La toxicidad inespecífica puede dar como resultado la pérdida de la función deseable, ganancia de función no deseable, o incluso muerte a nivel celular o del organismo. La toxicidad inespecífica puede producirse inmediatamente tras la expresión del ARNsi, o puede producirse gradualmente con el tiempo. La toxicidad inespecífica puede producirse como resultado directo de la expresión de ARNsi o puede producirse como resultado de la inducción de la respuesta inmóvilógica del huésped a la célula que expresa el ARNsi. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, se postula que la toxicidad inespecífica se debe a niveles altos o exceso de sustratos de ARNi dentro de la célula. Estos sustratos de ARNi en exceso o sobreexpresados, incluyendo, sin limitación, sustratos pre o pri ARNi, así como los ARN antisentido maduros en exceso, puede competir por la maquinaria de ARNi endógeno, interrumpiendo así la biogénesis y la función del miARN natural. La toxicidad inespecífica también puede surgir de una mayor probabilidad de silenciamiento de los ARNm no intencionados (es decir, inespecíficos) debido a la complementariedad parcial de la secuencia. La toxicidad inespecífica también puede producirse ocurrir por una desviación incorrecta de la hebra de una región no guía, de manera que hay una carga preferencial de la región no guía sobre la región dirigida o guía del ARNi. La toxicidad inespecífica también puede surgir de la estimulación de las respuestas celulares a los ARNs que incluyen el ARNs (IFN- β , PKR, OAS1). "Disminución de la toxicidad inespecífica" se refiere a una disminución, reducción, abrogación o atenuación de la toxicidad inespecífica, de tal forma que el efecto terapéutico sea más beneficioso para el huésped que la toxicidad que es limitante o perjudicial, según se mide por una duración o calidad de vida mejorada o un signo o síntoma mejorado de una enfermedad o afección a la que se dirige el ARNsi. "Toxicidad inespecífica limitada" o "baja toxicidad inespecífica" se utiliza para referirse a cambios fenotípicos no deseados no intencionados en una célula u organismo, ya sean detectables o no, lo que no excluye, supera o limita el beneficio terapéutico para el huésped tratado con el ARNsi, y puede considerarse un "efecto secundario" de la terapia. La toxicidad inespecífica disminuida o limitada puede determinarse o inferirse comparando el análisis *in vitro* tal como transferencia Northern o QPCR, para determinar los niveles de sustratos de ARNsi o los efectos *in vivo* en comparación con un vector de ARNsh equivalente con respecto al vector lanzadera de miARN de la presente invención.

"Atenuación", "tecnología de atenuación" se refiere a una técnica de silenciamiento génico en la que la expresión de un gen diana se reduce en comparación con la expresión génica antes de la introducción del ARNsi, lo que puede conducir a la inhibición de la producción del producto del gen diana. El término "reducido" se usa en el presente documento para indicar que la expresión del gen diana se reduce en un 1-100 %. En otras palabras, la cantidad de ARN disponible para la traducción en un polipéptido o proteína se minimiza. Por ejemplo, la cantidad de proteína puede reducirse en un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, o un 99 %. En algunas realizaciones, la expresión se reduce en aproximadamente un 90 % (es decir, solo aproximadamente un 10 % de la cantidad de proteína se observa en una célula en comparación con una célula en la que no se han administrado moléculas de ARNsi). La atenuación de la expresión génica puede dirigirse mediante el uso de ARNs o ARNsi.

"Interferencia de ARN (ARNi)" es el proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia iniciado por ARNsi. Durante la ARNi, el ARNsi induce la degradación del ARNm diana con la consiguiente inhibición específica de secuencia de la expresión génica.

De acuerdo con un método de la presente divulgación, la expresión de la huntingtina se puede modificar a través de ARNi. Por ejemplo, la acumulación de huntingtina se puede suprimir en una célula. El término "suprimir" se refiere a la disminución, reducción o eliminación en el número o cantidad de transcritos presentes en una célula particular. Por ejemplo, la acumulación de ARNm que codifica la huntingtina se puede suprimir en una célula mediante la interferencia de ARN (ARNi), por ejemplo, el gen se silencia por ARN bicatenario (ARNds) específico de secuencia, que también se llama ARN interferente corto (ARNsi). Estos ARNsi pueden ser dos moléculas de ARN separadas que se han hibridado entre sí, o pueden ser una única horquilla en la que dos porciones de una molécula de ARN se hibridan juntas para formar un dúplex.

Una proteína mutante se refiere a la proteína codificada por un gen que tiene una mutación, por ejemplo, una mutación con cambio de sentido o sin sentido en huntingtina. Una huntingtina mutante puede ser causante de la enfermedad, *es decir*, puede conducir a una enfermedad asociada con la presencia de huntingtina en un animal que tenga uno o dos alelos mutantes.

El término "gen" se usa ampliamente para referirse a cualquier segmento de ácido nucleico asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen secuencias codificantes y/o las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Por ejemplo, "gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm, ARN funcional, o una proteína específica, incluyendo secuencias reguladoras. Los "genes" también incluyen segmentos de ADN no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Los "genes" se pueden obtener de una diversidad de fuentes, incluida la clonación a partir de una fuente de interés, o la síntesis a partir de información de secuencia conocida o predicha, y puede incluir secuencias diseñadas para tener los parámetros deseados. Un "alelo" es una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma.

El término "ácido nucleico" se refiere a ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) y polímeros de los mismos, ya sea en forma de monocatenaria o bicatenaria, compuestos por monómeros (nucleótidos) que contienen un azúcar, fosfato y una base que es una purina o pirimidina. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca variantes modificadas de forma conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina. Un "fragmento de ácido nucleico" es una porción de una molécula de ácido nucleico dada.

Una "secuencia de nucleótidos" es un polímero de ADN o ARN que puede ser monocatenario o bicatenario, opcionalmente que contiene bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o alteradas capaces de incorporarse en polímeros de ADN o ARN.

Los términos "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "fragmento de ácido nucleico", "secuencia o segmento de ácido nucleico", o "polinucleótido" se usan de manera intercambiable y también se pueden usar de manera intercambiable con el gen, ADNc, ADN y ARN codificados por un gen.

La invención abarca moléculas de ácido nucleico aisladas o sustancialmente purificadas y composiciones que contienen estas moléculas. En el contexto de la presente invención, una molécula de ADN o molécula de ARN "aislada" o "purificada" es una molécula de ADN o molécula de ARN que existe aparte de su entorno nativo y, por lo tanto, no es un producto de la naturaleza. Una molécula de ADN o una molécula de ARN aislada puede existir en una forma purificada o puede existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una célula huésped transgénica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico "aislada" o "purificada" o una porción biológicamente activa de la misma, está sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. En una realización, un ácido nucleico "aislado" está libre de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es

decir, las secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual se deriva el ácido nucleico. La presente invención también abarca fragmentos y variantes de las secuencias de nucleótidos divulgadas. Por "fragmento" o "porción" se entiende una longitud completa o menor que la longitud completa de la secuencia de nucleótidos.

"De origen natural", "nativo", o "tipo silvestre" se usa para describir un objeto que se puede encontrar en la naturaleza como algo distinto de lo producido artificialmente. Por ejemplo, una secuencia de proteínas o nucleótidos presente en un organismo (incluido un virus), que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por una persona en el laboratorio, es de origen natural.

Una "variante" de una molécula es una secuencia que es sustancialmente similar a la secuencia de la molécula nativa. Para las secuencias de nucleótidos, las variantes incluyen aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos idéntica de la proteína nativa. Las variantes alélicas de origen natural, tales como estas, se pueden identificar con el uso de técnicas de biología molecular, como, por ejemplo, con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación. Las secuencias de nucleótidos variantes también incluyen secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente, tales como las generadas, por ejemplo, usando mutagénesis de sitio dirigido, que codifican la proteína nativa, así como las que codifican un polipéptido que tiene sustituciones de aminoácidos. Generalmente, las variantes de secuencia de nucleótidos de la invención tendrán al menos un 40 %, 50 %, 60 %, al 70 %, por ejemplo, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, al 79 %, generalmente al menos un 80 %, por ejemplo, un 81 %-84 %, al menos un 85 %, por ejemplo, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, al 98 %, de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos nativa (endógena).

Un "transgén" se refiere a un gen que se ha introducido en el genoma por transformación. Los transgenes incluyen, por ejemplo, ADN que es heterólogo u homólogo con respecto al ADN de una célula particular a transformar. Además, los transgenes pueden incluir genes nativos insertados en un organismo no nativo, o genes quiméricos.

El término "gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su ubicación natural en el genoma de un organismo.

Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se usan de manera intercambiable en el presente documento.

"Tipo silvestre" se refiere al gen u organismo normal que se encuentra en la naturaleza.

"Genoma" se refiere al material genético completo de un organismo.

Un "vector" se define para incluir, entre otros, cualquier vector viral, así como cualquier plásmido, cósmido, fago o vector binario de forma lineal o circular bicatenario o monocatenario que pueda o no ser autotransmisible o movilizable, y que pueda transformar un huésped procariota o eucariota por integración en el genoma celular o existir extracromosómicamente (por ejemplo, plásmido de replicación autónoma con un origen de replicación).

"Casete de expresión", como se usa en el presente documento, significa una secuencia de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos particular en una célula huésped apropiada, que puede incluir un promotor unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés que puede unirse operativamente a señales de terminación. La región codificante usualmente codifica un ARN funcional de interés, por ejemplo, un ARNsi. El casete de expresión que incluye la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérico. El casete de expresión también puede ser uno que sea de origen natural pero que se haya obtenido en una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. La expresión de la secuencia de nucleótidos en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor regulable que inicia la transcripción solo cuando la célula huésped está expuesta a algún estímulo particular. En el caso de un organismo multicelular, el promotor también puede ser específico para un tejido u órgano o estadio de desarrollo particular.

Dichos casetes de expresión pueden incluir una región de iniciación transcripcional unida a una secuencia de nucleótidos de interés. Tal casete de expresión está dotado de una pluralidad de sitios de restricción para que la inserción del gen de interés esté bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras. El casete de expresión puede contener adicionalmente genes marcadores seleccionables.

"Secuencia codificante" se refiere a una secuencia de ADN o ARN que codifica una secuencia de aminoácidos específica. Puede constituir una "secuencia codificante ininterrumpida" es decir, que carece de un intrón, tal como en un ADNc, o puede incluir uno o más intrones limitados por uniones de corte y empalme apropiadas. Un "intrón" es una secuencia de ARN que está contenida en el transcrito primario, pero se elimina mediante escisión y religadura del ARN dentro de la célula para crear el ARNm maduro que se puede traducir en una proteína.

El término "marco de lectura abierto" (ORF) se refiere a la secuencia entre el inicio de la traducción y los codones de

terminación de una secuencia codificante. Los términos "codón de iniciación" y "codón de terminación" se refieren a una unidad de tres nucleótidos adyacentes (un "codón") en una secuencia codificante que especifica la iniciación y la terminación de la cadena, respectivamente, de síntesis de proteínas (traducción de ARNm).

- 5 "ARN funcional" se refiere a ARN sentido, ARN antisentido, ARN de ribozima, ARNsi, u otro ARN que puede no traducirse pero que aun así, tiene un efecto en al menos un proceso celular.

10 El término "transcrito de ARN" o "transcrito" se refiere al producto resultante de la transcripción catalizada por una polimerasa de ARN de una secuencia de ADN. Cuando el transcrito de ARN es una copia complementaria perfecta de la secuencia de ADN, se conoce como el transcrito primario o puede ser una secuencia de ARN derivada del procesamiento postranscripcional del transcrito primario, y se conoce como ARN maduro. "ARN mensajero" (ARNm) se refiere al ARN que se encuentra sin intrones y que puede traducirse en una proteína por la célula.

15 "ADNc" se refiere a un ADN monocatenario o bicatenario que es complementario con y se deriva del ARNm.

20 "Secuencias reguladoras" son secuencias de nucleótidos ubicadas aguas arriba (secuencias no codificantes 5'), dentro, o aguas abajo (secuencias no codificantes 3') de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN, o la traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras incluyen potenciadores, promotores, secuencias líder de traducción, intrones, y secuencias de señal de poliadenilación. Incluyen secuencias naturales y sintéticas, así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales. Como se señala en el presente documento, el término "secuencias reguladoras adecuadas" no se limita a los promotores. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras adecuadas útiles en la presente invención incluirán, pero sin limitación, promotores constitutivos, promotores específicos de tejido, promotores específicos del desarrollo, promotores regulables y promotores virales.

25 "Secuencia no codificante 5'" se refiere a una secuencia de nucleótidos localizada 5' (aguas arriba) de la secuencia codificante. Está presente en el ARNm completamente procesado aguas arriba del codón de iniciación y puede afectar al procesamiento del transcrito primario con respecto al ARNm, la estabilidad del ARNm o la eficiencia de la traducción.

30 "Secuencia no codificante 3'" se refiere a secuencias de nucleótidos ubicadas 3' (aguas abajo) con respecto a una secuencia codificante y puede incluir secuencias de señal de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento del ARNm o la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza usualmente por afectar a la adición de tramos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor del ARNm.

35 El término "secuencia líder de traducción" se refiere a esa porción de secuencia de ADN de un gen entre el promotor y la secuencia codificante que se transcribe en ARN y está presente en el ARNm completamente procesado aguas arriba (5') del codón de inicio de la traducción. La secuencia líder de traducción puede afectar al procesamiento del transcrito primario en ARNm, la estabilidad del ARNm o la eficiencia de la traducción.

40 El término proteína "madura" se refiere a un polipéptido procesado postraduccionalmente sin su péptido señal. La proteína "precursora" se refiere al producto primario de la traducción de un ARNm. "Péptido señal" se refiere a la extensión amino terminal de un polipéptido, que se traduce junto con el polipéptido que forma un péptido precursor y que se requiere para su entrada en la vía secretora. El término "secuencia señal" se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal.

45 "Promotor" se refiere a una secuencia de nucleótidos, usualmente aguas arriba (5') con respecto a su secuencia codificante, que dirige y/o controla la expresión de la secuencia codificante proporcionando el reconocimiento de la ARN polimerasa y otros factores necesarios para la transcripción adecuada. "Promotor" incluye un promotor mínimo que es una secuencia de ADN corto que consta de una caja TATA y otras secuencias que sirven para especificar el sitio de inicio de la transcripción, al cual se añaden elementos reguladores para el control de la expresión. "Promotor" también se refiere a una secuencia de nucleótidos que incluye un promotor mínimo más elementos reguladores que son capaces de controlar la expresión de una secuencia codificante o el ARN funcional. Este tipo de secuencia promotora consiste en elementos aguas arriba proximales y más distales, citándose estos últimos elementos normalmente como potenciadores. Por consiguiente, un "potenciador" es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad del promotor y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel de especificidad de tejido de un promotor. Es capaz de operar en ambas orientaciones (normal o volteada), y puede funcionar incluso cuando se mueve aguas arriba o aguas abajo desde el promotor. Ambos potenciadores y otros elementos promotores aguas arriba se unen a proteínas de unión a ADN específicas de secuencia que median sus efectos. Los promotores pueden obtenerse en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos por diferentes elementos derivados de diferentes promotores hallados en la naturaleza, o incluso comprenden segmentos de ADN sintéticos. Un promotor también puede contener secuencias de ADN que participan en la unión de factores proteicos que controlan la eficacia del inicio de la transcripción en respuesta a condiciones fisiológicas o de desarrollo. Los ejemplos de promotores que se pueden usar en la presente invención incluyen los promotores de ARN U6 de ratón, promotores sintéticos de HI ARN humano, SV40, CMV, VRS, promotores de ARN polimerasa II y ARN polimerasa III.

65

El "sitio de iniciación" es la posición que rodea al primer nucleótido que forma parte de la secuencia transcrita, que también se define como posición +1. Con respecto a este sitio, todas las demás secuencias del gen y sus regiones de control están numeradas. Las secuencias aguas abajo (es decir, secuencias codificantes de proteínas adicionales en la dirección 3'), se denominan positivas, mientras que las secuencias aguas arriba (en su mayoría de las regiones de control en la dirección 5'), se denominan negativas.

Los elementos promotores, particularmente un elemento TATA, que están inactivos o que tienen una actividad promotora muy reducida en ausencia de activación aguas arriba, se denominan "promotores mínimos o centrales". En presencia de un factor de transcripción adecuado, el promotor mínimo funciona para permitir la transcripción. Un "promotor mínimo o central", por lo tanto, consiste solamente en todos los elementos basales necesarios para el inicio de la transcripción, por ejemplo, una caja TATA y/o un iniciador.

"Expresión constitutiva" se refiere a la expresión que utiliza un promotor constitutivo o regulado. "Condicional" y "expresión regulada" se refieren a la expresión controlada por un promotor regulado.

"Unido operativamente" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un solo fragmento de ácido nucleico, de manera que la función de una de las secuencias se vea afectada por otra. Por ejemplo, se dice que una secuencia de ADN reguladora está "unida operativamente a" o "asociada con" una secuencia de ADN que codifica un ARN o un polipéptido si las dos secuencias están situadas de tal forma que la secuencia de ADN reguladora afecte a la expresión de la secuencia de ADN codificante (es decir, que la secuencia codificante o el ARN funcional esté bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden unirse operativamente a secuencias reguladoras en orientación sentido o antisentido.

"Expresión" se refiere a la transcripción y/o traducción de un gen endógeno, gen heterólogo o segmento de ácido nucleico, o un transgén en las células. Por ejemplo, en el caso de construcciones de ARNsi, la expresión puede referirse a la transcripción del ARNsi solamente. Además, la expresión se refiere a la transcripción y acumulación estable de ARN sentido (ARNm) o funcional. La expresión también puede referirse a la producción de proteínas.

"Niveles alterados" se refiere al nivel de expresión en células u organismos transgénicos que difiere del de células u organismos normales o no transformados.

"Sobreexpresión" se refiere al nivel de expresión en células u organismos transgénicos que excede los niveles de expresión en células u organismos normales o no transformados.

"Inhibición antisentido" se refiere a la producción de transcritos de ARN antisentido capaces de suprimir la expresión de proteínas de un gen endógeno o un transgén.

"Fragmento de detención de la transcripción" se refiere a secuencias de nucleótidos que contienen una o más señales reguladoras, tales como secuencias de señal de poliadenilación, capaces de terminar la transcripción. Los ejemplos incluyen las regiones no reguladoras 3' de los genes que codifican la nopalina sintasa y la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa.

"Fragmento de detención de la traducción" se refiere a secuencias de nucleótidos que contienen una o más señales reguladoras, tal como uno o más codones de terminación en los tres marcos, capaces de terminar la traducción. La inserción de un fragmento de detención de la traducción adyacente o cerca del codón de iniciación en el extremo 5' de la secuencia codificante no dará como resultado una falta de traducción o traducción incorrecta. La eliminación del fragmento de detención de la traducción por recombinación de sitio específico dejará una secuencia de sitio específico en la secuencia codificante que no interfiera con la traducción adecuada utilizando el codón de iniciación.

Los términos "secuencia activa en *cis*" y "elemento activo en *cis*" se refieren a secuencias de ADN o ARN cuyas funciones requieren que estén en la misma molécula. Un ejemplo de una secuencia activa en *cis* en el replicón es el origen de la replicación viral.

Los términos "secuencia activa en *trans*" y "elemento activo en *trans*" se refieren a secuencias de ADN o ARN cuya función no requiere que estén en la misma molécula.

"Integrado cromosómicamente" se refiere a la integración de un gen extraño o una construcción de ácido nucleico en el ADN huésped mediante enlaces covalentes. Cuando los genes no están "integrados cromosómicamente", pueden "expresarse de forma transitoria". La expresión transitoria de un gen se refiere a la expresión de un gen que no está integrado en el cromosoma huésped, pero funciona de manera independiente, ya sea como parte de un plásmido de replicación autónoma o casete de expresión, por ejemplo, o como parte de otro sistema biológico, tal como un virus.

Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más ácidos nucleicos o polinucleótidos: (a) "secuencia de referencia", (b) "ventana de comparación", (c) "identidad de secuencia", (d) "porcentaje de identidad de secuencia", y (e) "identidad sustancial".

(a) Como se usa en el presente documento, "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como una base para comparación de secuencia. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, como un segmento de un ADNc o una secuencia génica de longitud completa, o el ADNc o la secuencia génica completa.

(b) Como se usa en el presente documento, "ventana de comparación" hace referencia a un segmento contiguo y específico de una secuencia polinucleotídica, en la que la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. Generalmente, la ventana de comparación tiene al menos 20 nucleótidos contiguos de longitud, y opcionalmente puede ser de 30, 40, 50, 100 o más. Los expertos en la materia entienden que para evitar una alta similitud con una secuencia de referencia debido a la inclusión de huecos en la secuencia polinucleotídica se introduce normalmente una penalización por hueco y se resta del número de emparejamientos.

Los métodos de alineamiento de secuencias para la comparación se conocen bien en la técnica. Por lo tanto, la determinación del porcentaje de identidad entre cualesquiera dos secuencias se puede realizar utilizando un algoritmo matemático.

Las implementaciones informáticas de estos algoritmos matemáticos pueden utilizarse para la comparación de secuencias para determinar la identidad de secuencia. Dichas implementaciones incluyen, pero sin limitación: CLUSTAL en el programa PC/Gene (disponible en IntelliGenetics, Mountain View, California); el programa ALIGN (Versión 2.0) y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA del paquete informático de Wisconsin Genetics, Versión 8 (disponible en Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU.). Los alineamientos que utilizan estos programas se pueden realizar utilizando los parámetros predeterminados.

El software para realizar los análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencias de puntuación alta (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valores positivos T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se denomina como el umbral del valor de palabra adyacente. Estos aciertos de palabra adyacente iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contienen. Los aciertos de palabra entonces se prolongan en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia todo el tiempo que pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulativo. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para restos con emparejamiento incorrecto; siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando la puntuación de alineamiento acumulada está dentro de la cantidad X de su valor máximo alcanzado, la puntuación acumulativa se reduce a cero o por debajo debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa, o se llega al final de cualquiera de las secuencias.

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad de la que sucedería una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico de ensayo se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01, y mucho más preferiblemente menor de aproximadamente 0,001.

Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, se puede utilizar gapped BLAST (en BLAST 2.0). Como alternativa, puede usarse PSI-BLAST (en BLAST 2.0) para realizar una búsqueda iterada que detecte relaciones distantes entre moléculas. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTN para secuencias de nucleótidos). El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un límite de 100, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de ambas cadenas. El alineamiento también se puede realizar manualmente mediante inspección.

Para los fines de la presente invención, la comparación de secuencias de nucleótidos para determinar el porcentaje de identidad de secuencia con las secuencias promotoras descritas en el presente documento se realiza preferiblemente utilizando el programa BlastN (versión 1.4.7 o posterior) con sus parámetros predeterminados o cualquier programa equivalente. Por "programa equivalente" se entiende cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias cualesquiera en cuestión, genera un alineamiento que tiene emparejamientos de nucleótidos idénticos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico en comparación con el alineamiento correspondiente generado por el programa preferido.

(c) Como se usa en el presente documento, la "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico hacen referencia a un porcentaje de nucleótidos en las dos secuencias que son

iguales cuando se alinean para máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación específica, según se mide por algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual.

(d) Como se usa en el presente documento, el "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado al comparar dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de una ventana de comparación, en la que la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se encuentra la base de ácido nucleico o el residuo de aminoácidos idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

(e) El término "identidad sustancial" de las secuencias polinucleotídicas significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, o un 79 %, preferiblemente de al menos un 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, o un 89 %, más preferiblemente al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, o un 94 %, y mucho más preferiblemente al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % de identidad de secuencia, en comparación con una secuencia de referencia que usa uno de los programas de alineamiento descritos usando parámetros estándar.

Otra indicación de que las secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas es si dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones rigurosas. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones rigurosas abarcan temperaturas en el intervalo de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 20 °C, dependiendo del grado de rigurosidad deseado, como se dispone de otro modo en el presente documento.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas posteriores si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la una o más secuencias de ensayo respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

Como se observa en el presente documento, otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones rigurosas. La frase "hibridar específicamente con" se refiere a la unión, duplexación, o hibridación de una molécula solo con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en un ADN o ARN de mezcla compleja (por ejemplo, celular total). "Se une(n) sustancialmente" se refiere a la hibridación complementaria entre un ácido nucleico sonda y un ácido nucleico diana, y abarca emparejamientos incorrectos menores que pueden acomodarse reduciendo la rigurosidad de los medios de hibridación para conseguir la detección deseada de la secuencia de ácido nucleico diana.

Las "condiciones de hibridación rigurosas" y las "condiciones de lavado de hibridación rigurosas" en el contexto de experimentos de hibridación de ácidos nucleicos tales como hibridaciones de Southern y Northern dependen de la secuencia, y son diferentes en diferentes parámetros ambientales. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. La T_m es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que un 50 % de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente coincidente. La especificidad es típicamente la función de los lavados posthibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para los híbridos de ADN-ADN, la T_m se puede aproximar a partir de la ecuación: $T_m = 81,5 \text{ °C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ de GC}) - 0,61 (\% \text{ de form}) - 500/L$; donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, el % de GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, el % de form es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m se reduce en aproximadamente 1 °C por cada 1 % de emparejamiento incorrecto; por lo tanto, T_m, Las condiciones de hibridación y/o lavado se pueden ajustar para hibridar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con >90 % de identidad, la T_m puede disminuir 10 °C. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones muy rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 o 4 °C por debajo del punto de fusión térmica (T_m); las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9, o 10 °C por debajo del punto de fusión térmica (T_m); las condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15, o 20 °C por debajo del punto de fusión térmica (T_m). Usando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado, y la T_m deseada, los expertos en la técnica entenderán que las variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado se describen de forma inherente. Si el grado deseado de emparejamiento incorrecto da como resultado una T inferior a 45 °C (solución acuosa) o 32 °C (solución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de SSC para que se pueda usar una temperatura más alta. Generalmente, las condiciones de hibridación y lavado altamente rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C por debajo del punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos.

Un ejemplo de condiciones de lavado altamente rigurosas es NaCl 0,15 M a 72 °C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado con SSC 0,2x a 65 °C durante 15 minutos (véase, Sambrook y Russell 2001, para una descripción del tampón SSC). A menudo, el lavado de alta rigurosidad va precedido por un lavado de baja rigurosidad para eliminar la señal de fondo de la sonda. Para secuencias cortas de ácido nucleico (por ejemplo, aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), las condiciones rigurosas típicamente implican concentraciones de sal de menos de aproximadamente 1,5 M, más preferiblemente aproximadamente de 0,01 a 1,0 M, una concentración de iones de Na (u otras sales) a un pH de 7,0 a 8,3, y la temperatura es típicamente de al menos aproximadamente 30 °C. También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. En general, una relación de señal-ruido de 2x (o mayor) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica la detección de una hibridación específica. Se seleccionan condiciones muy rigurosas para que sean iguales a la T_m para una molécula de ácido nucleico particular.

Las condiciones muy rigurosas se seleccionan para que sean iguales al T_m para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 residuos complementarios sobre un filtro en una transferencia de Southern o Northern es un 50 % de formalina, por ejemplo, hibridación en formamida al 50 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % a 37 °C y un lavado en SSC 0,1X de 60 a 65 °C. Las condiciones de baja rigurosidad ejemplares incluyen hibridación con una solución de tampón de formamida del 30 al 35 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % (dodecil sulfato sódico) a 37 °C, y un lavado en SSC 1x a 2x (SSC 20x = NaCl 3,0 M/citrato trisódico 0,3 M) a una temperatura de 50 a 55 °C. Las condiciones de rigurosidad moderada ejemplares incluyen la hibridación en formamida del 40 al 45 %, NaCl 1,0 M, SDS al 1 % a 37 °C, y un lavado en SSC de 0,5x a 1x de 55 a 60 °C.

El término "transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico al genoma de una célula huésped, que da como resultado una herencia genéticamente estable. Una "célula huésped" es una célula que se ha transformado, o es capaz de transformarse, mediante una molécula de ácido nucleico exógena. Las células huésped que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan células "transgénicas".

"Transformada", "transducida", "transgénica" y "recombinante" se refieren a una célula huésped en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico heteróloga. Como se usa en el presente documento, el término "transfección" se refiere a la administración de ADN en células eucariotas (por ejemplo, de mamífero). El término "transformación" se usa en el presente documento para referirse a la administración de ADN en células procariotas (por ejemplo, *E. coli*). El término "transducción" se usa en el presente documento para referirse a infectar células con partículas virales. La molécula de ácido nucleico puede integrarse de manera estable en el genoma generalmente conocido en la técnica. Los métodos conocidos de PCR incluyen, pero sin limitación, métodos que usan cebadores emparejados, cebadores anidados, cebadores específicos únicos, cebadores degenerados, cebadores específicos de genes, cebadores específicos de vectores, cebadores parcialmente emparejados incorrectamente, y similares. Por ejemplo, las células "transformadas", "transformantes" y "transgénicas" han pasado por el proceso de transformación y contienen un gen extraño integrado en su cromosoma. El término "sin transformar" se refiere a las células normales que no han pasado por el proceso de transformación.

"Células genéticamente alteradas" representa células que han sido modificadas por la introducción de ácidos nucleicos recombinantes o heterólogos (por ejemplo, una o más construcciones de ADN o sus homólogos de ARN) e incluye además la progenie de dichas células que conservan parte o la totalidad de dicha modificación genética.

Como se usa en el presente documento, el término "derivado" o "dirigido a" con respecto a una molécula de nucleótido significa que la molécula tiene una identidad de secuencia complementaria a una molécula particular de interés.

Los ARNsi de la presente divulgación pueden generarse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por transcripción *in vitro*, de forma recombinante, o por medios sintéticos. En un ejemplo, los ARNsi se pueden generar *in vitro* utilizando una enzima recombinante, tales como plantillas de ARN polimerasa T7, y oligonucleótidos de ADN.

Moléculas de ácido nucleico de la invención

Los términos "aislado y/o purificado" se refieren al aislamiento *in vitro* de un ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN de su entorno celular natural, y de la asociación con otros componentes de la célula, tal como ácido nucleico o polipéptido, de manera que pueda secuenciarse, replicarse, y/o expresarse. El ARN o ADN se "aisla" porque está libre de al menos un ácido nucleico contaminante con el que normalmente está asociado en la fuente natural del ARN o ADN y, preferiblemente, está sustancialmente libre de cualquier otro ARN o ADN de mamífero. La frase "libre de al menos un ácido nucleico de fuente contaminante con la que normalmente está asociado" incluye el caso en el que el ácido nucleico se reintroduce en la fuente o célula natural pero se encuentra en una ubicación cromosómica diferente o está flanqueado de otro modo por secuencias de ácido nucleico que normalmente no se encuentran en la célula de origen, por ejemplo, en un vector o plásmido.

Además de una secuencia de ADN que codifica un ARNsi, las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen moléculas de ARN interferente bicatenario, que también son útiles para inhibir la expresión de un gen diana.

Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico recombinante", por ejemplo, "secuencia o segmento de ADN recombinante" se refiere a un ácido nucleico, por ejemplo, a ADN, que se ha derivado o aislado de cualquier fuente celular apropiada, que posteriormente puede alterarse químicamente *in vitro*, de manera que su secuencia no se produzca de forma natural, o corresponda a secuencias de origen natural que no estén posicionadas como se ubicarían en un genoma que no se ha transformado con ADN exógeno. Un ejemplo de ADN preseleccionado "derivado" de una fuente sería una secuencia de ADN que se identifica como un fragmento útil dentro de un organismo dado, y que después se sintetiza químicamente de forma esencialmente pura. Un ejemplo de dicho ADN "aislado" de una fuente sería una secuencia de ADN útil que se suprime o se elimina de una fuente por medios químicos, por ejemplo, por el uso de endonucleasas de restricción, de manera que pueda manipularse adicionalmente, por ejemplo, amplificarse, para su uso en la invención, por la metodología de ingeniería genética. "ADN recombinante" incluye secuencias de ADN completamente sintéticas, secuencias de ADN semisintéticas, secuencias de ADN aisladas de fuentes biológicas, y secuencias de ADN derivadas de ARN, así como mezclas de las mismas.

Casetes de expresión de la invención

Para preparar casetes de expresión, la secuencia o segmento de ADN recombinante puede ser circular o lineal, bicatenario o monocatenario. Generalmente, la secuencia o segmento de ADN está en forma de ADN quimérico, tal como ADN plasmídico, o un vector que también puede contener regiones codificantes flanqueadas por secuencias de control que promueven la expresión del ADN recombinante presente en la célula transformada resultante.

Un vector o casete de expresión "quimérico", como se usa en el presente documento, significa un vector o casete que incluye secuencias de ácido nucleico de al menos dos especies diferentes, o tiene una secuencia de ácido nucleico de la misma especie que está unida o asociada de una manera que no ocurre en el tipo "nativo" o silvestre de la especie.

Además de las secuencias de ADN recombinante que sirven como unidades de transcripción para un transcrito de ARN, o porciones de las mismas, una porción del ADN recombinante puede estar sin transcribir, sirviendo como una función reguladora o estructural. Por ejemplo, el ADN recombinante puede tener un promotor que es activo en células de mamífero.

Otros elementos funcionales en las células huésped, tales como intrones, potenciadores, secuencias de poliadenilación, y similares, también pueden formar parte del ADN recombinante. Dichos elementos pueden o no ser necesarios para la función del ADN, pero pueden proporcionar una expresión mejorada del ADN al afectar a la transcripción, estabilidad del ARNsi, o similares. Dichos elementos pueden incluirse en el ADN según se desee para obtener el rendimiento óptimo del ARNsi en la célula.

Las secuencias de control son las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para las células procariotas, por ejemplo, incluye un promotor, y opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

Los ácidos nucleicos unidos operativamente son ácidos nucleicos colocados en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si se posiciona de manera que facilite la traducción. Generalmente, las secuencias de ADN unidas operativamente son secuencias de ADN que están unidas son contiguas. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se realiza mediante ligadura en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

El ADN recombinante a introducir en las células puede contener un gen marcador seleccionable o un gen indicador o ambos para facilitar la identificación y selección de las células de expresión de la población de células que se pretende transfectar o infectar a través de vectores virales. En otras realizaciones, el marcador seleccionable se puede realizar en una pieza separada de ADN y usarse en un procedimiento de cotransfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes indicadores pueden estar flanqueados con secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células huésped. Los marcadores seleccionables útiles se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a los antibióticos, tal como *neo* y similares.

Los genes indicadores se utilizan para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de las secuencias reguladoras. Los genes indicadores que codifican proteínas fácilmente ensayables se conocen bien en la técnica. En general, un gen indicador es un gen que no está presente o expresado por el organismo o tejido receptor y que codifica una proteína cuya expresión se manifiesta por alguna propiedad fácilmente detectable, por ejemplo, la actividad enzimática. Por ejemplo, los genes indicadores incluyen el gen de cloranfenicol acetil transferasa (cat) de Tn9 de *E. coli* y el gen de luciferasa de luciérnaga *Photinus pyralis*. La expresión del gen indicador se ensaya en un momento adecuado después de que el ADN se haya introducido en las células receptoras.

Los métodos generales para construir ADN recombinante que pueden transfectar células diana se conocen bien por los expertos en la técnica, y pueden utilizarse las mismas composiciones y métodos de construcción para producir el ADN útil en el presente documento.

- 5 El ADN recombinante se puede introducir fácilmente en las células huésped, por ejemplo, células de mamífero, bacterias, levadura o insecto por transfección con un vector de expresión compuesto por ADN que codifica el ARNsi por cualquier procedimiento útil para la introducción en una célula particular, por ejemplo, métodos físicos o biológicos, para producir una célula que tenga el ADN recombinante integrado de manera estable en su genoma o que exista como un elemento episomal, de manera que las moléculas de ADN, o secuencias de la presente invención se expresen por la célula huésped. Preferiblemente, el ADN se introduce en las células huésped a través de un vector. La célula huésped es preferiblemente de origen eucariota, por ejemplo, fuentes vegetales, de mamífero, insecto, levadura o fúngicas, pero también pueden emplearse células huésped de origen no eucariota.

- 15 Los métodos físicos para introducir un ADN preseleccionado en una célula huésped incluyen la precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación, y similares. Los métodos biológicos para introducir el ADN de interés en una célula huésped incluyen el uso de vectores virales de ADN y ARN. Para la terapia génica de mamífero, como se describe en el presente documento a continuación, es deseable utilizar un medio eficiente para insertar un gen de copia en el genoma huésped. Los vectores virales, y especialmente los vectores retrovirales, se han convertido en el método más ampliamente utilizado para insertar genes en células de mamífero, por ejemplo, células humanas. Otros vectores virales pueden derivarse de poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adenoasociados, y similares. Véase, por ejemplo, Patentes de EE.UU. N.º 5.350.674 y 5.585.362.

- 25 Como se analiza en el presente documento, una célula o línea celular "transfectada" o "transducida" es una en la que el genoma se ha alterado o aumentado por la presencia de al menos una secuencia de ácido nucleico recombinante o heteróloga. Las células huésped de la presente divulgación se producen típicamente mediante transfección con una secuencia de ADN en un vector de expresión plasmídico, un vector de expresión viral, o como una secuencia de ADN lineal aislada. El ADN transfectado puede convertirse en una secuencia de ADN recombinante cromosómicamente integrada, que está compuesta por una secuencia que codifica el ARNsi.

- 30 Para confirmar la presencia de la secuencia de ADN recombinante en la célula huésped, se pueden realizar una diversidad de ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de "biología molecular" bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como la transferencia de Southern y Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", tal como detección de la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y transferencias de Western) o por ensayos descritos en el presente documento para identificar agentes que se encuentran dentro del alcance de la invención.

- 40 Para detectar y cuantificar el ARN producido a partir de segmentos de ADN recombinante introducidos, puede emplearse RT-PCR. En esta aplicación de PCR, en primer lugar, es necesario revertir el ARN transcrito en ADN, utilizando enzimas tal como transcriptasa inversa, y después a través del uso de técnicas de PCR convencionales amplificar el ADN. En la mayoría de los casos las técnicas de PCR, aunque útil, no demostrará integridad del producto de ARN. Puede obtenerse información adicional sobre la naturaleza del producto de ARN mediante transferencia de Northern. Esta técnica demuestra la presencia de una especie de ARN y proporciona información sobre la integridad de ese ARN. La presencia o ausencia de una especie de ARN también se puede determinar utilizando hibridaciones Northern por transferencia por puntos o ranura. Estas técnicas son modificaciones de la transferencia de Northern y solo demuestran la presencia o ausencia de una especie de ARN.

- 50 Mientras que la transferencia de Southern y la PCR se pueden usar para detectar el segmento de ADN recombinante en cuestión, no proporcionan información sobre si el segmento de ADN preseleccionado se está expresando. La expresión puede evaluarse identificando específicamente los productos peptídicos de las secuencias de ADN recombinante introducidas o evaluando los cambios fenotípicos provocados por la expresión del segmento de ADN recombinante introducido en la célula huésped.

- 55 La presente divulgación proporciona un sistema de expresión celular para expresar material de ácido nucleico exógeno en un receptor de mamífero. El sistema de expresión, también conocido como una "célula modificada genéticamente", comprende una célula y un vector de expresión para expresar el material de ácido nucleico exógeno. Las células modificadas genéticamente son adecuadas para la administración a un receptor de mamífero, donde reemplazan las células endógenas del receptor. Por lo tanto, las células genéticamente modificadas preferidas no están inmortalizadas y no son tumorigénicas.

- 60 De acuerdo con una realización de la divulgación, las células se transfectan o se modifican genéticamente de otro modo *ex vivo*. Las células se aíslan de un mamífero (preferiblemente un ser humano), se introduce ácido nucleico (es decir, se transduce o se transfecta *in vitro*) con un vector para expresar un gen heterólogo (por ejemplo, recombinante) que codifica el agente terapéutico, y después se administra a un receptor de mamífero para la administración *in situ* del agente terapéutico. El receptor de mamífero puede ser un ser humano y las células a modificar son células autólogas, es decir, las células se aíslan del receptor de mamífero.

De acuerdo con otra realización de la divulgación, las células se transfectan o se transducen o se modifican genéticamente de otro modo *in vivo*. Las células del receptor de mamífero se transducen o se transfectan *in vivo* con un vector que contiene material de ácido nucleico exógeno para expresar un gen heterólogo (por ejemplo, recombinante) que codifica un agente terapéutico y el agente terapéutico se administra *in situ*.

Como se usa en el presente documento, "material de ácido nucleico exógeno" se refiere a un ácido nucleico o un oligonucleótido, ya sea natural o sintético, que no se encuentra naturalmente en las células; o si se encuentra naturalmente en las células, se modifica a partir de su forma original o nativa. Por lo tanto, "material de ácido nucleico exógeno" incluye, por ejemplo, un ácido nucleico no natural que se puede transcribir en un ARN antisentido, un ARNsi, así como un "gen heterólogo" (es decir, un gen que codifica una proteína que no se expresa o se expresa a niveles biológicamente insignificantes en una célula de origen natural del mismo tipo). Con fines ilustrativos, un gen sintético o natural que codifica eritropoyetina (EPO) humana se consideraría "material de ácido nucleico exógeno" con respecto a las células mesoteliales peritoneales humanas, ya que estas últimas células no expresan naturalmente EPO. Otro ejemplo más de "material de ácido nucleico exógeno" es la introducción de solamente parte de un gen para crear un gen recombinante, tal como combinando un promotor regulable con una secuencia codificante endógena a través de recombinación homóloga.

La afección susceptible de terapia de inhibición génica puede ser un proceso profiláctico, es decir, un proceso para prevenir una enfermedad o una afección médica no deseada. Por lo tanto, la presente divulgación abarca un sistema para administrar ARNsi que tiene una función profiláctica (es decir, un agente profiláctico) con respecto al receptor de mamífero.

Métodos para introducir los casetes de expresión de la invención en las células

El material inhibidor de ácido nucleico (por ejemplo, un casete de expresión que codifica ARNsi dirigido a un gen de interés) puede introducirse en la célula *ex vivo* o *in vivo* mediante métodos de transferencia genética, tales como transfección o transducción, para proporcionar una célula modificada genéticamente. Un experto en la técnica conoce diversos vectores de expresión (es decir, vehículos para facilitar la administración de ácido nucleico exógeno a una célula diana).

Como se usa en el presente documento, "transfección de células" se refiere a la adquisición por parte de una célula de nuevo material de ácido nucleico mediante la incorporación de ADN añadido. Por lo tanto, transfección se refiere a la inserción de ácido nucleico en una célula utilizando métodos físicos o químicos. Los expertos en la técnica conocen varias técnicas de transfección, incluyendo coprecipitación de ADN con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas catiónicos, bombardeo de micropartículas facilitado con partículas de tungsteno, y coprecipitación de ADN con fosfato de estroncio.

Por el contrario, "transducción de células" se refiere al proceso de transferir ácido nucleico a una célula utilizando un virus de ADN o ARN. Un virus de ARN (es decir, un retrovirus) para transferir un ácido nucleico a una célula se denomina en el presente documento como un retrovirus quimérico de transducción. El material de ácido nucleico exógeno contenido dentro del retrovirus se incorpora al genoma de la célula transducida. Una célula que se ha transducido con un virus de ADN quimérico (por ejemplo, un adenovirus que lleva un ADNc que codifica un agente terapéutico), no tendrá el material de ácido nucleico exógeno incorporado en su genoma, pero podrá expresar el material de ácido nucleico exógeno que se conserva de manera extracromosómica dentro de la célula.

El material de ácido nucleico exógeno puede incluir el ácido nucleico que codifica el ARNsi junto con un promotor para controlar la transcripción. El promotor tiene característicamente una secuencia de nucleótidos específica necesaria para iniciar la transcripción. El material de ácido nucleico exógeno puede incluir además secuencias adicionales (es decir, potenciadores) requeridas para obtener la actividad de transcripción génica deseada. Para el propósito de este análisis, un "potenciador" es simplemente cualquier secuencia de ADN no traducida que funcione con la secuencia codificante (en *cis*) para cambiar el nivel de transcripción basal dictado por el promotor. El material de ácido nucleico exógeno puede introducirse en el genoma de la célula inmediatamente aguas abajo del promotor, de manera que el promotor y la secuencia codificante se unan operativamente para permitir la transcripción de la secuencia codificante. Un vector de expresión puede incluir un elemento promotor exógeno para controlar la transcripción del gen exógeno insertado. Dichos promotores exógenos incluyen tanto promotores constitutivos como regulables.

Los promotores constitutivos de origen natural controlan la expresión de funciones celulares esenciales. Como resultado, una secuencia de ácido nucleico bajo el control de un promotor constitutivo se expresa en todas las condiciones de crecimiento celular. Los promotores constitutivos incluyen los promotores para los siguientes genes que codifican ciertas funciones constitutivas o "housekeeping": hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), dihidrofolato reductasa (DHFR), adenosina desaminasa, fosfoglicerol cinasa (PGK), piruvato cinasa, fosfoglicerol mutasa, el promotor de beta-actina, y otros promotores constitutivos conocidos por los expertos en la técnica. Además, muchos promotores virales funcionan constitutivamente en células eucariotas. Estas incluyen: los promotores tempranos y tardíos de SV40; las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Moloney y otros retrovirus; y el promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple, entre muchas otros.

Las secuencias de ácidos nucleicos que están bajo el control de promotores regulables se expresan solamente o en mayor o menor grado en presencia de un agente inductor o represor, (por ejemplo, la transcripción bajo el control del promotor de metalotioneína aumenta considerablemente en presencia de ciertos iones metálicos). Los promotores regulables incluyen elementos de respuesta (RE) que estimulan la transcripción cuando sus factores inductores están vinculados. Por ejemplo, hay RE para factores de suero, hormonas esteroideas, ácido retinoico, AMP cíclica, y tetraciclina y doxiciclina. Los promotores que contienen un RE particular pueden ser elegidos para obtener una respuesta regulable y, en algunos casos, el propio RE se puede adjuntar a un promotor diferente, confiriendo así la regulabilidad a la secuencia de ácido nucleico codificada. Por lo tanto, seleccionando el promotor apropiado (constitutivo frente a regulable; fuerte frente a débil), es posible controlar tanto la existencia como el nivel de expresión de una secuencia de ácido nucleico en la célula modificada genéticamente. Si la secuencia de ácido nucleico está bajo el control de un promotor regulable, la administración del agente terapéutico *in situ* se desencadena al exponer la célula modificada genéticamente *in situ* a las condiciones para permitir la transcripción de la secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, por inyección intraperitoneal de inductores específicos de los promotores regulables que controlan la transcripción del agente. Por ejemplo, la expresión *in situ* de una secuencia de ácido nucleico bajo el control del promotor de metalotioneína en células modificadas genéticamente se mejora al poner en contacto las células modificadas genéticamente con una solución que contiene iones metálicos apropiados (es decir, de inducción) *in situ*.

Por consiguiente, la cantidad de ARNs*i* generado *in situ* se regula controlando factores tales como la naturaleza del promotor utilizado para dirigir la transcripción de la secuencia de ácido nucleico, (es decir, si el promotor es constitutivo o regulable, fuerte o débil) y el número de copias de la secuencia de ácido nucleico exógena que codifica una secuencia de ARNs*i* que están en la célula.

Además de al menos un promotor y al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica el ARNs*i*, el vector de expresión puede incluir un gen de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina, para facilitar la selección de células que se han transfectado o transducido con el vector de expresión.

Las células también pueden transfectarse con dos o más vectores de expresión, al menos un vector que contiene la secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican el o los ARNs*i*, conteniendo el otro vector un gen de selección. La selección de un promotor adecuado, potenciador, gen de selección y/o secuencia de señal se considera que está dentro del alcance de un experto en la técnica sin demasiada experimentación.

El siguiente análisis está dirigido a diversas utilidades de la presente invención. Por ejemplo, la presente invención tiene utilidad como sistema de expresión adecuado para silenciar la expresión de uno o más genes de interés.

La presente divulgación proporciona métodos para modificar genéticamente células de un receptor mamífero *in vivo*. De acuerdo con una realización de la divulgación, el método comprende introducir un vector de expresión para expresar una secuencia de ARNs*i* en células del receptor mamífero *in situ* mediante, por ejemplo, inyección del vector en el receptor.

Vehículos de administración para los casetes de expresión de la invención

La administración de compuestos a los tejidos y a través de la barrera hematoencefálica puede verse limitada por el tamaño y las propiedades bioquímicas de los compuestos. Actualmente, la administración eficiente de compuestos en células *in vivo* se puede lograr solo cuando las moléculas son pequeñas (generalmente de menos de 600 Daltons). La transferencia génica para la corrección de los errores innatos del metabolismo y las enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central (SNC), y para el tratamiento del cáncer se ha logrado con vectores adenovirales recombinantes.

La selección y optimización de un vector de expresión particular para expresar un ARNs*i* específico en una célula se puede lograr obteniendo la secuencia de ácido nucleico del ARNs*i*, posiblemente con una o más regiones de control apropiadas (por ejemplo, promotor, secuencia de inserción); preparando una construcción de vector que comprende el vector en el que se inserta la secuencia de ácido nucleico que codifica el ARNs*i*; transfectando o transduciendo células cultivadas *in vitro* con la construcción del vector; y determinando si el ARNs*i* está presente en las células cultivadas.

Los vectores para la terapia génica celular incluyen virus, tales como virus deficientes en replicación (descritos en detalle a continuación). Los vectores virales ejemplares se derivan del virus del sarcoma de Harvey, virus del sarcoma de Rous, (MPSV), virus de leucemia murina de Moloney y virus del ADN (por ejemplo, adenovirus).

Los retrovirus deficientes en replicación son capaces de dirigir la síntesis de todas las proteínas viriónicas, pero son incapaces de hacer partículas infecciosas. Por consiguiente, estos vectores de expresión retrovirales alterados genéticamente tienen una utilidad general para la transducción de secuencias de ácido nucleico de alta eficiencia en células cultivadas, y una utilidad específica para su uso en el método de la presente divulgación. Dichos retrovirus tienen además utilidad para la transducción eficiente de secuencias de ácido nucleico en células *in vivo*. Los retrovirus se han utilizado ampliamente para transferir material de ácido nucleico a las células. Los protocolos para producir

retrovirus deficientes en replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material de ácido nucleico exógeno en un plásmido, transfección de una línea celular de empaquetamiento con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de empaquetamiento, recogida de partículas víricas de los medios de cultivo tisular, e infección de las células diana con las partículas virales) se conocen bien en la técnica.

5 Una ventaja de usar retrovirus para la terapia génica es que los virus insertan la secuencia de ácido nucleico que codifica el ARNsi en el genoma de la célula huésped, permitiendo así que la secuencia de ácido nucleico que codifica el ARNsi se pase a la progenie de la célula cuando se divide. Las secuencias promotoras en la región LTR pueden mejorar la expresión de una secuencia codificante insertada en una diversidad de tipos de células. Algunas desventajas del uso de un vector de expresión de retrovirus son (1) la mutagénesis de inserción, es decir, la inserción de la secuencia de ácido nucleico que codifica el ARNsi en una posición no deseada en el genoma de la célula diana que, por ejemplo, conduce al crecimiento celular no regulado, y (2) la necesidad de proliferación de células diana para que la secuencia de ácido nucleico que codifica el ARNsi transportado por el vector se integre en el genoma diana.

15 Otro candidato viral útil como vector de expresión para la transformación de células es el adenovirus, un virus de ADN bicatenario. El adenovirus es infeccioso en una amplia gama de tipos de células, incluyendo, por ejemplo, células musculares y endoteliales.

20 Los adenovirus (Ad) son virus de ADN bicatenario con un genoma de 36 kb. Varias características del adenovirus los han hecho útiles como vehículos de administración de transgenes para aplicaciones terapéuticas, tal como facilitar la administración de genes *in vivo*. Se ha demostrado que los vectores de adenovirus recombinantes son capaces de transferir genes *in situ* eficientemente a células parenquimatosas de diversos órganos, incluyendo el pulmón, cerebro, páncreas, vesícula biliar, y el hígado. Esto ha permitido el uso de estos vectores en métodos para tratar enfermedades genéticas hereditarias, tal como fibrosis quística, donde los vectores pueden administrarse a un órgano diana. Además, la capacidad del vector de adenovirus para lograr la transducción de tumores *in situ* ha permitido el desarrollo de una diversidad de métodos de terapia génica contra el cáncer para una enfermedad no diseminada. En estos métodos, la contención vectorial favorece la transducción específica de células tumorales.

30 Al igual que el retrovirus, el genoma de adenovirus es adaptable para su uso como un vector de expresión para terapia génica, es decir, eliminando la información genética que controla la producción del propio virus. Debido a que el adenovirus funciona de manera extracromosómica, el adenovirus recombinante no tiene el problema teórico de la mutagénesis de inserción.

35 Tradicionalmente, se han utilizado varios enfoques para generar los adenovirus recombinantes. Un enfoque implica la ligadura directa de fragmentos de endonucleasas de restricción que contienen una secuencia de ácido nucleico de interés con respecto a porciones del genoma adenoviral. Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico de interés puede insertarse en un adenovirus defectuoso mediante resultados de recombinación homóloga. Los recombinantes deseados se identifican cribando placas individuales generadas en una capa de crecimiento de células de complementación.

40 La mayoría de los vectores de adenovirus se basan en el esqueleto de adenovirus de tipo 5 (Ad5) en el que se ha introducido un casete de expresión que contiene la secuencia de ácido nucleico de interés en lugar de la región 1 (E1) temprana o la región 3 (E3) temprana. Los virus en los que se ha eliminado E1 son defectuosos para la replicación y se propagan en células de complementación humana (por ejemplo, células 293 o 911), que suministran el gen faltante E1 y pIX en *trans*.

50 En una realización de la presente invención, se deseará generar ARNsi en una célula cerebral o un tejido cerebral. Un vector adecuado para esta aplicación es un vector VIF o un vector AAV. Por ejemplo, se puede usar AAV5. Además, se puede aplicar poliovirus o vectores de VHS.

La aplicación de ARNsi se realiza generalmente mediante la transfección de ARNsi sintéticos, ARN sintetizados *in vitro*, o plásmidos que expresan ARNsh o miARN. Más recientemente, se han empleado virus para estudios *in vitro* y para generar desactivaciones de ratones transgénicos de genes dirigidos. Se pueden usar un adenovirus recombinante, un virus adenoasociado (AAV) y un virus de inmunodeficiencia felina (VIF) para administrar genes *in vitro* e *in vivo*. Cada uno tiene sus propias ventajas y desventajas. Los adenovirus son virus de ADN bicatenario con genomas grandes (36 kb) y se han diseñado en este laboratorio y otros para acomodar los casetes de expresión en distintas regiones.

60 Los virus adenoasociados tienen genomas encapsidados, similares a Ad, pero son más pequeños en tamaño y capacidad de empaquetamiento (~30 nm frente a ~100 nm; límite de empaquetamiento de ~4,5 kb). Los AAV contienen genomas de ADN monocatenario de la cadena + o -. Se han estudiado extensamente ocho serotipos de AAV (1-8), tres de los cuales se han evaluado en el cerebro. Una consideración importante para la presente solicitud es que AAV5 transduce neuronas estriatales y corticales, y no está asociado con ninguna patología conocida.

65 El virus asociado a Adeno (AAV) es un pequeño virus no patógeno de la familia parvoviridae. AAV se distingue de los demás miembros de esta familia por su dependencia de un virus auxiliar para la replicación. En ausencia de un virus

auxiliar, AAV puede integrarse de manera específica del locus en el brazo q del cromosoma 19. El genoma de aproximadamente 5 kb de AAV consiste en un segmento de ADN monocatenario de más o menos polaridad. Los extremos del genoma son repeticiones terminales invertidas cortas que pueden plegarse en estructuras de horquilla y servir como el origen de la replicación del ADN viral. Físicamente, el virión del parvovirus no está envuelto y su cápside icosahédrica tiene aproximadamente 20 nm de diámetro.

Además, esta descripción proporciona virus quiméricos donde el AAV se puede combinar con el virus del herpes, amplicones del virus del herpes, baculovirus u otros virus para lograr un tropismo deseado asociado con otro virus. Por ejemplo, las ITR de AAV4 podrían insertarse en el virus del herpes y las células podrían infectarse. Tras la infección, las ITR de AAV4 podrían activarse por el AAV4 rep proporcionado en el sistema o en un vehículo separado para rescatar AAV4 del genoma. Por lo tanto, el tropismo celular del virus del herpes simple se puede combinar con la integración dirigida mediada por AAV4 rep. Otros virus que podrían utilizarse para construir virus quiméricos incluyen lentivirus, retrovirus, vectores retrovirales pseudotipados, y vectores adenovirales.

También se proporcionan mediante esta divulgación vectores AAV de variante. Por ejemplo, la secuencia de un AAV nativo, tal como AAV5, puede modificarse en nucleótidos individuales. La presente divulgación incluye vectores AAV nativos y mutantes. La presente divulgación incluye además todos los serotipos de AAV.

El VIF es un virus envuelto con un fuerte perfil de seguridad en seres humanos; los individuos mordidos o arañados por gatos infectados con VIF no se seroconvierten y no se ha informado que muestren signos de enfermedad. Como AAV, VIF proporciona una expresión de transgén duradera en neuronas de ratón y de primate no humano, y la transducción puede dirigirse a diferentes tipos de células mediante pseudotipado, el proceso de intercambio de la envoltura nativa del virus por una envoltura de otro virus.

Por lo tanto, como será evidente para un experto en la técnica, una diversidad de vectores de expresión viral adecuados están disponibles para transferir material de ácido nucleico exógeno a las células. La selección de un vector de expresión apropiado para expresar un agente terapéutico para una afección particular susceptible de terapia de silenciamiento génico y la optimización de las condiciones para la inserción del vector de expresión seleccionado en la célula, están dentro del alcance de un experto en la técnica sin la necesidad de demasiada experimentación.

En otra realización, el vector de expresión está en forma de un plásmido, que se transfiere a las células diana por uno de una diversidad de métodos: físicos (por ejemplo, microinyección, electroporación, carga de raspado, bombardeo de micropartículas) o por captación celular como un complejo químico (por ejemplo, coprecipitación de calcio o estroncio, complejación con lípido, complejación con ligando). Hay varios productos comerciales disponibles para la complejación de liposomas catiónicos, incluyendo Lipofectin™ (Gibco-BRL, Gaithersburg, Md.) y Transfectam™ (Promega®, Madison, Wis.). Sin embargo, la eficiencia de la transfección mediante estos métodos depende en gran medida de la naturaleza de la célula diana y, por consiguiente, las condiciones para la transfección óptima de ácidos nucleicos en células utilizando los procedimientos mencionados en el presente documento deben optimizarse. Dicha optimización está dentro del alcance de un experto en la técnica sin la necesidad de demasiada experimentación.

Dosificaciones, formulaciones y vías de administración de los agentes de la invención

Los agentes de la invención se administran preferiblemente para dar como resultado una reducción en al menos un síntoma asociado con una enfermedad. La cantidad administrada variará dependiendo de diversos factores incluyendo, pero sin limitación, la composición elegida, la enfermedad particular, el peso, la condición física, y la edad del mamífero, y si se debe lograr la prevención o el tratamiento. Dichos factores pueden determinarse fácilmente por el médico empleando modelos animales u otros sistemas de prueba, que se conocen bien en la técnica. Como se usa en el presente documento, el término "ARNsi terapéutico" se refiere a cualquier ARNsi que tenga un efecto beneficioso sobre el receptor. Por lo tanto, "ARNsi terapéutico" abarca tanto ARNsi terapéutico como profiláctico.

La administración de ARNsi puede realizarse a través de la administración de la molécula de ácido nucleico que codifica el ARNsi. Las formulaciones farmacéuticas, las dosificaciones y las vías de administración de los ácidos nucleicos se conocen generalmente.

La presente invención prevé tratar la enfermedad de Huntington en un mamífero mediante la administración de un agente, por ejemplo, una composición de ácido nucleico, un vector de expresión, o una partícula viral de la invención. La administración de los agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de la condición fisiológica del receptor, si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico, y otros factores conocidos por los expertos en la técnica. La administración de los agentes de la invención puede ser esencialmente continua durante un periodo de tiempo preseleccionado o puede estar en una serie de dosis espaciadas. Se contempla la administración tanto local como sistémica.

Una o más formas de dosificación unitaria adecuadas que tienen el agente o agentes terapéuticos de la invención, que, como se analiza más adelante, se pueden formular opcionalmente para una liberación sostenida (por ejemplo, usando microencapsulación, véase el documento WO 94/07529, y la Patente de EE.UU. N.º 4.962.091), se pueden administrar por una diversidad de vías incluyendo parenteral, incluyendo por vía intravenosa e intramuscular, así como

por inyección directa en el tejido enfermo. Por ejemplo, el agente terapéutico puede inyectarse directamente en el cerebro. Como alternativa, el agente terapéutico puede introducirse por vía intratecal para afecciones del cerebro y la médula espinal. En otro ejemplo, el agente terapéutico puede introducirse por vía intramuscular para los virus que restablecen el tráfico a las neuronas afectadas del músculo, tal como AAV, lentivirus y adenovirus. Las formulaciones, cuando sea adecuado, pueden presentarse de manera conveniente en formas de dosificación unitarias discretas y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en farmacia. Dichos métodos pueden incluir la etapa de asociar el agente terapéutico con los vehículos líquidos, matrices sólidas, vehículos semisólidos, vehículos sólidos finamente divididos o combinaciones de los mismos, y después, si es necesario, introducir o conformar el producto en el sistema de administración deseado.

Cuando los agentes terapéuticos de la invención se preparan para la administración, se combinan preferiblemente con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable para formar una formulación farmacéutica, o forma de dosificación unitaria. Los principios activos totales en dichas formulaciones incluyen del 0,1 al 99,9 % en peso de la formulación. "Farmacéuticamente aceptable" es un vehículo, diluyente, excipiente, y/o sal que es compatible con los demás ingredientes de la formulación, y no son perjudiciales para el receptor de la misma. El principio activo para administración puede estar presente en forma de un polvo o gránulos, como una solución, una suspensión o una emulsión.

Las formulaciones farmacéuticas que contienen los agentes terapéuticos de la invención pueden prepararse mediante procedimientos conocidos en la técnica usando ingredientes ya conocidos y fácilmente disponibles. Los agentes terapéuticos de la invención también pueden formularse como soluciones apropiadas para administración parenteral, por ejemplo, por vía intramuscular, subcutánea o intravenosa.

Las formulaciones farmacéuticas de los agentes terapéuticos de la invención también pueden adoptar la forma de una solución o dispersión acuosa o anhidra, o como alternativa, la forma de una emulsión o suspensión.

Por lo tanto, el agente terapéutico puede formularse para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua) y puede presentarse en forma de dosis unitarias en ampollas, jeringuillas precargadas, recipientes de infusión de pequeño volumen o en envases multidosis con un conservante añadido. Los principios activos pueden adoptar dichas formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden comprender agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, los principios activos pueden estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de un sólido estéril o por liofilización de la solución, para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes de su uso.

Se apreciará que el contenido unitario de principio o principios activos contenidos en una dosis en aerosol individual de cada forma de dosificación no necesariamente constituye por sí mismo una cantidad eficaz para tratar la indicación o enfermedad particular, ya que la cantidad eficaz necesaria puede alcanzarse mediante la administración de una pluralidad de unidades de dosificación. Además, la cantidad eficaz se puede lograr usando menos de la dosis en la forma de dosificación, individualmente, o en una serie de administraciones.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden incluir, como ingredientes opcionales, vehículos farmacéuticamente aceptables, diluyentes, agentes solubilizantes o emulsionantes, y sales del tipo que se conocen bien en la técnica. Los ejemplos no limitantes específicos de los vehículos y/o diluyentes que son útiles en las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen agua y soluciones salinas tamponadas fisiológicamente aceptables, tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato, a pH 7,0-8,0, soluciones salinas y agua.

La presente invención se ilustrará ahora mediante el siguiente Ejemplo no limitante.

EJEMPLO 1:

Diseño racional de ARNsi terapéuticos: Minimización del potencial de inespecificidad para mejorar la seguridad de la terapia con ARNi para la enfermedad de Huntington

La interferencia de ARN (ARNi) proporciona un enfoque para el tratamiento de muchas enfermedades humanas. Sin embargo, la seguridad de las terapias basadas en ARNi puede verse obstaculizada por la capacidad de los ARN inhibidores pequeños (ARNsi) para unirse a los ARNm no intencionados y reducir su expresión, un efecto conocido como silenciamiento génico inespecífico. La inespecificidad se produce principalmente cuando la región de semilla (nucleótidos 2-8 del ARN pequeño) se empareja con secuencias en las 3'-UTR de ARNm no intencionados y dirige la represión de la traducción y la desestabilización de esos transcritos. Hasta ahora, la mayoría de las secuencias de ARNi terapéutico se seleccionan principalmente por su eficacia de silenciamiento génico, y posteriormente se evalúan para determinar su seguridad. Aquí, en el diseño de los ARNsi para tratar la enfermedad de Huntington (EH), un trastorno neurodegenerativo dominante, se dio prioridad a la selección de secuencias con potenciales mínimos de inespecificidad (es decir, aquellas con una escasez de complementos de semilla en todas las 3'-UTR humanas conocidas). Se identificaron nuevas secuencias candidatas terapéuticas prometedoras que muestran un potente

silenciamiento en el cultivo celular y el cerebro de ratón. Además, se presentan datos de micromatrices que demuestran que la inespecificidad se minimiza significativamente mediante el uso de ARNsi que contienen semillas "safe", una estrategia importante a considerar durante el desarrollo preclínico de terapias basadas en ARNi.

- 5 El ARNi dirige el silenciamiento génico específico de secuencia mediante ARN bicatenario (ARNds) que se procesa en ARN inhibitorios pequeños funcionales (~21 nt). En la naturaleza, El ARNi para la regulación génica se produce principalmente a través de ARN pequeños conocidos como microARN (miARN). Los microARN maduros (~19-25 nt) se procesan a partir de transcritos de miARN primario más grandes (pri-miARN) que contienen regiones de tallo-bucle. A través de una serie de eventos de procesamiento catalizados por las ribonucleasas, Drosha y Dicer, la región dúplex de miARN se libera, y después se incorpora una sola hebra (la hebra "guía" antisentido) en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), generando así un complejo funcional capaz de emparejar bases y silenciar los transcritos por diversos medios, dependiendo del grado de complementariedad. Un alto grado de emparejamiento de bases provoca la escisión del transcrito diana, mientras que la unión imperfecta (típicamente a las 3'-UTR de transcrito) induce el mecanismo de represión canónico basado en miARN que da como resultado la represión de la traducción y la desestabilización del ARNm. De hecho para esto último, el emparejamiento a través de la región semilla con tan solo 6-7 pb puede ser suficiente para activar el silenciamiento.

- La elucidación de los mecanismos implicados en la biogénesis de miARN endógeno y el silenciamiento génico ha permitido a los científicos idear estrategias para incorporar la maquinaria de ARNi celular y dirigir el silenciamiento de casi cualquier gen de interés utilizando ARNsi, ARN de horquilla corta (ARNsh) y miARN artificiales; los dos últimos representan transcritos de tallo-bucle expresados que liberan los ARNsi tras el procesamiento. Los ARNsi se diseñan generalmente con la hebra guía que muestra una complementariedad perfecta con la diana de ARNm deseada para promover la escisión. Este potente enfoque de silenciamiento génico se ha convertido en una poderosa herramienta molecular para estudiar la función génica y se está desarrollando como una estrategia terapéutica para suprimir los genes causantes de enfermedades. La utilidad de las tecnologías basadas en ARNsi como intervenciones biológicas o clínicas está limitada en gran medida por nuestras capacidades para diseñar ARN inhibidores eficaces y específicos y para introducirlos en células o tejidos diana. Una consideración importante para las aplicaciones de silenciamiento génico es la especificidad, y hay evidencia creciente que apoya que los ARNsi se unen y reprimen los ARNm no intencionados, un efecto conocido como silenciamiento inespecífico. La inespecificidad se produce principalmente cuando la región semilla se empareja con secuencias 3'-UTR en los ARNm y dirige la represión de la traducción y la desestabilización de estos transcritos. Los datos recientes confirman que la inespecificidad basada en semilla puede inducir fenotipos tóxicos. Se ha observado que la magnitud de la inespecificidad del ARNsi está directamente relacionada con la frecuencia de los complementos de semilla (hexámeros) presentes en el 3'-UTR. Evaluando subconjuntos de ARNsi con diferentes potenciales de inespecificidad (bajo, medio y alto; predicho basado en distribuciones de hexámeros en 3'-UTR humanas), se descubrió que los ARNsi en el subconjunto bajo tenían firmas inespecíficas disminuidas significativamente (basándose en datos de micromatrices) y menos efectos adversos sobre la viabilidad celular en comparación con los ARNsi en los subconjuntos medio y alto. Estas observaciones establecieron la importancia de considerar las distribuciones de hexámeros del complemento de semilla como un criterio clave para el diseño de ARNsi altamente específicos, y algunas herramientas de diseño de ARNsi han incorporado directrices de especificidad de semilla en sus algoritmos. Sin embargo, la mayoría de los algoritmos disponibles públicamente siguen siendo fuertemente sesgados en cuanto a la eficacia del silenciamiento génico sobre la especificidad y, por lo tanto, muy pocos ARNsi candidatos realmente contienen semillas con bajos potenciales de inespecificidad. Esto se revela en un estudio bibliográfico de los ARNsi en el desarrollo terapéutico; solo 7 de los 80 ARNsi publicados recientemente con relevancia terapéutica (Tabla 6) podrían clasificarse en el subgrupo de baja inespecificidad. Esto es problemático ya que los ARNsi pasan a los ensayos clínicos de etapa temprana. Mientras que el diseño basado en la potencia es racional, las herramientas actualmente disponibles públicamente identifican solo una fracción de los ARNsi funcionales para un transcrito diana dado, y con frecuencia, los ARNsi altamente funcionales no satisfacen varias reglas de diseño. Por estas razones, y en aras de mejorar el perfil de seguridad de ARNi terapéutico, los inventores plantearon la hipótesis de que un esquema de diseño de ARNsi que diera prioridad a la especificidad pero que promoviera la eficacia produciría secuencias de ARNsi candidatas con un potencial mínimo de inespecificidad y una fuerte capacidad para un potente silenciamiento génico.

RESULTADOS

55 Algunos miARN artificiales inducen toxicidad específica de secuencia

- Estudios anteriores de este laboratorio y de otros han demostrado el potencial de los productos terapéuticos con ARNi para tratar la enfermedad de Huntington (EH), una enfermedad neurodegenerativa dominante causada por una expansión de repetición de CAG que confiere una ganancia de función tóxica a la proteína huntingtina (htt) resultante. En varios modelos de roedor para EH, la expresión basada en virus de las horquillas de ARNi dirigidas al ARNm mutante de htt en el cerebro redujo la transcripción y los niveles de proteína en -50-70 %, mejorando los fenotipos conductuales y neuropatológicos. Siguiendo estos éxitos de prueba de concepto, los inventores iniciaron estudios para evaluar y optimizar la seguridad de los productos terapéuticos basados en ARNi. Los inventores compararon la eficacia del silenciamiento y la seguridad del ARNsh y los vectores de expresión de miARN artificial *in vitro* e *in vivo*. Los inventores encontraron que los ARNsh son más potentes pero inducen toxicidad en cultivos celulares y en cerebro de ratón, mientras que los miARN artificiales se expresan en niveles tolerablemente más bajos y muestran mejores

perfiles de seguridad mientras se mantiene un potente silenciamiento génico. Desde este descubrimiento, los inventores han probado varias secuencias de miARN artificiales en el cerebro de ratón utilizando virus adeno asociados (AAV serotipo 2/1) recombinantes para la administración, y en algunos casos, han observado toxicidad dependiente de secuencia. Por ejemplo, un miARN artificial dirigido a htt (miHD-Ex1) causó una alta incidencia de convulsiones y morbilidad en los ratones tratados (datos no mostrados); cabe destacar que, este fenotipo tóxico no fue una consecuencia de la atenuación de htt, ya que se ha informado anteriormente que se tolera el silenciamiento de htt endógeno en el cerebro de ratón. En otro caso, un miARN artificial inespecífico (miSCR, un control desordenado) indujo una neurotoxicidad evidente como se indica por aumento de la tinción para Iba1, un marcador para microglías en reposo y reactivas, en regiones tratadas del cuerpo estriado (Figura 1). Conjuntamente, estos datos sugieren que, aunque los miARN artificiales muestran una seguridad mejorada con respecto a los ARNsh, la toxicidad dependiente de la secuencia sigue siendo una preocupación. Por lo tanto, los inventores exploraron medios complementarios para mejorar la seguridad empleando un esquema de diseño racional de ARNsi destinado a minimizar la probabilidad de silenciamiento inespecífico.

Selección y cribado de los ARNsi de direccionamiento a htt con bajos potenciales de inespecificidad

Los potenciales de toxicidad del ARNsi se han correlacionado con las frecuencias del complemento de semilla en la 3'-UTRome humana (Anderson, E.M., A. Birmingham, S. Baskerville, A. Reynolds, E. Maksimova, D. Leake, et al. (2008). Experimental validation of the importance of seed complement frequency to siRNA specificity. RNA 14(5):853-61). Aquí, los inventores estimaron el número de potenciales transcritos inespecíficos (POT) para cada hexámero mediante la determinación del número de 3'-UTR RefSeq humanas que contienen un hexámero específico (de los 4096 posibles). De forma similar a los hallazgos anteriores, la mayoría de los hexámeros están presentes en -4000 3'-UTR o más, y curiosamente, hay un pico inexplicable (que contiene 1135 hexámeros) en la distribución. Estos últimos hexámeros están presentes en menos de 2000 3'-UTR (Figura 2c). Dado que los ARNsi están diseñados típicamente para dirigirse a regiones codificantes, se determinó la probabilidad de encontrar estos hexámeros relativamente raros en los exones codificantes RefSeq humanos. Esto fue de -14 %, sugiriendo que 1 en 7-8 ARNsi diseñados al azar contendrían estos hexámeros raros en la región semilla. Para mejorar esta probabilidad nominal, los hexámeros de baja frecuencia pueden ubicarse primero dentro de la secuencia de transcripción diana y posteriormente usarse como una base para diseñar los ARNsi con un potencial mínimo de inespecificidad. Por ejemplo, los inventores escanearon la secuencia codificante de htt humana para determinar hexámeros de baja frecuencia, y con cada caso, examinaron el contexto cercano para determinar si el ARNsi que contenía el complemento de semilla del hexámero satisfaría dos criterios: (1) carga fiel de la hebra guía antisentido deseada y (2) contenido de GC entre el 20-70 % (Figura 3a). Estos atributos no solo representan los determinantes más destacados de la potencia del ARNsi, sino que la carga adecuada de la hebra guía antisentido tiene la obligación de mitigar la posibilidad de inespecificidad mediada por la hebra "pasajera" sentido. La carga de hebra está dictada por las propiedades termodinámicas presentes en los extremos del dúplex de ARNsi, cargando la hebra guía alentada por un emparejamiento débil (A/GU) en el extremo 5' y una fuerte unión G-C en el extremo opuesto (Figura 3a). Cabe destacar que, los inventores aplican este principio a los dos pares de bases terminales en cada extremo y aprovechan el débil emparejamiento de balanceo de GU para impartir inestabilidad en el extremo 5' de la hebra antisentido cuando sea aplicable. Finalmente, los inventores seleccionan ARNsi basándose en un rango bastante liberal de contenido de GC (20-70 %) que soporta un potencial adecuado para un silenciamiento eficiente (>80 %), según lo determinado por la evaluación de datos de atenuación a gran escala para 2431 ARNsi diseñados aleatoriamente dirigidos a 31 ARNm únicos (datos no mostrados). Como con la mayoría de los algoritmos de diseño de ARNsi, las secuencias de ARNsi candidatas que satisfacen los criterios anteriores se someten a BLAST para evaluar el potencial de eventos de escisión inespecíficos mediados por una complementariedad casi perfecta con los ARNm no intencionados (para los parámetros de BLAST, véase Birmingham, A., E. Anderson, K. Sullivan, A. Reynolds, Q. Boese, D. Leake, et al. (2007). A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity. Nat Protoc 2(9):2068-78)).

Utilizando los criterios de diseño de ARNsi de los inventores (bajo POT de semilla, sesgo de hebra, y contenido de GC), los inventores identificaron inicialmente ocho secuencias candidatas dirigidas a htt para pruebas adicionales. Se incorporaron las secuencias de ARNsi en el contexto de los vectores de expresión basados en miARN artificiales impulsados por U6 de los inventores (Figura 2a) y los cribaron para determinar el silenciamiento génico frente a htt endógena en células HEK293 (Figura 3b). Los inventores observaron dos candidatos (HDS1 y HDS2, Tablas 3 y 4, y Figuras 7 y 8) que silencian de forma eficaz el ARNm de htt (~50 %, con respecto al control). De forma destacable, esta magnitud de silenciamiento *in vitro* contra htt endógena es comparable con los niveles alcanzados por otras secuencias de ARNi de htt (incluyendo HD2.4) que previamente mostraron eficacia terapéutica en modelos de ratón de EH (Harper, S.Q., P.D. Staber, X. He, S.L. Eliason, I. Martins, Q. Mao, et al. (2005). RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 102(16):5820-5825; Rodríguez-Lebrón, E., E.M. Denovan-Wright, K. Nash, A.S. Lewin, y R.J. Mandel (2005). Intrastriatal rAAV-mediated delivery of anti-huntingtin shRNAs induces partial reversal of disease progression in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. Mol Ther 12(4):618-633; Boudreau, R.L., J.L. McBride, I. Martins, S. Shen, Y. Xing, B.J. Carter, et al. (2009). Nonallele-specific silencing of mutant and wild-type huntingtin demonstrates therapeutic efficacy in Huntington's disease mice. Mol Ther 17(6):1053-63).

Análisis de micromatrices de inespecificidad relacionada con semilla

Para validar el bajo potencial de inespecificidad de estas secuencias eficaces (HDS1 y HDS2) y el esquema de diseño de ARNsi de los inventores, los inventores realizaron un análisis de micromatrices para evaluar el silenciamiento génico inespecífico relacionado con semilla. Los inventores incluyeron varias construcciones de ARNsi que se dirigen a la htt humana y diversas secuencias de control para ayudar a discernir el silenciamiento génico inespecífico de los cambios en la expresión génica que son resultado de la supresión de la htt (Tabla 1). Cabe destacar que, todas las secuencias utilizadas se diseñaron para promover la carga adecuada de la hebra antisentido para evitar el potencial de confusión de la inespecificidad mediada por la hebra pasajera. El grupo de silenciamiento de htt consistió en HDS1, HDS2, HD2.4 y HD8.2; los dos últimos se diseñaron previamente sin tener en cuenta la secuencia semilla y tienen >4500 POT cada uno (Figura 2c). El grupo de control (es decir, no dirigido a htt) consistía en varias secuencias (8.2mis, 8.2-124a, Terror, y Safe), cada una diseñada para servir a un único propósito (Tabla 1). 8.2mis contiene la misma semilla que HD8.2 pero tiene emparejamientos incorrectos centrales para evitar el silenciamiento de htt, mientras que 8.2-124a y Terror son secuencias desordenadas de HD8.2 que contienen respectivamente un imitador de semilla de miR-124a (un miARN de origen natural y altamente conservado) y una semilla con alto potencial de inespecificidad (es decir, complementa un hexámero altamente abundante en la 3'-UTRome humana). Cabe destacar que, 8.2-124a se incluyó como un control para detectar la inespecificidad relacionada con la semilla dentro de los datos de micromatrices y para subrayar la posible preocupación del diseño de ARNsi (controles desordenados o secuencias específicas) de manera que contengan involuntariamente semillas de miARN de origen natural. Finalmente, la construcción Safe contiene una secuencia arbitraria diseñada para tener un bajo potencial de inespecificidad basado en las frecuencias de hexámeros de 3'-UTR. Conjuntamente, estas construcciones proporcionan una amplia gama de potenciales de inespecificidad y abordan problemas que pueden surgir inadvertidamente cuando se incluyen secuencias desordenadas como controles en experimentos de ARNsi, una práctica de uso común.

Los inventores realizaron el perfil transcripcional en células HEK293 cultivadas 72 h después de la transfección con plásmidos de expresión de ARNsi (N = 4 por construcción). Inicialmente, los cambios en la expresión génica se detectaron mediante el análisis estadístico ANOVA utilizando todos los tratamientos incluidos en el estudio. Como se esperaba, htt fue consistente entre los transcritos más significativamente regulados negativamente en muestras tratadas con secuencias ARNsi dirigidas a htt ($P < 5 \times 10^{-11}$, con respecto U6), y estos datos de micromatrices fueron corroborados por la evaluación de QPCR de los niveles de ARNm de htt en las mismas muestras de ARN (Figura 4a). A continuación, los inventores realizaron un agrupamiento jerárquico utilizando genes expresados diferencialmente dentro del conjunto de datos ($P < 0.0001$, 827 genes) para medir la relación entre los diversos tratamientos. Estos incluyen cambios en la expresión génica que se producen como resultado de la atenuación de htt endógena además de eventos de inespecificidad específicos de secuencia. De forma destacable, se observó una relación más estrecha entre las secuencias de bajo potencial de inespecificidad (Safe, HDS1 y HDS2) y el control de promotor U6 en solitario en comparación con las secuencias restantes, que se diseñaron a ciegas (HD2.4 y HD8.2) o intencionalmente con potenciales de inespecificidad de medios a altos (8.2-124a y Terror). Estos resultados de agrupación apoyan una asociación clara entre el potencial de inespecificidad y el impacto en el perfil transcripcional (Figura 4b), lo que corrobora las observaciones de Anderson et al. (Anderson, E.M., A. Birmingham, S. Baskerville, A. Reynolds, E. Maksimova, D. Leake, et al. (2008). Experimental validation of the importance of seed complement frequency to siRNA specificity. *RNA* 14(5):853-61). Además, estos datos demuestran que los cambios relacionados con la inespecificidad no son más sólidos que los resultantes del silenciamiento de htt. La visualización del mapa de calor complementario puso de manifiesto la abrumadora cantidad de inespecificidad que provocó Terror y, en un grado ligeramente menor, 8.2-124a (Figura 4b). El solapamiento entre estas secuencias probablemente se deba a su similitud de semilla (Tabla 1), y los análisis posteriores confirmaron que gran parte de esta inespecificidad estaba relacionada con la semilla. Para las secuencias con potenciales de inespecificidad de bajos a medios, la relación entre los potenciales de inespecificidad y los perfiles de expresión génica se visualizó mejor eliminando las muestras de Terror y 8.2-124a del análisis ANOVA y repitiendo la agrupación jerárquica de genes expresados diferencialmente ($P < 0.01$, 985 genes) (Figura 4c). Con este enfoque, los mapas de calor mostraron firmas de supresión génica que eran únicas para cada una de estas secuencias, con la excepción de HD8.2 y 8.2mis. Como se ha señalado anteriormente, estas construcciones comparten la misma secuencia semilla, y esta superposición evidente afirma que gran parte de los cambios observados en la expresión génica están relacionados con las semillas, en lugar de ser causados por la atenuación de htt. Además, este ejemplo destaca la ventaja de diseñar secuencias de ARNsi específicas y de control que compartan la misma semilla. Esto conserva la falta de inespecificidad entre las dos secuencias y, por lo tanto, es beneficioso cuando se aplican herramientas basadas en ARNsi para estudiar la función génica o validar las dianas farmacológicas.

Los inventores evaluaron a continuación si los cambios observados en la expresión génica podrían explicarse mediante el silenciamiento génico mediado por semilla. Los análisis de distribución acumulativa de los niveles de expresión génica indicaron que los transcritos que contienen sitios de unión a semilla para la hebra antisentido en su 3'-UTR tenían una probabilidad mucho mayor de regularse negativamente (es decir, desplazamiento de la curva a la izquierda) (Figura 4d, parte superior y Figura 6), y el grado de regulación negativa dependía del número de sitios de unión presentes, consistente con informes anteriores que caracterizan el silenciamiento mediado por semilla de miARN de los transcritos diana. Los inventores también realizaron análisis de fracciones acumulativas para detectar el silenciamiento génico relacionado con las semillas causado por la hebra pasajera; en este caso, la presencia de sitios de unión a 3'-UTR tuvo poca o ninguna influencia detectable en la expresión génica, lo que respalda que el diseño del vector actual (es decir, dos pares de bases GC fuertes en el sentido 5' y dos pares de bases A/GU débiles en el sentido 3') promueve la desviación adecuada de la hebra (Figura 4d, parte inferior). Como un enfoque complementario para

detectar eventos de silenciamiento de genes relacionados con semillas, los inventores realizaron análisis de descubrimiento de motivos utilizando secuencias 3'-UTR de transcritos regulados negativamente para cada grupo de tratamiento. En todos los casos, los inventores encontraron un enriquecimiento significativo de motivos complementarios a las secuencias semilla respectivas en las 3'-UTR de transcritos regulados negativamente de manera única en relación con un conjunto de datos de 3'-UTR de fondo que consistía en todas las 3'-UTR humanas conocidas (Figura 4e y Figura 6b). Estos datos confirman que el silenciamiento génico inespecífico relacionado con semillas está presente en los conjuntos de datos para todas las secuencias de ARNi probadas. Tras una evaluación adicional, los inventores estimaron el número inespecificidades relacionadas con semillas para cada secuencia de ARNi mediante la identificación de transcritos que se regularon negativamente (1,1 veces, $P < 0,05$, con respecto U6) y contienen los complementos de semilla relevantes en su 3'-UTR (Tabla 2). Este análisis reveló que al utilizar el presente método de diseño de semillas "safe", HDS1 y HDS2 muestran casi una mejora logarítmica en la minimización de la inespecificidad relacionada con semillas, en comparación con los candidatos principales anteriores, HD2.4 y HD8.2.

15 Silenciamiento *in vivo* y seguridad de secuencias HDS

Habiendo identificado que HDS1 y HDS2 tienen sustancialmente menos inespecificidades relacionadas con semillas, los inventores probaron a continuación estas secuencias para el silenciamiento y la seguridad *in vivo* en cerebro de ratón. Los inventores inyectaron por vía intraestriatal AAV1-miHDS1, AAV1-miHDS2 o AAV1-miSafe (control) en dos cohortes de ratones de tipo silvestre. Cabe destacar que, HDS1 presenta complementariedad completa con el ratón, rhesus y secuencias de htt humana, por lo que es un candidato atractivo para las pruebas preclínicas. HDS2 solo se dirige a la htt humana, con emparejamientos incorrectos con las secuencias diana de ratón y rhesus correspondientes. Tres semanas después de la inyección, los inventores realizaron análisis de QPCR para evaluar la eficacia del silenciamiento génico en el tejido estriatal extraído de la primera cohorte de animales y observaron una atenuación significativa del ARNm de htt (~60 %) en ratones tratados con AAV1-miHDS1, con respecto a los ratones no inyectados y tratados con AAV1-miSafe (Figura 5a). De forma destacable, informes anteriores del laboratorio de los inventores y otros demuestran que ~60 % de silenciamiento de los transcritos de htt estriatal en modelos de ratón de EH reduce notablemente los niveles de proteína, dando como resultado una eficacia terapéutica apreciable. La segunda cohorte de ratones se sacrificó seis meses después de la inyección para evaluar la tolerabilidad del vector a largo plazo. La tinción para Ibal, un marcador para microglías en reposo y reactivas, no mostró evidencia de neurotoxicidad en las regiones transducidas del cuerpo estriado, con respecto al tejido no transducido cercano (Figura 5b; véase la Figura 1 para la comparación con miSCR, una secuencia tóxica con un alto potencial de inespecificidad). Estos resultados son alentadores considerando que HD2.4, que previamente demostró ser terapéuticamente eficaz en estudios a corto plazo, causó aumentos modestos pero aún detectables en la tinción de Ibal tanto en ratones de tipo silvestre como en ratones de EH. Además, los datos corroboran informes anteriores que demuestran que la reducción de los niveles de ARNm de htt de tipo silvestre en ~60 % en el cuerpo estriado de ratón no induce una neurotoxicidad manifiesta.

ANÁLISIS

Aunque la especificidad absoluta y la seguridad de los enfoques de ARNi sigue siendo cuestionable, los avances recientes en la comprensión de las toxicidades inducidas por ARNi (por ejemplo, saturación de la vía e inespecificidad) están facilitando a los investigadores idear estrategias para limitar estos eventos adversos. Por ejemplo, el descubrimiento de que la expresión de ARNsh de alto nivel causa la muerte en ratones (Grimm, D., K.L. Streetz, C.L. Jopling, T.A. Storm, K. Pandey, C.R. Davis, et al. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441(7092):537-41) impulsó a probar vectores alternativos basados en horquillas (por ejemplo, miARN artificiales) para determinar su capacidad para limitar la producción de sustratos de ARNi tras una administración basada en virus *in vivo*, dando como resultado de este modo una mejor tolerabilidad. Además, Anderson e tal evaluaron recientemente el impacto de las frecuencias del complemento de semilla de 3'-UTR en los potenciales de inespecificidad del ARNsi, utilizando un conjunto de secuencias de ARNsi diseñadas al azar que se dirigen a una diversidad de genes (Anderson, E.M., A. Birmingham, S. Baskerville, A. Reynolds, E. Maksimova, D. Leake, et al. (2008). Experimental validation of the importance of seed complement frequency to siRNA specificity. *RNA* 14(5):853-61). Se encontró que los ARNsi de bajo potencial de inespecificidad presentan una mayor especificidad según el perfil de ARNm, menor toxicidad y menos falsos positivos en cribados fenotípicos. Los autores propusieron que los ARNsi con bajas frecuencias de complemento de semilla mejoran la precisión de los cribados de ARNi para estudiar la función génica o validar las dianas farmacológicas. Aquí, los inventores aprovecharon estos hallazgos para diseñar deliberadamente ARNsi terapéuticos con bajos potenciales de inespecificidad, como un medio para promover la seguridad en el desarrollo preclínico de la terapia con ARNi para la EH. Los inventores identificaron dos candidatos (HDS1 y HDS2) que silencian de forma eficaz el ARNm de htt humano, inducen una mínima inespecificidad relacionada con semilla, y se toleran bien en el cerebro de ratón a largo plazo.

Aunque el trabajo de los inventores se emprendió inicialmente para desarrollar ARNsi con bajos potenciales de inespecificidad, se puede emplear una estrategia similar para diseñar intencionadamente los ARNsi con altas capacidades de inespecificidad (por ejemplo, secuencia Terror) para su uso como agentes antitumorales. Este enfoque puede impedir el escape del tumor al interrumpir ampliamente las vías celulares esenciales, en comparación con la administración de ARNsi dirigidos a oncogenes específicos.

Los investigadores que usan desencadenantes de ARNi en la investigación básica y traslacional a menudo emplean secuencias desordenadas como controles. El presente trabajo destaca la importancia de diseñar cuidadosamente los ARNsi de control, prestando atención a las secuencias semilla putativas que pueden inducir inadvertidamente un considerable silenciamiento inespecífico a través de mecanismos basados en miARN. Aquí, los inventores introdujeron intencionadamente una semilla de miARN conocida (8.2-124a) o una semilla con un alto potencial de inespecificidad (Terror) en secuencias de ARNsi desordenadas. Como cabía esperar, ambas indujeron alteraciones significativas relacionadas con semilla en los perfiles transcripcionales, en comparación con este vector de control (Safe) diseñado para exhibir un bajo potencial de inespecificidad. Además, se describe y se prueba el diseño de un vector de control de "la misma semilla" (8.2mis). Este enfoque dio como resultado una importante conservación de la inespecificidad en relación con la secuencia específica correspondiente (HD8.2). Estos datos fomentan el uso de controles de "la misma semilla" en futuros experimentos de ARNi.

Existen varias consideraciones clave que se aplican al diseño de ARNsi de semilla "safe". En primer lugar, el bajo potencial de inespecificidad no significa necesariamente no tóxico, ya que la identidad inespecífica sigue siendo una influencia crucial en la tolerabilidad. La capacidad mejorada de los inventores para identificar con precisión la alta probabilidad de inespecificidades permite seleccionar mejor los ARNsi candidatos, particularmente cuando hay varias secuencias de baja inespecificidad disponibles para una secuencia diana determinada. En segundo lugar, la seguridad observada en estudios de toxicidad preclínica en roedores o primates no humanos puede no garantizar el éxito en seres humanos, ya que las diferencias en las secuencias 3'-UTR crean perfiles de inespecificidad únicos para cada especie (Burchard, J., A.L. Jackson, V. Malkov, R.H. Needham, Y. Tan, S.R. Bartz, et al. (2009). MicroRNA-like off-target transcript regulation by siRNAs is species specific. *Rna* 15(2):308-15). Es importante tener en cuenta, que aunque las identidades inespecíficas pueden ser específicas de la especie, los potenciales de inespecificidad para cada hexámero siguen siendo muy consistentes, ya que las frecuencias de hexámeros entre varias especies (por ejemplo, ratón, rhesus y ser humano) muestran una variabilidad mínima (datos no mostrados). En tercer lugar, la ubicación de estos hexámeros raros puede ser difícil en pequeños transcritos diana y, por lo tanto, pueden ser necesarios otros medios para limitar la inespecificidad. Por ejemplo, varios informes han demostrado que ciertas modificaciones químicas en los nucleótidos de semilla reducen significativamente la inespecificidad de los ARNsi sintetizados químicamente (Jackson, A.L., J. Burchard, D. Leake, A. Reynolds, J. Schelter, J. Guo, et al. (2006). Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA* 12(7):1197-205; Bramsen, J.B., M.M. Pakula, T.B. Hansen, C. Bus, N. Langkjaer, D. Odadzic, et al. (2010). A screen of chemical modifications identifies position-specific modification by UNA to most potently reduce siRNA off-target effects. *Nucleic Acids Res* 38(17) :5761-73; Vaish, N., F. Chen, S. Seth, K. Fosnaugh, Y. Liu, R. Adami, et al. (2011). Improved specificity of gene silencing by siRNAs containing unlocked nucleobase analogs. *Nucleic Acids Res* 39(5): 1823-32). La posibilidad de combinar el diseño de semillas "safe" con modificaciones químicas sirve como una estrategia provocativa para desarrollar ARNsi sintéticos con una especificidad muy alta. Sin embargo, para el ARNi expresado, las modificaciones químicas no son aplicables, por lo tanto, el diseño de semillas "safe" proporciona los medios principales para limitar la inespecificidad de estos vectores basados en horquillas.

En resumen, El diseño de ARNsi de semillas "safe" tiene implicaciones significativas para el desarrollo terapéutico que puede dar como resultado importantes oportunidades de ahorro de tiempo y coste. Las moléculas pequeñas tradicionales se criban inicialmente para determinar su eficacia y después se prueban para determinar su seguridad, ya que predecir efectos secundarios potenciales sigue siendo un desafío debido a la naturaleza compleja de las interacciones de moléculas pequeñas. Por el contrario, la capacidad de los inventores para predecir la inespecificidad (derivada de un par de bases) para los fármacos basados en oligonucleótidos proporciona una oportunidad única para priorizar la seguridad durante el desarrollo del fármaco y posteriormente el cribado para determinar la eficacia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plásmidos y vectores virales

Los plásmidos que expresan miARN artificiales impulsados por U6 de ratón se clonaron como se ha descrito previamente utilizando los oligonucleótidos de ADN enumerados en la Tabla 5 (Boudreau, R.L., A. Mas Monteys, y B.L. Davidson (2008). Minimizing variables among hairpin-based RNAi vectors reveals the potency of shRNAs. *RNA* 14:1834-1844). Para la producción de AAV, los casetes de expresión de miARN artificiales se clonaron en plásmidos derivados de pFBGR que coexpresan GFP impulsado por CMV (Boudreau, R.L., I. Martins, y B.L. Davidson (2009). Artificial MicroRNAs as siRNA Shuttles: Improved Safety as Compared to shRNAs *In vitro* and *In vivo*. *Mol Ther* 17(1):169-17).

Los vectores de serotipo 2/1 de AAV recombinantes (AAV1-GFP, AAV1-miSCR, AAV1-miHDS1, y AAV1-miHDS2 se generaron por el University of Iowa Vector Core facility como se ha descrito previamente (Urabe, M., C. Ding, y R.M. Kotin (2002). Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther* 13(16):1935-1943). Los virus se purificaron inicialmente utilizando un gradiente de yodixanol (15-60 % p/v) y se sometieron a una purificación adicional a través de intercambio iónico utilizando membranas de MustangQ Acrodisc (Pall Corporation, East Hills, NY). Los vectores AAV1 se resuspendieron en el Tampón de formulación 18 (HyClone, Logan, UT), y los títulos (genomas virales por ml) se determinaron por QPCR.

Inyecciones de AAV y aislamiento del tejido cerebral

Todos los protocolos de animales fueron aprobados por el University of Iowa Animal Care and Use Committee. Los ratones FVB de tipo silvestre se inyectaron con vectores AAV1 como se informó previamente (Harper, S.Q., P.D. Staber, X. He, S.L. Eliason, I. Martins, Q. Mao, et al. (2005). RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 102(16):5820-5825; McBride, J.L., R.L. Boudreau, S.Q. Harper, P.D. Staber, A.M. Monteys, I. Martins, et al. (2008). Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: Implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(15):5868-73). Para todos los estudios, a menos que se indique de otro modo, a los ratones se les inyectó bilateralmente en el cuerpo estriado (coordenadas: 0,86 mm rostral con respecto al bregma, $\pm$ 1,8 mm lateral con respecto a la línea media, 3,5 mm ventral con respecto a la superficie del cráneo) 4 μ l de virus AAV1 (en $\sim 1 \times 10^{12}$ genomas virales/ml). Los ratones utilizados en los análisis histológicos se anestesiaron con una mezcla de ketamina/xilazina y se perfundieron por vía transcardial con 20 ml de solución salina fría al 0,9 %, seguido de 20 ml de paraformaldehído al 4 % en tampón de PO₄ 0,1 M. Los ratones se decapitaron, y los cerebros se extrajeron y se fijaron posteriormente durante una noche en paraformaldehído al 4 %. Los cerebros se almacenaron en una solución de sacarosa al 30 % a 4 °C hasta que se cortaron en un microtomo de cuchilla deslizante a 40 μ m de espesor y se almacenaron a -20 °C en una solución crioprotectora. Los ratones utilizados para los análisis de QPCR se perfundieron con 20 ml de solución salina fría al 0,9 %. Se extrajeron los cerebros y se seccionaron en cortes coronales de 1 mm de espesor utilizando una matriz cerebral (Roboz, Gaithersburg, MD). Se tomaron punciones de tejido del cuerpo estriado utilizando un núcleo de tejido (1,4 mm de diámetro) y se trituraron en 50 μ l de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). El ARN se aisló de las punciones de cuerpo estriado utilizando 1 ml de TRIzol.

Análisis inmunohistoquímicos

Se procesaron secciones coronarias de cerebro de flotación libre (40 μ m de espesor) para la visualización inmunohistoquímica de la microglía (anti-Iba1, 1:1000, WAKO, Richmond, VA). Todos los procedimientos de tinción se realizaron como se ha descrito anteriormente (McBride, J.L., R.L. Boudreau, S.Q. Harper, P.D. Staber, A.M. Monteys, I. Martins, et al. (2008). Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: Implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(15):5868-73), utilizando un anticuerpo secundario IgG anti-conejo de cabra (1:200) y el reactivo Vectastain ABC-peroxidasa (ambos de Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las secciones teñidas o sin teñir (estas últimas para la visualización de autofluorescencia de GFP) se montaron en portaobjetos Superfrost Plus (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) y se cubrieron con Gelmount (Biomedica, Foster City, CA) o Vectashield (Vector Laboratories). Las imágenes se capturaron utilizando un microscopio de luz Olympus BX60 y una cámara digital DP70, junto con el software Olympus DP Controller (Olympus, Melville, NY).

Análisis de distribución de hexámeros

Todas las identificaciones de RefSeq humanas, los símbolos de genes oficiales y las secuencias codificantes y 3'-UTR (Hg19, GRCH37) se obtuvieron y se usaron solamente secuencias con prefijos NM_* para el análisis. Para las secuencias 3'-UTR, la frecuencia no solapante de cada hexámero individual (4096 posibles) se contó para determinar el número de 3'-UTR que contenían un hexámero dado. Se consideró que los sitios no solapantes tienen en cuenta la disponibilidad real del sitio de unión. Para la secuencia codificante, se determinaron las frecuencias totales de hexámeros, permitiendo el solapamiento de hexámeros, para estimar la probabilidad de seleccionar secuencias de ARNs que contenían el hexámero especificado. Para genes con variantes (es decir, el mismo símbolo oficial del gen pero diferente número de acceso), se usó el recuento máximo para cada hexámero.

Cultivo y transfección celular

Para el cribado de HDS, las células HEK293 se cultivaron en placas de 24 pocillos en medios de crecimiento que contenían suero bovino fetal (FBS) al 10 % y se transfectaron por cuadruplicado con 400 ng de plásmido usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) añadiendo los complejos de lípido:ADN directamente al medio de crecimiento. Se aisló el ARN total 24 h después de la transfección utilizando 1 ml de Trizol. Para estudios de micromatrices, las células HEK293 se cultivaron en placas de 12 pocillos en medios de crecimiento (FBS al 10 %) y se transfectaron con 1 μ g de plásmido en condiciones sin suero. Los complejos de lípido:ADN se eliminaron 3 h más tarde y se reemplazaron con medios de crecimiento (FBS al 5 %). 72 h (micromatriz) después de la transfección, el ARN total se aisló utilizando 1 ml de TRIzol.

PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR)

La síntesis de ADNc de primera hebra cebada al azar se realizó con un total de 500 ng de ARN (kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad; Applied Biosystems, Foster City, CA) según el protocolo del fabricante. Los ensayos se realizaron en un sistema de detección de secuencias utilizando cebadores/conjuntos de sondas específicos para htt humana y GAPDH o htt de ratón y beta-actina (Prism 7900HT y TaqMan 2X Universal Master Mix; Applied Biosystems). La expresión génica relativa se determinó utilizando el método $\Delta\Delta C_T$, con normalización a los niveles de ARNm de GAPDH o beta-actina.

Análisis de micromatrices

El análisis de micromatrices se realizó con la asistencia de la University of Iowa DNA Facility (Iowa City, IA). Se utilizaron cincuenta nanogramos de plantilla de ARN total para producir ADNc amplificado utilizando el sistema de amplificación de ARN de biotina de Ovation, v2 (NuGEN Technologies) siguiendo el protocolo del fabricante. El producto de ADNc amplificado se purificó con DNA Clean y Concentrator-25 (Zymo Research). Se procesaron 3,75 µg de ADNc amplificado utilizando el Módulo de Biotina de ADNc de FL-Ovation v2 (NuGEN Technologies, San Carlos, CA) para producir ADNc antisentido marcado con biotina en fragmentos de 50 a 100 pb. Después de la desnaturalización a 99 °C durante 2 min, ADNc fragmentado y marcado se combinó con el oligómero de control de hibridación (b2) y los ARNc de control (*BioB*, *BioC*, *BioD*, y *CreX*) en tampón de hibridación y se hibridó con HuGene 1.0ST GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA) capaz de detectar más de 28,000 genes. Después de una incubación de 18 horas a 45 °C, las matrices se lavaron, se tiñeron con estreptavidina-ficoeritrina (Molecular Probes), y después se amplificaron con un anticuerpo anti-estreptavidina (Vector Laboratories) utilizando la Fluidics Station 450 (Affymetrix). Las matrices se escanearon con el escáner de Affymetrix Modelo 3000 y los datos se recopilaron con el software operativo GeneChip (GCOS) v. 1.4. Cada muestra e hibridación se sometió a una evaluación de control de calidad, incluido el porcentaje de conjuntos de sondas que detectan de manera fiable entre el 40 y el 60 % de la convocatoria actual y la relación 3'-5' del gen GAPDH inferior a 3.

Se utilizó Partek Genomics Suite (Partek GS, Saint Louis, MO) para preprocesar, normalizar y analizar datos de micromatrices. Las medidas de intensidad de fluorescencia sin procesar de matriz de Affymetrix de la expresión génica se normalizaron y se cuantificaron utilizando un fuerte análisis de múltiples matrices (RMA). Para identificar genes expresados diferencialmente entre los nueve grupos de tratamiento (N = 4 cada uno, Tabla 1), los inventores emplearon ANOVA bidireccional (variables: fecha de exploración y tratamiento), ya que las matrices se procesaron en grupos de cuatro (una réplica por tratamiento en cada grupo). Cuando se indicó, se realizaron contrastes pareados entre grupos de interés. Los componentes principales y los análisis de agrupamiento jerárquico se utilizaron para visualizar la expresión génica diferencial.

Análisis de distribución acumulativa

Se obtuvieron secuencias 3'-UTR para todos los ARNm de RefSeq en el chip HuGene 1.0 ST, y se determinó el número de sitios de unión al complemento de semilla no solapantes (octámeros) por 3'-UTR para cada uno de los ARN inhibitorios indicados. Se consideró que tres posibles octámeros para cada miARN artificial explicaban la flexibilidad en la escisión de Drosha y Dicer (Tabla 5). Los transcritos se analizaron en grupos según el número de complementos de semilla en su 3'-UTR (sin sitios, 1 sitio, 2+ sitios), y se representaron en gráfico las distribuciones acumulativas de los valores de expresión génica (cambio múltiplo Log2, con respecto a U6). Se realizaron pruebas de Kolmogorov-Smirnov (KS) de dos muestras para evaluar la significancia estadística de las desviaciones de distribución en relación con el valor inicial (sin sitios).

Descubrimiento de motivos

La característica del diagrama de Venn en Partek GS se usó para crear listas de genes regulados negativamente de forma única (1,1 veces, $P < 0,05$ o 1,2 veces, $P < 0,01$, con respecto a U6) para cada tratamiento, teniendo en cuenta el silenciamiento de htt (por ejemplo, HDS1, HDS2, HD2.4 y HD8.2 se incluyeron en un diagrama de Venn, y Safe, Terror, 8.2mis y 8.2-124a se incluyeron en otro). Las identificaciones de genes de conjunto se obtuvieron utilizando la herramienta de conversión de identificaciones de genes en el servidor web de David Bioinformatics Resources (Huang da, W., B.T. Sherman, Q. Tan, J.R. Collins, W.G. Alvord, J. Roayaei, et al. (2007). The DA VID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome Biol* 8(9):R183). Las identificaciones de genes de conjunto se sometieron a un análisis de ajuste de diana utilizando la plataforma de descubrimiento de motivos Amadeus (paquete de software Allegro) para identificar 8mers enriquecidos en las 3'-UTR de ajuste de diana, relativo al conjunto de datos de fondo de la 3'-UTR humana proporcionado (Halperin, Y., C. Linhart, I. Ulitsky, y R. Shamir (2009). Allegro: analyzing expression and sequence in concert to discover regulatory programs. *Nucleic Acids Res* 37 (5): 1566-79). Amadeus identificó a ciegas un enriquecimiento de los motivos del complemento de semilla para cada secuencia de ARNi analizada, y se informaron los valores p más bajos para los motivos relevantes.

Tabla 1. Construcciones de micromatrices.

Construcción	¿Se dirige a HTT?	Semilla Smer	Potencial de inespecificidad (N.º de OT*)	Propósito/razón de diseño
Promotor U6	No	N/E	N/E	Control de normalización
mHDS1	Sí	GUCGACCA	Bajo (495)	Nuevo candidato líder que contiene la semilla safe
miHDS2	Sí	AUAGUCGC	Bajo (1227)	Nuevo candidato líder que contiene la semilla safe

(continuación)

Construcción	¿Se dirige a HTT?	Semilla Smer	Potencial de inespecificidad (N.º de OT*)	Propósito/razón de diseño
miHD2.4	Sí	UAGACAAU	Medio (4688)	Candidato anterior seleccionado al azar
miHD8.2	Sí	AUAAACCU	Medio (5041)	Candidato anterior seleccionado al azar
mi8.2mis	No	AUAAACCU	Medio (5041)	Control de "la misma semilla" para la secuencia 8.2
mi8.2-124a	No	UAAGGCAC	Medio-alto (5519)	Secuencia 8.2 desordenada que contiene la semilla miR-124a
miTerror	No	AAGGCAGA	Alto (7218)	Secuencia 8.2 desordenada que contiene semillas tóxicas
miSafe	No	AAACGCGU	Bajo (662)	Secuencia aleatoria con inespecificidad mínima

*Número promedio de transcritos que contienen complementos de hexámero de semilla. Se consideraron tres posibles hexámeros para cada semilla 8mer para dar cuenta de la flexibilidad en el procesamiento de Drosha/Dicer.

Tabla 2. Resumen inespecífico. (*Genes regulados negativamente con el complemento de semilla 8mer en 3'-UTR)

Secuencia	N.º de inespecificidades*	Med. Pliegue Δ
HD8.2	79	-1,17
HD2.4	73	-1,17
HDS 1	7	-1,27
HDS2	12	-1,17
Safe	9	-1,18
Terror	450	-1,26

Tabla 3: Secuencias de miHDS que silencian eficazmente el ARNm de htt endógeno en células HEK293 (derivadas de ser humano)

			Secuencia de silenciamiento predicha	Secuencia de ARN antisentido predicha N.º 1	Ser humano (exón)	Rhesus (exón)	Ratón (exón)
miARN artificial miHDS.1			5'...cucgagugagcgaugcugcgcgaugcugcauacuguaaagccacagaugggugcugaccgaugcgcgagcaccgccuacuaga...3' SEQ ID NO:1	5'- gucgaccgaugcgcgagccagcac-3' SEQ ID NO:4	Si (44)	Si (51)	Si (44)
miHDS.2			5'...cucgagugagcgcucccgucacagcgcacuaauccguaaaagccacagauggggauagucgcugaugaccggcgaucgccuacuaga...3' SEQ ID NO:2	5'- auagucgcugau gaccgggau-3' SEQ ID NO:5	Si (61)	No	No
miHDS.5			5'...cucgagugagcgcucccuuguuuuacgacguggaucuguaaagccacagaugggaauuacgucguaaaacagaggaacgccuacuaga...3' SEQ ID NO:3	5'- uuacgucguaaa caagaggaa-3' SEQ ID NO:6	Si (3'UTR-larga)	No	No

Tabla 4: Secuencias de miHDS que silencian eficazmente el ARNm de *hlt* endógeno en células HEK293 (derivadas de ser humano)

Tabla 1. Secuencias de miRNAs que exhiben similitud con el ARN de longitud completa de pri-miR-125 (contando los 5' y 3' terminales)	
miARN artificial	Secuencia de Pri-miARN de longitud completa
miHDS.1	5' - GCGUUUAGUGAAACCGUCAGAUUGGUACCGUUUAAACUCGAGUGAGCGCAUGUCUGGUCGCAUGGUGCGAUACUGUAAAGCCACAGAG(GUCCAGCAUGCGAGCCAGCACCGCCUACUAGAGCGGCCGCCACAGCGGGGAGAUCCAGACAUAGAUAAAGAUACAUU-3' SEQ ID NO:10
miHDS.2	5' - GCGUUUAGUGAAACCGUCAGAUUGGUACCGUUUAAACUCGAGUGAGCGUCUCCGGUCAUCAGCGCAUUCUCCGUAAAGCCACAGAG(AUAGUCGUGAGUACCGGGGAUCGCGCUACUAGAGCGGCCGCCACAGCGGGGAGAUCCAGACAUAGAUAAAGAUACAUU-3' SEQ ID NO:11
Pri-miHDS.1	5' - CUCGAGUGAGCGGAUGUGCGCUGCAUGGUGCGAUACUGUAAAGCCACAGAUUGGGUGUCGACCAUGCGGAGCCAGCACCGCCUACUAGi 3' SEQ ID NO:33

TABLA 5. Secuencias de miARN artificial

miHDS1			
	A	A	GUAAAG
5' ...AGUG	GCG	UGCUGGCUCGCAUGGUCGAUACU	C
3' ...UCAU	CGC	ACGACCGAGCGUACCAGCUGUGG	C
	C	C	GUAGACA
Oligo 1: <u>aaaaactcgagtgcgctgctggctgcgcatggtcgatactgttaaagccacagatggg</u>			
Oligo 2: <u>aaaaactagtaggcggtgctggctgcgcatggtcgacacccatctgtggctttacag</u>			
Complementos de semilla antisentido de distribución acumulativa: ATGGTCTGA, TGGTCGAC, GGTCGACA			
miHDS2			
	A	C	GUAAAG
5' ...AGUG	GCG	UCCCGGUCAUCAGCGACUAUUC	C
3' ...UCAU	CGC	AGGGCCAGUAGUCGUGAUAGGG	C
	C	U	GUAGACA
Oligo 1: <u>aaaaactcgagtgcgctcccgtcatcagcgactattccgttaaagccacagatggg</u>			
Oligo 2: <u>aaaaactagtaggcgatcccgtcatcagcgactatcccatctgtggctttacag</u>			
Complementos de semilla antisentido de distribución acumulativa: AGCGACTA, GCGACTAT, CGACTATC			
miHDS3			
	A	G	GUAAAG
5' ...AGUG	GCG	UGCUCUUCUUGUCAGCGCUUUC	C
3' ...UCAU	CGC	ACGAAGAAACAGTCGCGCAGGGG	C
	C	G	GUAGACA
Oligo 1: <u>aaaaactcgagtgcgctgctcttctgtcagcgcttccgttaaagccacagatggg</u>			
Oligo 2: <u>aaaaactagtaggcgctgctcttctgtcagcgctcccatctgtggctttacag</u>			
miHDS4			
	A	A	GUAAAG
5' ...AGUG	GCG	CGGGGCAGCAGGAGCGGUAGACU	C
3' ...UCAU	CGC	GCCCCGUCGUCCUCGCCAUUUGG	C
	C	C	GUAGACA
Oligo 1: <u>aaaaactcgagtgcgagcggggcagcaggagcggtagactgttaaagccacagatggg</u>			
Oligo 2: <u>aaaaactagtaggcggcggggcagcaggagcggtaaacccatctgtggctttacag</u>			
miHDS5			
	A	C	GUAAAG
5' ...AGUG	GCG	UCCUCUUGUUUACGACGUGAUCU	C
3' ...UCAU	CGC	AGGAGAAACAAUGCUGCAUUAGG	C
	C	A	GUAGACA
Oligo 1: <u>aaaaactcgagtgcgctcctctgtttacgacgtgatctgttaaagccacagatggg</u>			
Oligo 2: <u>aaaaactagtaggcgttcctctgtttacgacgtaatcccatctgtggctttacag</u>			
miHDS6			
	A	C	GUAAAG
5' ...AGUG	GCG	GGGAUGUAGAGAGGCGUUAGUCU	C
3' ...UCAU	CGC	CCCUACAUCUCUCCGCAUUAGG	C
	C	A	GUAGACA
Oligo 1: <u>aaaaactcgagtgcgcggggatgtagagaggcggttagtctgttaaagccacagatggg</u>			
Oligo 2: <u>aaaaactagtaggcgtgggatgtagagaggcggttaatcccatctgtggctttacag</u>			
miHDS7			
	A	C	GUAAAG
5' ...AGUG	GCG	CCCUUGGAAUGCAUAUCGUUGCU	C
3' ...UCAU	CGC	GGGAACCUUACGUUAGCGAUGG	C
	C	A	GUAGACA
Oligo 1: <u>aaaaactcgagtgcgcccccttggaatgcatactgtgtgttaaagccacagatggg</u>			
Oligo 2: <u>aaaaactagtaggcgtcccttggaatgcatactgtacccatctgtggctttacag</u>			
miHDS8			
	A	C	GUAAAG
5' ...AGUG	GCG	ACGUGGACCUGCCUACGGAGGCC	C
3' ...UCAU	CGC	UGCACCUGGACGGAUGCCUUUGG	C
	C	U	GUAGACA

(continuación)

Oligo 1: aaaactcgaatgagccacatgacctgcctacggagggccgtaaaaccacagatggg

Oligo 2: aaaaactagtaggcgaacgtggacctgcctacggaaacccatctgtggtttacag

miHD2.4

A C GUAAG
 5' ...AGUG GCG ACCGUGUGAAUCAUUGUCUAAACU C
 3' ...UCAU CGC UGGCACACUUAGUACAGAUUGG C
 C A GUAGACA

Oligo 1: aaaactcgaqtgaacgcaccgtgtgaatcattgtctaactgtgaaccacagatgg

Oligo 2: aaaaactagtacgcctaccgtgtgaatcattgtctaaccatctgtgctttacag

Complementos de semilla antisentido de distribución acumulativa: CATTGTCT, ATTGTCTA, TTGTCTAA

miHD8.2

A A GUAAG
 5' ...AGUG GCG AGCAGCUUGUCCAGGUUUAUGCU C
 3' ...UCAU CGC UCGUCGAACAGGUCCAAUAUGG C
 C C GUAGACA

Oligo 1: aaaactcgagtgagcgaagcagcttgtccaggtttatgctgtgaagccacagatggg

Oligo 2: aaaaactagtagcgcggagcagcttctccaggtttatacccatctgtggctttacag

Complementos de semilla antisentido de distribución acumulativa: CAGGTTTA, AGGTTTAT, GGTTTATA

mi8.2mis

A A GUAAG
 5' ...AGUG GCG AGCAGCUGUGUUAGGUUAUGCU C
 3' ...UCAU CGC UCGUCGACACAAUCCAAUAUGG C
 C C GUAGACA

Oligo 1: aaaactcgactgaacgaacgaactatattagatttatctatgaaccacagatgg

Oligo 2: aaaaactatgtacgcgcacgctgtgttagctttatacccatctgtgcctttacag

Complementos de semilla antisentido de distribución acumulativa: TAGGTTTA, AGGTTTAT, GGTTTATA

mi8.2-124a

A A GUAAG
 5' ...AGUG GCG AGCUGUAGCUAUGUGCCUAGCU C
 3' ...UCAU CGC UCGACAUCGAUACACGGAAUUGG C
 C C GUAGACA

Oligo 1: aaaactcgaatgaacgaacctatagctatgtaccttaacctatgaaccacagatggg

Oligo 2: aaaaaactactagccggagctctatgctatgtgccttaacccatctgtgcctttacag

Complementos de semilla antisentido de distribución acumulativa: TGTGCCTT, GTGCCTTA, TGCCTTAA

miTerror

A C GUAAG
 5'...AGUG GCG AGCAGGAGUUAUUCUGCCUACU C
 3'...UCAU CGC UCGUCCUCAAUAAGACGGAUUG C
 C A GUAGACA

Oligo 1: aaaactcgaatgagcgcagcaggaattattctgccttactgtaaaaccacagatggg

Oligo 2: aaaaaactagtaggcctagccaggaattattctgccttaccatctgtgcctttacag

Complementos de semilla antisentido de distribución acumulativa: TTCTGCCT, TCTGCCTT, CTGCCTTA

miSafe

A C GUAAG
 5' ...AGUG GCG AGCGAACGACUUACGCGUUUACU C
 3' ...UCAU CGC UCGCUUGCUGAAUGCGCAAUGG C
 C A GUAGACA

Oligo 1: aaaactcgaagtgaacgcagcgaacgaacttacgcgtttactgtaaaagccacagatggg

Oligo 2: aaaaactagtaggcgtagcgaacgacttacgcgtttacccatctgtggcctttacag

Complementos de semilla antisentido de distribución acumulativa: TACGCGTT, ACGCGTTT, CGCGTTTA

miSCR

A C GUAAG
 5'...AGUG GCG ACCAUCGAACCGUCAGAGUUAU C
 3'...UCAU CGC UGGUAGCUUGGCAGUCUCAAUG C
 C A GUAGACA

Oligo 1: aaaactcgaatgagcgcaccatcgaaccctcagaattactctgaagccacagatggg

Oligo 2: aaaaactagttaggcgtaccatcgaaccgtcagagttaccatctgtggctttacag

Tabla 6 Estudio bibliográfico de ARNsi

Secuencia antisentido	Complemento de semilla 2-7	Complemento de semilla 3-8	SC 2-7 N.º de OT	3-8 SC N.º de OT	Diana	Referencia
TTCGATCTGTAGCAGCAGCTT	GATCGA	AGATCG	629	1104	HTT	[1]
GATCCGACTCACCAATACC	TCCGAT	GTCGGA	651	617	bcl-xl	[2]
TTCGGAATAAACTCCAGGCTT	TTCGGA	ATTCGG	937	704	PCSK9	[3]
ACGTAAACAAAGGACGTCC	TTTACG	GTTTAC	995	4054	VHB	[4]
AACGTTAGCTTACCACACATT	TAACGT	CTAACG	1112	668	c-myc	[5]
TAACGTAACAGTCGTAAGA	TACGTT	TTACGT	1193	1220	bim	[6]
ACAGCGAGTTAGATAAAGC	TCGCTG	CTCGCT	1505	1671	c-myc	[7]
CACACGGGCACAGACTTCCAA	CCGTGT	CCCGTG	2017	2023	HTT	[1]
AGGTGTATCTCCTAGACACTT	TACACC	ATACAC	2330	3366	PCSK9	[3]
TGTGCTACGTTCTACGAG	TAGCAC	GTAGCA	2828	3383	VHC	[8]
TGTGGACAAAGTCTCTTCC	GTCCAC	TGTCCA	2930	4899	Livina	[9]
TGATGTCATAGATTGGACT	GACATC	TGACAT	3143	5012	CCR5	[10]
TCTGATCTGTAGCAGCAGCTT	GATCAG	AGATCA	3261	4214	HTT	[1]
GGTAAGTGGCCATCCAAAGC	ACTTAC	CACTTA	3268	4049	bcl-xl	[2]
CGAGTTAGATAAAGCCCCCG	TAACTC	CTAACT	3319	3265	c-myc	[7]
TTAACCTAATCTCCTCCCC	AGGTTA	TAGGTT	3323	3480	VHB	[4]
TGATGATGGTCCGACAGACC	ATCATC	CATCAT	3496	4415	VHB	[4]
TATAGAGAGAGAGAGAAGA	CTCTAT	TCTCTA	3586	5271	K6a	[11]
TTGATCCGGAGGTAGGTCTTT	GGATCA	CGGATC	3593	859	PLK1	[12]
TTGGTATTCAAGTGTGATGA	ATACCA	AATACC	3636	3304	APOB	[13]
TTACTCTCAAACCTTTCCTC	AGAGTA	GAGAGT	3768	3885	XIAP	[9]
TATTGTAATGGGCTCTGTC	TACAAT	TTACAA	4118	5055	E6/E7	[14]

(continuación)

Secuencia antisentido	Complemento de semilla 2-7	Complemento de semilla 3-8	SC 2-7 N.º de OT	3-8 SC N.º de OT	Diana	Referencia
TGCCTTGGCAAACTTTCTT	CAAGGC	CCAAGG	4247	5408	EGFR1	[15]
ACCAATTTATGCCTACAGC	AATTGG	AAATTG	4273	6322	VHB	[4]
TTTGCTCTGTAGCAGCAGCTT	GAGCAA	AGAGCA	4298	5604	HTT	[1]
CCAATCTCAAAGTCATCAA	AGATTG	GAGATT	4391	4652	AuRkb	[15]
TAGTTATTCAGGAAGTCTA	ATAACT	AATAAC	4421	4198	APOB	[13]
AATCAAGTAGATCCTCCTCC	CTTGAT	ACTTGA	4458	5308	AuRkb	[15]
TGCATCTCCTTGCTACGC	AGATGC	GAGATG	4488	5464	bcl-xl	[2]
TCAAGCTCTGCAAACCAGA	AGCTTG	GAGCTT	4547	4427	CCR5	[10]
ATGATGATGGTGCGCAGAC	TCATCA	ATCATC	4561	3496	VHB	[4]
TCTTCTAGCGTTGAAGTACTG	TAGAAG	CTAGAA	4583	4684	HTT	[1]
TCTTCTAGCGTTGAATTACTG	TAGAAG	CTAGAA	4583	4684	HTT	[1]
GAATTGTTGCTGGTTGCACTC	ACAAAT	AACAAT	4647	4904	EGFR1	[15]
TAGGACTAGTCACCTTGTGC	AGTCCT	TAGTCC	4652	2822	K6a	[11]
TATAATGCTCAGCCTCAGA	CATTAT	GCATTA	4672	3567	K6a	[11]
TTTGATTTGTAGCAGCAGCTT	AATCAA	AAATCA	4735	6429	HTT	[1]
TTTTATCTGTAGCAGCAGCTT	GATAAA	AGATAA	4785	4877	HTT	[1]
GAGTCTCTTGTTCGGAAGC	GAGACT	AGAGAC	4790	5151	VEGF	[16]
TATCACTCTATTCTGTCTC	AGTGAT	GAGTGA	4846	4396	Survivina	[9]
TCACCTTCAAACCTATGTCC	AAGGTG	GAAGGT	4852	4063	XIAP	[9]
ATTGTCTTCAGGTCTTCAGTT	AGACAA	AAGACA	4855	5748	KSP	[12]
GCACTCCAGGGCTTCATCG	GGAGTG	TGGAGT	4944	5515	VEGF	[16]
AAGCCCCGAAACCGGCTT	GGGGCT	CGGGGC	5090	2013	c-myc	[7]
TTGTCCAGGAAGTCCTCAAGTCT	TGGACA	CTGGAC	5201	4750	PKN3	[17]

(continuación)

Secuencia antisentido	Complemento de semilla 2-7	Complemento de semilla 3-8	SC 2-7 N.º de OT	3-8 SC N.º de OT	Diana	Referencia
CCAAGGCTCTAGGTGGTCA	GCCTTG	AGCCTT	5235	5726	bcl-xl	[2]
GCACCACTAGTTGGTTGTC	GTGGTG	AGTGGT	5363	4425	TNFa	[18]
TCATCTCAGCCACTCTGCTTT	GAGATG	TGAGAT	5464	5351	DYT1	[19]
GTCATCTCAGCCACTCTGCTT	AGATGA	GAGATG	5535	5464	DYT1	[19]
AATGCAGTATACCTTCCTGA	CTGCAT	ACTGCA	5549	6053	VIH	[10]
CACAATGGCAGAGACTTCCAA	CATTGT	CCATTG	5565	4226	HTT	[1]
CACAATGGCGCAGACTTCCAA	CATTGT	CCATTG	5565	4226	HTT	[1]
TCTCCTCAGCCACTCTGCTTT	GAGGAG	TGAGGA	5692	5714	DYT1	[19]
CTCCTCAGCCACTCTGCTTTT	TGAGGA	CTGAGG	5714	6646	DYT1	[19]
TTCCCTCAAATCTTTCTTC	TGAGGA	TTGAGG	5714	5047	Survivina	[9]
TTGTACATCATAGGACTAG	TGTACA	ATGTAC	5725	4158	K6a	[11]
TTGTCTTTTGAGATCCATGC	AAGACA	AAAGAC	5748	5347	TNFa	[18]
TCAGCCCCACACAGTGCTTTG	GGGCTG	TGGGCT	5938	5481	ID2	[20]
TAACAAGCCAGAGTTGGTC	CTTGTT	GCTTGT	6008	4183	MAP4K4	[18]
TTCCAGAAATTGATACTGACTT	TCTGGA	TTCTGG	6027	6482	CCR5	[21]
TTTCCCTTGGCCACTTCTG	AGGGAA	AAGGGA	6352	5684	MAP4K4	[18]
AAGCAGAGTTCAAAAGCCCTT	TCTGCT	CTCTGC	6576	6743	bcr-abl	[22]
TTGGGGATAGGCTGTGCGCC	TCCCCA	ATCCCC	6591	3615	VHC	[23]
ATCTTCAATAGACACATCGGC	TGAAGA	TTGAAG	6618	5729	SOD1	[24]
TTCCCCAGCTCTCCCAGGC	TGGGGA	CTGGGG	6649	6671	CCR5	[10]
TTCCCCAAACCTGAAGCTC	TGGGGA	TTGGGG	6649	6070	VIH	[10]
TTCTTCTCATTTGACACC	AGAAGA	GAGAAG	6650	6048	CCR5	[10]
GTCCTGGATGATGATGTTTC	CCAGGA	TCCAGG	6819	5883	VEGF	[16]

(continuación)

Secuencia antisentido	Complemento de semilla 2-7	Complemento de semilla 3-8	SC 2-7 N.º de OT	3-8 SC N.º de OT	Diana	Referencia
ATTCAGGAATTGTTAAAG	CTGAAA	CCTGAA	6935	5757	APOB	[13]
CTTTCAGACTGGACCTCTC	CTGAAA	TCTGAA	6935	6689	Livina	[9]
ACTGAGGAGTCTCTTGATCTT	CCTCAG	TCCTCA	6986	5833	CD4	[21]
AAGCAAAACAGGCTAGAAAT	TTTGCT	TTTTGC	7110	6603	PCSK9	[3]
CCCTCCCTCCGTTCTTTTT	GGGAGG	AGGGAG	7153	6058	c-myc	[7]
GTTGTTTGCAGCTCTGTGC	AAACAA	CAACAA	7213	5301	E6/E7	[14]
ATTCTCTCTGACTCCTCTC	AGAGAA	GAGAGA	7338	5454	CCR5	[10]
TAATACAAAGACCTTTAAC	TGTATT	TTGTAT	7651	6954	VHB	[4]
TATTTAAGGAGGGTGATCTTT	TAAAT	CTTAAA	7880	6154	PLK1	[12]
AAGAAATCATGAACACCGC	ATTCT	GATTTC	8000	4935	ID2	[20]
TAAACAAAGGACGTCCCGC	TTGTTT	TTTGTT	8980	8926	VHB	[4]
AATTTTCAAAGTTCCAAT	AAAAAT	GAAAAA	9678	8159	APOB	[13]

REFERENCIAS CITADAS EN LA TABLA 6

1. Pfister, et al. (2009). Five siRNAs targeting three SNPs may provide therapy for three-quarters of Huntington's disease patients. *Curr Biol* 19(9):774-8.
- 5 2. Mu, et al. (2009). Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. *Int J Cancer* 125(12):2978-90.
3. Frank-Kamenetsky, et al. (2008). Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in non-human primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(33):11915-20.
- 10 4. Carmona, et al. (2009). Controlling HBV replication *in vivo* by intravenous administration of triggered PEGylated siRNA-nanoparticles. *Mol Pharm* 6(3):706-17.
5. Chen, Y., J.J. Wu, and L. Huang (2010). Nanoparticles targeted with NGR motif deliver c-myc siRNA and doxorubicin for anticancer therapy. *Mol Ther* 18(4):828-34.
6. Schwulst, et al. (2008). Bim siRNA decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis. *Shock* 30(2):127-34.
- 15 7. Napoli, et al. (2009). Promoter-specific transcriptional interference and c-myc gene silencing by siRNAs in human cells. *Embo J* 28(12):1708-19.
8. Yokota, et al. (2007). Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun* 361(2):294-300.
9. Yang, et al. (2010). Therapeutic potential of siRNA-mediated combined knockdown of the IAP genes (Livin, XIAP, and Survivin) on human bladder cancer T24 cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 42(2):137-44.
- 20 10. Ehsani, et al. (2010). Rational design of micro-RNA-like bifunctional siRNAs targeting HIV and the HIV coreceptor CCR5. *Mol Ther* 18(4):796-802.
11. Smith, et al. (2008). Development of therapeutic siRNAs for pachyonychia congenita. *J Invest Dermatol* 128(1):50-8.
- 25 12. Judge, et al. (2009). Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice. *J Clin Invest* 119(3):661-73.
13. Burchard, J., A.L. Jackson, V. Malkov, R.H. Needham, Y. Tan, S.R. Bartz, et al. (2009). MicroRNA-like off-target transcript regulation by siRNAs is species specific. *Rna* 15(2):308-15.
14. Jonson, et al. (2008). Gene silencing with siRNA targeting E6/E7 as a therapeutic intervention in a mouse model of cervical cancer. *Gynecol Oncol* 111(2):356-64.
- 30 15. Addepalli, et al. (2010). RNAi-mediated knockdown of AURKB and EGFR shows enhanced therapeutic efficacy in prostate tumor regression. *Gene Ther* 17(3):352-9.
16. Li, S.D., S. Chono, and L. Huang (2008). Efficient oncogene silencing and metastasis inhibition via systemic delivery of siRNA. *Mol Ther* 16(5):942-6.
- 35 17. Aleku, et al. (2008). Atu027, a liposomal small interfering RNA formulation targeting protein kinase N3, inhibits cancer progression. *Cancer Res* 68(23):9788-98.
18. Aouadi, et al. (2009). Orally delivered siRNA targeting macrophage Map4k4 suppresses systemic inflammation. *Nature* 458(7242):1180-4.
19. Hewett, et al. (2008). siRNA knock-down of mutant torsinA restores processing through secretory pathway in DYT1 dystonia cells. *Hum Mol Genet* 17(10):1436-45.
- 40 20. Gray, et al. (2008). Therapeutic targeting of Id2 reduces growth of human colorectal carcinoma in the murine liver. *Oncogene* 27(57):7192-200.
21. Kim, et al. (2010). RNAi-mediated CCR5 silencing by LFA-1-targeted nanoparticles prevents HIV infection in BLT mice. *Mol Ther* 18(2):370-6.
- 45 22. Koldehoff, et al. (2007). Therapeutic application of small interfering RNA directed against bcr-abl transcripts to a patient with imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Clin Exp Med* 7(2):47-55.
23. Kim, et al. (2009). Targeted delivery of siRNA against hepatitis C virus by apolipoprotein A-I-bound cationic liposomes. *J Hepatol* 50(3):479-88.
- 50 24. Wang, et al. (2008). Therapeutic gene silencing delivered by a chemically modified small interfering RNA against mutant SOD1 slows amyotrophic lateral sclerosis progression. *J Biol Chem* 283(23):15845-52.

EJEMPLO 2

ARNsi terapéuticos

Usando el método descrito en el Ejemplo 1 anterior, se determinaron secuencias adicionales de "semilla safe" para los genes diana indicados en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7

ID NO.	Gen diana	Sitio diana humano	SEQ ID NO
H D S1	HTT	GTCGTGGCTCGCATGGTCGAT	SEQ ID NO:34
HDS2	HTT	ATCCCGGTCATCAGCGACTAT	SEQ ID NO:35
HDS3	HTT	CTGCTTCTTTGTCAGCGCGTC	SEQ ID NO:36
HDS4	HTT	GCGGGGCAGCAGGAGCGGTAG	SEQ ID NO:37
HDS5	HTT	TTCCTCTTGTTCACGACGTGA	SEQ ID NO:38

(continuación)

ID NO.	Gen diana	Sitio diana humano	SEQ ID NO
HDS6	HTT	TGGGATGTAGAGAGGCGTTAG	SEQ ID NO:39
HDS7	HTT	TCCCTTGGGAATGCATATCGCT	SEQ ID NO:40
HDS8	HTT	AACGTGGACCTGCCTACGGAG	SEQ ID NO:41
HDS9	HTT	AGGGACAGTACTTCAACGCTA	SEQ ID NO:42
HDS10	HTT	TGGGGACAGTACTTCAACGCT	SEQ ID NO:43
HDS11	HTT	AAGGAGTTCATCTACCGCATC	SEQ ID NO:44
HDS12	HTT	GAGCTGGCTCACCTGGTTCGG	SEQ ID NO:45
HDS13	HTT	CTGCCCCAGTTTCTAGACGAC	SEQ ID NO:46
HDS14	HTT	TGCCCCAGTTTCTAGACGACT	SEQ ID NO:47
HDS15	HTT	GCCCCAGTTTCTAGACGACTT	SEQ ID NO:48
HDS16	HTT	CCCCAGTTTCTAGACGACTTC	SEQ ID NO:49
HDS17	HTT	CAGCTACCAAGAAAGACCGTG	SEQ ID NO:50
HDS18	HTT	CTGCTGTGCAGTGATGACGCA	SEQ ID NO:51
HDS19	HTT	ATGGAGACCCACAGGTTTCGAG	SEQ ID NO:52
HDS20	HTT	TTCCGTGTGCTGGCTCGCATG	SEQ ID NO:53
HDS21	HTT	TCCGTGTGCTGGCTCGCATGG	SEQ ID NO:54
HDS22	HTT	CTGGCTCGCATGGTCGACATC	SEQ ID NO:55
HDS23	HTT	CACCTTCAGAAGACGAGATC	SEQ ID NO:56
HDS24	HTT	AACCTTTTCTGCCTGGTCGCC	SEQ ID NO:57
HDS25	HTT	GAGGATGACTCTGAATCGAGA	SEQ ID NO:58
HDS26	HTT	CCGGACAAAGACTGGTACGTT	SEQ ID NO:59
SCA1.S1	ATXN1	AAGCAACGACCTGAAGATCGA	SEQ ID NO:60
SCA1.S2	ATXN1	CTGGAGAAGTCAGAAGACGAA	SEQ ID NO:61
SCA1.S3	ATXN1	AACCAAGAGCGGAGCAACGAA	SEQ ID NO:62
SCA7.S1	ATXN7	ACGGGACAGAATTGGACGAAA	SEQ ID NO:63
SCA7.S2	ATXN7	GTGGAAAAGATTTCATCCGAAA	SEQ ID NO:64
SCA7.S3	ATXN7	CAGGGTAGAAGAAAACGATTT	SEQ ID NO:65
SCA7.S4	ATXN7	CGGCTCAGGAAAAGAAACGCAA	SEQ ID NO:66
SCA2.S1	ATXN2	CCCCACATGGCCCCACGTACCT	SEQ ID NO:67
SCA2.S2	ATXN2	ATCCAATGCCCCATGCGCCAA	SEQ ID NO:68
SCA2.S3	ATXN2	CGCCAATGATGCTAATGACGA	SEQ ID NO:69
SCA2.S4	ATXN2	CAGCCCATTCCAGTCTCGACA	SEQ ID NO:70
SCA2.S5	ATXN2	ACCCCACATGGCCCCACGTACC	SEQ ID NO:71
SCA2.S6	ATXN2	AGCCCATTCCAGTCTCGACAA	SEQ ID NO:72
SCA2.S7	ATXN2	TCCAATGATATGTTTCGATA	SEQ ID NO:73
SCA2.S8	ATXN2	TCCAATGATATGTTTCGATA	SEQ ID NO:74

EJEMPLO 3**5 Seguridad preclínica de la supresión de HTT mediada por ARNi en el macaco Rhesus como terapia potencial para la enfermedad de Huntington**

Hasta ahora, una terapia para la enfermedad de Huntington (EH), un trastorno genético neurodegenerativo, sigue siendo difícil. La EH se caracteriza por la pérdida de células en los ganglios basales, con particular daño al putamen, un área del cerebro responsable de iniciar y refinar los movimientos motores. En consecuencia, los pacientes presentan un trastorno del movimiento hiperkinético. La interferencia de ARN (ARNi) ofrece un potencial terapéutico para este trastorno al reducir la expresión de *HTT*, el gen causante de la enfermedad. Previamente, se ha demostrado que la supresión parcial de *HTT* tanto de tipo silvestre como mutante en el cuerpo estriado previene anomalías neuropatológicas y conductuales en modelos de EH en roedores. Sin embargo, Dado el papel de la *HTT* en diversos procesos celulares, no se sabe si una supresión parcial de ambos alelos será segura en mamíferos cuya neurofisiología, anatomía de los ganglios basales, y el repertorio conductual se parecen más a los de un ser humano. Aquí, se investiga si una reducción parcial de la *HTT* en el putamen de primate no humano normal es segura. Se demuestra que una reducción del 45 % de la expresión de *HTT* de rhesus en el putamen medio y caudal no induce

déficits motores, degeneración neuronal, astrogliosis, o una respuesta inmunológica. Conjuntamente, estos datos sugieren que la supresión parcial de la expresión de *HTT* se tipo silvestre es bien tolerada en el putamen de primate y además soporta el ARNi como terapia para la EH.

- 5 La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo heredado predominantemente y mortal causado por una mutación por trinucleótidos expandidos (CAG) en el gen *HTT* en el cromosoma 4. La proteína codificada, huntingtina mutante (mHTT), contiene un tramo de poliglutamina expandida en el extremo N-terminal, confiriendo una ganancia de función tóxica. Con el tiempo, la mHTT induce la formación de inclusiones, disfunción celular y neurodegeneración a lo largo de los ganglios basales y la superposición de la corteza. La pérdida de células en la EH se acompaña de una regulación positiva de los astrocitos reactivos (astrogliosis) y la activación de la microglía, las células inmunes residentes del cerebro. Aunque la pérdida de células se observa en múltiples regiones del cerebro, la neuropatología es más pronunciada en las neuronas espinosas de tamaño medio del putamen y el caudado, regiones del cerebro que son críticas para el inicio y perfeccionamiento de los programas motores, el aprendizaje procedimental, y diversos aspectos de la función cognitiva. Por consiguiente, los pacientes con EH padecen movimientos hiperkinéticos involuntarios del torso, brazos, piernas y cara (conocidos como corea) con dificultades concomitantes de la marcha y la coordinación, déficit de memoria funcional, y una diversidad de trastornos emocionales.

Hasta ahora, la EH sigue siendo incurable. Si bien varias terapias han demostrado ser prometedoras en los modelos de roedor de la enfermedad, incluyendo antagonistas del glutamato, complementos bioenergéticos, inhibidores de caspasa, agentes antihistaminérgicos (ensayo HORIZON) y trasplante de tejido fetal, ninguno ha tenido un impacto significativo en la prevención de la enfermedad o la extensión de la esperanza de vida al evaluarse en ensayos clínicos. Como resultado, las estrategias de tratamiento actuales están dirigidas principalmente a los cuidados paliativos para tratar los síntomas de la enfermedad y mejorar las medidas de calidad de vida en el estadio terminal. Con el esclarecimiento de la mutación causante de la EH en 1993, las terapias ahora se pueden adaptar para reducir la expresión del propio gen perjudicial, lo que puede tener un mayor impacto clínico en comparación con las estrategias dirigidas a abordar las consecuencias aguas abajo de la mHTT.

Recientemente, ha quedado claro que los microARN pequeños (miARN) endógenos desempeñan una función vital en la regulación de la expresión de los genes durante el desarrollo, a lo largo de la edad adulta, y pueden contribuir a las patologías. La maquinaria endógena de miARN puede incorporarse y utilizarse para suprimir los genes de interés. La expresión exógena de miARN modificados como desencadenantes de la interferencia de ARN (ARNi) confiere una fuerte disminución en la expresión génica y se ha investigado como una herramienta terapéutica para silenciar la expresión de alelos de enfermedad. Indiscutiblemente, el mecanismo preferido para tratar la EH sería dirigirse específicamente al alelo mutante mientras se deja el alelo normal intacto. Como prueba de principio, el beneficio del silenciamiento específico de alelos ha sido demostrado por miembros de laboratorio del solicitante y otros en modelos de roedores de EH, en el que los ARN inhibidores se diseñaron para silenciar el transgén *mHTT* humano y no la *Htt* de ratón endógena. (Huang, et al. (2007). High-capacity adenoviral vector-mediated reduction of huntingtin aggregate load *in vitro* and *in vivo*. Hum Gene Ther 18: 303-311; Franich et al. (2008). AAV vector-mediated RNAi of mutant huntingtin expression is neuroprotective in a novel genetic rat model of Huntington's disease. Mol Ther 16: 947-956; Harper et al. (2005). RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. Proc Natl Acad Sci USA 102: 5820-5825). Adicionalmente, se han identificado varios polimorfismos de nucleótido único (SNP) que se diferencian hasta un 80 % de los alelos enfermos y normales en la población humana. (Pfister, et al. (2009). Five siRNAs targeting three SNPs may provide therapy for three-quarters of Huntington's disease patients. Curr Biol 19: 774-778). Sin embargo, la utilidad de estos SNP para las estrategias de silenciamiento basadas en ARNi no se ha probado *in vivo* y de forma importante, será inutilizable para un número significativo de pacientes con EH.

Por lo tanto, una estrategia alternativa es reducir parcialmente la expresión tanto del alelo mutante como del alelo normal en las regiones del cerebro más afectadas por la enfermedad, una terapia que sería aplicable a todos los pacientes con EH. Debido a que se ha encontrado que la HTT normal desempeña un papel funcional en el cerebro adulto, con los roles propuestos en la mediación de la transcripción y el transporte axonal, el tratamiento con ARNi no específico de alelo para la EH debe demostrar el beneficio terapéutico de reducir el alelo mutante, así como la seguridad y la tolerabilidad de suprimir parcialmente el alelo normal. Durante la última media década, se han utilizado vectores virales adeno-asociados recombinantes (rAAV) para administrar construcciones de silenciamiento de ARNi al cuerpo estriado y se ha demostrado que una reducción del 60 % de *mHtt* humana y *Htt* de ratón de tipo silvestre endógena se toleró bien e impidió déficits motores y neuropatológicos en modelos de ratón transgénico de EH. Además, la administración lentiviral de los ARN inhibitorios en un modelo de rata de EH confirió un 35 % de atenuación de la expresión del gen *Htt* (alelos tanto mutantes como de tipo silvestre) y fue segura y beneficiosa (beneficios neuroanatómicos y conductuales) hasta 9 meses después de la inyección. Además, los ratones atenuados de *Htt* heterocigotos son fenotípicamente normales, y los seres humanos con solo una copia de *HTT* (reducción del 50 % de la producción normal de HTT) no muestran déficits conductuales anormales, lo que sugiere que la reducción no específica de la expresión de HTT puede ser segura.

Mientras que los hallazgos de los modelos de roedor son alentadores, es esencial evaluar la seguridad de la supresión parcial de *HTT* en un animal que se asemeje más a los seres humanos con respecto al tamaño, anatomía, y neurofisiología de sus ganglios basales, así como sus capacidades conductuales antes de la evaluación del ARNi en

pacientes humanos con EH. Por lo tanto, en este estudio, se evaluó la seguridad de la expresión reducida de *HTT* en el putamen de macaco rhesus. Se demostró una reducción parcial sostenida de *HTT* en el putamen sin el desarrollo de fenotipos motores anormales, comportamiento circadiano alterado, déficit de habilidades motoras finas, pérdida neuronal, gliosis, o una respuesta inmunológica, aproximando de este modo el ARNi a la clínica como una terapia potencial para la EH.

RESULTADOS

Distribución de AAV2/1 y supresión de *HTT* en el putamen

Una secuencia que silencia *HTT* de ratón, rhesus y humana y una secuencia de control se clonaron en un esqueleto de miARN artificial basado en miR-30 y posteriormente se clonaron en vectores AAV, serotipo 1. (Boudreau, RL, Monteys, AM y Davidson, BL (2008). Minimizing variables among hairpin-based RNAi vectors reveals the potency of shRNAs. *RNA* 14: 1834-1844). La expresión del miARN específico de EH (miHDS1) y el miARN de control (miCONT) se impulsó por un promotor U6 de ratón. La GFP mejorada (eGFP) se impulsó a partir de un promotor de citomegalovirus (CMV) para permitir la evaluación de la distribución vectorial después de la inyección en el putamen. Tanto miHDS1 (que se dirige a una secuencia en el exón 52 del ARNm de *HTT* de rhesus) como miCONT (un miARN de control) se diseñaron utilizando las directrices de "semillas safe" para optimizar la seguridad y minimizar el posible silenciamiento génico inespecífico.

Antes de la evaluación *in vivo* en el putamen de macaco rhesus, en primer lugar se verificó la supresión del ARNm de *HTT* mediante transfección *in vitro* de plásmidos lanzadera de AAV que expresaban miHDS1, miCONT, o eGFP en células HEK293 humanas, así como fibroblastos primarios de rhesus generados en el Oregon National Primate Research Center (reducción del 50 % y el 32 % de la expresión relativa del ARNm de *HTT*/18S, respectivamente). Además, el 60 % de silenciamiento de la expresión de ARNm de *Htt* estriatal, sin toxicidad, se verificó 4 semanas después de la inyección de AAV2/1-miHDS1 en ratones transgénicos tanto de tipo silvestre como BACHD.

Tras la verificación de la supresión eficaz de ARNm de *HTT* *in vitro* y en ratones, once macacos rhesus recibieron inyecciones bilaterales estereotáxicas guiadas por IRM de cualquiera de AAV2/1-miHDS1 eGFP (miARN terapéutico, $n = 4$), AAV2/1-mi-CONT-eGFP (miARN de control, $n = 4$) o AAV-eGFP (control de vector viral, $n = 3$) en el putamen comisural y postcomisural (mitad posterior de todo el putamen). Los animales se evaluaron antes y durante seis semanas después de la cirugía en una diversidad de ensayos generales de conducta general y de habilidades motoras y se sacrificaron para realizar análisis moleculares (punciones de tejido tomadas del hemisferio izquierdo) e histológicos (secciones inmunoteñidas a través del hemisferio derecho). Las muestras de putamen transducidas con AAV2/1 (2 x 4 mm) se obtuvieron del hemisferio izquierdo de placas cerebrales coronales sin fijar en la autopsia. La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR) utilizando cebadores que flanquean el sitio de direccionamiento a miHDS1 en el exón 52 demostró una reducción significativa de los transcritos de ARNm de *HTT* de rhesus (45 %, $P < 0,01$) después de la inyección con AAV1-miHDS1 en comparación con el putamen tratado con AAV-eGFP de control. Se ha demostrado previamente, en experimentos separados, que los niveles similares de silenciamiento de los transcritos de *Htt* mutantes humanos o de tipo silvestre en el cuerpo estriado de ratón causan reducciones marcadas en las proteínas respectivas. (McBride et al. (2008). Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5868-5873; Boudreau et al. (2009). Non-allele-specific silencing of mutant and wild-type huntingtin demonstrates therapeutic efficacy in Huntington's disease mice. *Mol Ther* 17: 1053-1063). Se realizó una inmunohistoquímica de eGFP para evaluar la distribución del vector viral en los ganglios basales. Se observaron células eGFP positivas en todo el putamen medio y posterior, lo que indica la colocación precisa de las agujas durante la cirugía. La tinción de inmunofluorescencia, utilizando la fluorescencia eGFP como referencia, demostró la transducción de AAV2/1 en las neuronas de proyección espinosa de medio positivo a fosfoproteína neuronal (DARPP-32) y regulado por dopamina y AMPc, interneuronas colinérgicas grandes positivas a colina acetiltransferasa (ChAT), y astocitos positivos a proteína del ácido fibrilar glial (GFAP) en todo el putamen. Las células positivas a eGFP no se localizaron conjuntamente con microglías teñidas con IBA-1. Además de las neuronas positivas a eGFP, los astrocitos y fibras observados en el putamen, los cuerpos celulares positivos a eGFP y las fibras también se observaron en otras regiones de los ganglios basales que reciben proyecciones y que se proyectan en el putamen. Estas incluyen los segmentos internos y externos del globo pálido, el núcleo subtalámico (solo fibras), y la sustancia negra pars reticulata. La expresión de eGFP en la corteza se limitó a los tractos de la aguja, sugiriendo que AAV2/1 no se transportó de forma anterógrada y retrógradamente a la corteza, como se observó en otras regiones.

Se empleó una estereología imparcial para cuantificar la fracción de área de putamen que contenía células y fibras positivas a eGFP usando secciones en serie teñidas con anticuerpo anti-eGFP. Los resultados demostraron una fracción de área de células positivas a eGFP en el putamen comisural y postcomisural del $30 \pm 2,0$ % para animales inyectados con AAV-eGFP, $29 \pm 3,0$ % para animales inyectados con AAV-miCONT, y $30 \pm 3,0$ % para animales con AAV-miHDS1 sin diferencias significativas entre los grupos ($P > 0,05$). Además, se realizó la cuantificación del volumen estimado de putamen que contenía células y fibras positivas a eGFP. El volumen medio estimado de putamen transducido fue de $1,0e11 \pm 1,7e10 \mu m^3$ para animales inyectados con AAVGFP, $8,5e10 \pm 5,6e9 \mu m^3$ para animales inyectados con AAV-miCONT, y $9,9e10 \pm 1,6e10 \mu m^3$ para animales con AAV-miHDS1. No se encontraron diferencias significativas en el volumen entre los grupos de tratamiento ($P > 0,05$). Se creó un modelo tridimensional de putamen

transducido con AAV2/1 (solo en el hemisferio derecho) para cada animal utilizando el software Stereo Investigator. La representación tridimensional permite la visualización de los tres sitios de inyección, así como la propagación del vector después de la cirugía. La distribución anterior-posterior (A-P) de células positivas a eGFP, una medida unidimensional de la distribución de AAV2/1 de rostral a caudal, se determinó a partir de un hemisferio de cada uno de los once animales inyectados con AAV2/1. La distribución A-P media para el putamen transducido fue de $10,0 \pm 1,0$ mm para los animales inyectados con AAV-GFP, $9,5 \pm 1,0$ mm para animales con AAV-miCONT, y $9,5 \pm 0,58$ mm para animales con AAV-miHDS1 sin diferencias significativas en la diseminación entre grupos (Tabla 8, $P > 0,05$).

Tabla 8

Medición de la diseminación anterior-posterior de las regiones positivas a eGFP del putamen en animales individuales inyectados con AAV2/1-eGFP ($n = 3$), AAV-miHds1 ($n = 4$), o AAV2/1-micont ($n = 4$)		
Identificación del animal	Grupo	Diseminación A-P (mm)
Rh24522	AAV2/1-eGFP	10,0
Rh24906	AAV2/1-eGFP	9,0
Rh25433	AAV2/1-eGFP	11,0
Media $\pm$ DE		$10 \pm 1,0$
Rh24277	AAV2/1-miHDS1	10,0
Rh24353	AAV2/1-miHDS1	9,0
Rh24530	AAV2/1-miHDS1	9,0
Rh25300	AAV2/1-miHDS1	10,0
Media $\pm$ DE		$9,5 \pm 0,58$
Rh24377	AAV2/1-miCONT	9,0
Rh25150	AAV2/1-miCONT	11,0
Rh25388	AAV2/1-miCONT	9,0
Rh25416	AAV2/1-miCONT	9,0
Media $\pm$ DE		$9,5 \pm 1,0$

La supresión de *HTT* no induce déficits en las habilidades motoras

Para evaluar si la supresión parcial de *HTT* en el putamen, una región del cerebro muy involucrada en el inicio, ejecución y refinamiento del movimiento motor, induce perturbaciones motoras, se utilizaron diversos ensayos conductuales para evaluar a los monos antes y durante las seis semanas después de la cirugía. Se eligen ensayos de conducta que permitieron la detección de cambios en los movimientos de todo el cuerpo en la jaula en un lapso de 24 horas, movimientos coordinados más específicos de los brazos y piernas y tareas aprendidas que requieren niveles más altos de destreza de los antebrazos y los dedos.

Para recopilar la actividad en la jaula diurna y nocturna, los animales se equiparon con collares de nylon o aluminio que albergaban un acelerómetro Actical incorporado. Todos los monos llevaron collares de actividad durante 3 semanas antes de la cirugía. El monitor Actical contiene un sensor omnidireccional que integra la velocidad y la distancia de aceleración y produce una corriente eléctrica que varía en magnitud dependiendo de un cambio en la aceleración. Los monitores se programaron para almacenar el número total de recuentos de actividad durante cada tiempo de 1 minuto. Para la actividad diurna, un ANOVA de medidas repetidas no detectó diferencias significativas entre los grupos de tratamiento, $F(2,64) = 0,17$, $P = 0,84$, sugiriendo que una reducción parcial de la *HTT* en el putamen comisural y postcomisural no altera los niveles generales de actividad en la jaula en comparación con los controles. Un efecto significativo se indicó por el tiempo, $F(8, 64) = 2,4$, $P < 0,05$, y las comparaciones pareadas de Holms-Sidak mostraron que la actividad diurna durante la semana inmediatamente posterior a la cirugía (+1) fue significativamente menor que la actividad exhibida durante la semana -2 ($P < 0,001$) o la semana +5 ($P < 0,001$), probablemente debido a una pequeña disminución en la actividad diurna general mientras que los animales se recuperaban de la cirugía. No se observaron diferencias grupales ($P = 0,45$). Asimismo, para la actividad nocturna en la jaula, un ANOVA de medidas repetidas no indicó diferencias significativas entre los grupos de tratamiento $F(2,64) = 0,189$, $P = 0,83$, ni a lo largo del tiempo $F(8,64) = 1,43$, $P = 0,20$. De forma similar, no se indicó ninguna interacción ($p = 0,64$). Además de la actividad general circadiana en la jaula, el peso corporal de cada animal se registró en el momento de la cirugía y en la necropsia, y no se detectó disminución de peso en ningún animal ($P > 0,05$).

Los cambios potenciales en las habilidades motoras finas de las extremidades anteriores izquierda y derecha y los dedos se evaluaron mediante la prueba Lifesaver de destreza manual originalmente descrita por Bachevalier et al. (1991, Aged monkeys exhibit behavioral deficits indicative of widespread cerebral dysfunction. *Neurobiol Aging* 12: 99-111) y se modificaron adicionalmente por Gash y colaboradores (1999, An automated movement assessment panel for upper limb motor functions in rhesus monkeys and humans. *J. Neurosci Methods*, 89: 111-117). Los animales fueron transportados de sus jaulas a un aparato de pruebas generales de Wisconsin en una sala de conducta separada

y se entrenaron para retirar golosinas redondas duras de una varilla metálica recta (poste recto). Para el poste recto, los animales se evaluaron 2 semanas antes de la cirugía para recopilar datos de referencia y semanalmente durante 6 semanas después de la cirugía (dos ensayos por extremidad anterior cada día, dos veces a la semana). No se detectaron diferencias estadísticas en las latencias para eliminar los estímulos de los postes entre las manos derecha e izquierda. En consecuencia, los datos de las manos derecha e izquierda dejaron de funcionar y se utilizaron promedios para todos los análisis. Un ANOVA de medidas repetidas bidireccional indicó un efecto principal significativo del tiempo en los ensayos de prueba, $F(6, 48) = 27,5$, $P < 0,0001$, lo que indica que los animales de todos los grupos de tratamiento eliminaron la golosina del poste con latencias más cortas (rendimiento más rápido) a medida que avanzaba el estudio. Por el contrario, no se encontraron efectos significativos entre los grupos de tratamiento, $F(2,48) = 0,07$, $P = 0,99$, ni para una interacción ($P = 0,55$), lo que indica que los animales tratados con AAV-miHDS1 rindieron con la misma velocidad que los animales de ambos grupos de control. Para la tarea Lifesaver usando el poste en forma de interrogación, los animales no recibieron entrenamiento antes de la cirugía, por lo que se pudo evaluar la capacidad de cada animal para aprender una tarea nueva y más difícil (aprendizaje procedimental) después de la inyección de AAV-miHDS1 en el putamen. Comenzando 2 semanas después de la cirugía y después cada semana, se registraron las latencias para retirar con éxito cada golosina del poste con forma de signo de interrogación (dos pruebas por extremidad anterior cada día, dos veces por semana). Un ANOVA bidireccional de medidas repetidas no pudo indicar diferencias significativas entre los grupos, $F(2,28) = 0,573$, $P = 0,58$, o en los ensayos de prueba, $F(4,28) = 0,61$, $P = 0,652$ ni para una interacción ($P = 0,93$). Estos datos muestran que los animales de todos los grupos de tratamiento pudieron completar la tarea del poste en signo de interrogación con la misma velocidad y que la supresión de la *HTT* no alteró la capacidad de los animales tratados con AAV-HDS1 para (1) aprender una nueva tarea de conducta o (2) presentar habilidades motoras finas en una tarea difícil en comparación con los controles.

Además, se desarrolló una escala de clasificación motora preclínica (MRS) específica de primate no humano que se modificó a partir de la escala de clasificación de la enfermedad de Huntington unificada utilizada para evaluar el rendimiento motor en pacientes con EH. Se diseñó la MRS para evaluar específicamente los fenotipos de conducta basados en putamen en monos, incluyendo el seguimiento ocular horizontal y vertical, tratar la recuperación con ambas extremidades anteriores, capacidad de soportar peso en ambas extremidades posteriores, la postura, el equilibrio, y la respuesta de sobresalto. Además, la escala incluye los fenotipos motores negativos observados en la EH o los casos de disfunción del putamen, incluida la bradicinesia (lentitud del movimiento), distonía (contracción muscular involuntaria y sostenida), y corea (movimiento involuntario, hipercinético) de cada extremidad y el tronco. Las puntuaciones posibles variaron de 0 (fenotipo normal) y 3 (fenotipo gravemente anormal) para un total de 72 puntos posibles. Los animales se clasificaron en tres observadores independientes cegados al grupo de tratamiento y familiarizados con los repertorios de conducta de los primates no humanos; la fiabilidad entre evaluadores fue del 100 %. Todos los animales se evaluaron en sus jaulas y se evaluaron una vez antes de la cirugía y cada semana a partir de entonces durante la duración del estudio. El análisis estadístico de Kruskal-Wallis reveló una diferencia significativa entre los tres grupos de tratamiento ($H(2) = 9,30$, $P = 0,010$). Sin embargo, esta diferencia se debe a un animal inyectado con AAVmiCONT que presentó una distonía muy leve pero progresiva en una pata trasera (animal 25150). La comparación pareada de Dunn no muestra diferencias entre los animales inyectados con AAV-miHDS1 en comparación con los controles inyectados con AAV-eGFP, demostrando que una supresión parcial de *HTT* en el putamen medio y posterior no alteró el comportamiento normal basado en el putamen ni indujo fenotipos enfermos comúnmente observados con disfunción neuronal o degeneración en el putamen.

La supresión de la *HTT* no causa degeneración neuronal, gliosis, o inflamación.

Para abordar si la reducción de *HTT* en las células del putamen causó degeneración neuronal, se evaluó la neurotoxicidad potencial mediante tinción inmunohistoquímica para eGFP para identificar regiones transducidas del putamen, NeuN (marcador neuronal), GFAP (marcador astrocítico), e Ibal (marcador microglial). La sección del cerebro coronal se tiñó utilizando inmunohistoquímica DAB estándar, y las secciones adyacentes se compararon en busca de signos de pérdida neuronal, aumentos en la proliferación de astrocitos (astrocitos reactiva) o aumentos en la microglía reactiva en monos tratados con AAV-miHDS1 en comparación con los controles. En comparación con los controles inyectados con AAV-eGFP y AAV-miCONT, los animales inyectados con AAV-miHDS1 no mostraron pérdida de neuronas positivas a NeuN en el putamen. La tinción con violeta de cresilo (Nissl) de las secciones adyacentes del cerebro coronal respaldó además la falta de pérdida neuronal. Para evaluar si la supresión parcial de *HTT* se asoció con disfunción celular, en contraste con la pérdida neuronal franca, se realizó un análisis de QPCR para DARPP-32, una proteína altamente expresada en las neuronas de proyección GABA-érgicas del putamen. DARPP-32 es un mediador clave en numerosas cascadas de transducción de señales, y su regulación negativa se ha informado en casos de disfunción neuronal espinosa media en ausencia de la regulación negativa de NeuN. En consecuencia, DARPP-32 es una lectura válida y fiable de la función neuronal en el putamen. El análisis de QPCR de las regiones transducidas del putamen no encontró una disminución significativa de la expresión del ARNm de DARPP-32 en monos inyectados con AAV-miHDS1 en comparación con los controles ($P > 0,05$).

Las secciones teñidas coronales de todos los grupos de tratamiento mostraron un leve aumento de los astrocitos positivos a GFAP en las regiones transducidas, probablemente debido a la propia inyección y no a una reducción de la *HTT*, ya que se observó una astrocitosis igual en todos los grupos. Las secciones teñidas con IBA-1 de los animales de cada grupo no mostraron aumentos en la microglía activada, a excepción de dentro de los tractos de inyección, probablemente debido a la perturbación física del parénquima por la aguja. Para evaluar más a fondo la inflamación,

la expresión de las citocinas proinflamatorias interleucina 1- β (IL1- β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) se midió a partir de regiones transducidas. Ambas de estas citocinas están reguladas positivamente y se liberan de los astrocitos y las microglías en respuesta a las neuronas adyacentes y alteradas en el cerebro. El análisis de QPCR no mostró aumentos significativos en IL1- β ($P > 0,05$) o TNF- α ($P > 0,05$) en monos tratados con AAV-miHDS1 en comparación con los animales control con AAVeGFP. Curiosamente, los monos inyectados con AAV-miCONT mostraron una disminución significativa en la expresión de TNF-alfa en comparación con los animales tanto AAV-eGFP- ($P < 0,05$) como AAV-miHDS1- ($P < 0,05$).

Falta de respuesta inmunológica periférica después de la administración de AAVI-miARN al putamen

Estudios anteriores han demostrado que los linfocitos T periféricos se infiltran en el cerebro después de una lesión o infección. Por lo tanto, además de ensayar las respuestas inflamatorias e inmunológicas locales en el putamen, se evaluaron las respuestas humerales y mediadas por células para determinar si la supresión mediada por AAV de HTT indujo respuestas inmunológicas periféricas. Los niveles relativos de expresión de ARNm CD4 y CD8 se determinaron mediante QPCR para determinar si la supresión de AAV de *HTT* indujo la infiltración de linfocitos T auxiliares periféricos o citotóxicos, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en la expresión de ARNm CD4 o CD8 en muestras de putamen transducidas ($P > 0,05$). Además, no se observaron infiltrados inflamatorios en las secciones teñidas con Nissl de los animales tratados. Para probar si los anticuerpos anti-AAV fueron inducidos después de la inyección, se realizó un ensayo de anticuerpos neutralizantes *in vitro* (Nab) en suero extraído de cada animal inmediatamente antes de la cirugía y en la necropsia (6 semanas después de la inyección). Las células HuH7 se infectaron con AAV2/1 que expresaba LacZ en presencia de diluciones seriadas de suero de rhesus. El ensayo de transducción mostró que la cohorte de macacos rhesus utilizados para este estudio mostró niveles variables de anticuerpos neutralizantes contra AAV2/1 en su suero antes de la cirugía, variando de títulos indetectables ($< 1:5$) hasta el título más alto de 1:160. Cuatro de los 11 animales mostraron aumentos en los niveles de AAV2/1 Nab en la autopsia, pero estos aumentos fueron menores (de dos a cuatro veces). Ni los niveles prequirúrgicos de Nab ni el cambio múltiple en la expresión de Nab desde antes de la cirugía a la necropsia se correlacionaron con los niveles de expresión de eGFP en el putamen (correlación de Pearson, $r = -0,24$, $P = 0,49$ y correlación de Spearman ($r = 0,01$, $P = 0,9$, respectivamente).

ANÁLISIS

Aquí, se presentan datos novedosos que muestran que una reducción parcial de la expresión de *HTT* en el putamen de macaco rhesus se tolera bien hasta 6 semanas después de la inyección. Se utilizó un enfoque multifacético para evaluar la capacidad del ARNi para reducir la *HTA* y determinar si dicha supresión induciría consecuencias conductuales o neuropatológicas mediante la combinación de ensayos de habilidades motoras finas y gruesas con análisis inmunohistoquímicos postmortem, estereológicos, y moleculares de perfiles neuronales, gliales, e inmunes. Esta construcción de silenciamiento, miHDS1, se diseñó de tal forma que la secuencia de ARNm diana muestra homología con la *HTT* de roedor, macaco rhesus y humana. Por lo tanto, la reducción de *HTT* y la tolerabilidad se pueden evaluar sin problemas en ratones transgénicos y primates no humanos. De manera importante, la misma secuencia evaluada preclínicamente puede utilizarse para evaluar la seguridad de la supresión de *HTT* en un ensayo clínico de fase 1.

La selección de estos sitios de inyección en el putamen medio y posterior se basó en el gradiente funcional rostral-caudal del putamen del primate. Las lesiones del aspecto posterior del putamen con excitotoxinas o la administración mediada por lentivirus de Htt mutada provocan hiperactividad, movimientos coreiformes, estereotipias y/o movimientos discinéticos de las extremidades (ya sea espontáneamente o después de la administración de apomorfina). De forma correspondiente, se ha observado previamente disfunción motora detectada a través del ensayo Lifesaver y la MRS después de una pérdida neuronal moderada en el putamen medio y posterior (resultados no publicados del laboratorio del solicitante). Por el contrario, las lesiones del putamen anterior no producen discinesias similares. Estos efectos dispares se corresponden con las entradas al putamen medio y posterior de las cortezas sensoriomotoras primarias, incluidas las áreas premotora y motora suplementaria, así como el área motora primaria. Por el contrario, el putamen de primate anterior recibe entradas corticales de las áreas de asociación frontal, las cortezas prefrontales dorsolaterales, y el área motora presuplementaria. En consecuencia, para evaluar la tolerabilidad de la supresión parcial de *HTT* en el putamen medio y posterior, se emplearon tres pruebas de conducta que evalúan las conductas asociadas con el putamen. En primer lugar, para evaluar los cambios potenciales en la actividad general, se evaluó continuamente la actividad en la jaula durante el experimento utilizando monitores de actividad omnidireccionales colocados en collares en los animales. No se encontraron diferencias en la actividad diurna o nocturna entre los grupos.

En un esfuerzo por detectar anomalías más sutiles del uso de las extremidades, el tono muscular, movimientos oculares, postura o equilibrio, se diseñó una MRS basada en la escala de clasificación motora de la enfermedad de Huntington unificada clínica. Esta rúbrica evaluó 24 conductas discretas y reveló que 10 de los 11 animales no mostraron anomalías de conducta. Un animal de control inyectado con AAV-miCONT (n.º 25150) mostró una distonía leve en su pata izquierda. El aumento del tono muscular en la pierna se observó el día 12 posterior a la cirugía y puede ser el resultado de un traumatismo, infección por el procedimiento quirúrgico o una perturbación en el putamen debido a la propia inyección.

Para desafiar la integridad funcional del putamen medio y posterior y sus circuitos, todos los animales fueron entrenados para realizar la tarea Lifesaver. La tarea requiere que los animales realicen rápidamente una secuencia de movimientos musculares en el brazo, mano, y dedos para obtener un refuerzo. Para la tarea de poste recto, los animales fueron entrenados durante 21 días antes del inicio del experimento en un esfuerzo por aumentar la eficiencia de los animales, la habilidad, y la velocidad de ejecución. La evidencia sugiere que los movimientos secuenciales de la mano sobreaprendidos requieren la integridad funcional del putamen sensorimotor posterior en monos y en seres humanos. De acuerdo con la actividad en las jaulas y las calificaciones motoras, no hubo diferencias en el rendimiento de la tarea de poste recto entre los animales HDS1 y los controles, apoyando de nuevo la noción de que la atenuación de la *HTT* normal en el putamen medio y posterior no disminuye significativamente la integridad funcional de sus circuitos.

En contraste con las regiones posteriores, se sabe que los niveles anterior y medio del putamen desempeñan un papel esencial en el aprendizaje de nuevas secuencias de movimientos de las manos. Mientras que estas inyecciones intraputamen no cubrían todo el putamen anterior, La transfección de eGFP se observó en secciones de ~3 mm rostrales con respecto a la comisura anterior. Por lo tanto, para evaluar la posible alteración de un circuito de aprendizaje procedimental, se presentó un nuevo poste en forma de interrogante 2 semanas después de la cirugía. A pesar de no haber sido entrenados en el poste con distinta forma, todos los grupos aprendieron con éxito a realizar la tarea a velocidades iguales, sugiriendo que los circuitos de putamen relevantes estaban funcionalmente intactos. Por lo tanto, consistente con la actividad en las jaulas y los datos de calificación motora, la atenuación parcial de la *HTT* endógena en el putamen medio y posterior no disminuyó la ejecución de una tarea motora aprendida previamente ni obstaculizó la adquisición de una nueva tarea de destreza manual.

Se observó la fuerte expresión de eGFP tanto en las neuronas como en los astrocitos en todo el putamen comisural y postcomisural después de la inyección de cada construcción. Aquí, AAV2/1 transdujo tanto neuronas de proyección espinosas medias positivas a DARPP-32 positivas como interneuronas no espinosas grandes positivas a ChAT. Mientras que las neuronas espinosas medias muestran la pérdida de células más drástica en la EH, las neuronas colinérgicas grandes también se ven afectadas por la mHTT. Las interneuronas colinérgicas presentan niveles reducidos de ChAT y niveles reducidos de liberación de acetilcolina en modelos de ratón transgénico de EH, así como pacientes con EH. En contraste con los hallazgos presentados aquí, y por otros grupos (Dodiya, et al. (2010). Differential transduction following basal ganglia administration of distinct pseudotyped AAV capsid serotypes in nonhuman primates. Mol Ther 18: 579-587) utilizando eGFP como un gen indicador, se observó principalmente la transducción astrocítica después de la inyección de AAV2/1 que expresaba GFP de renilla humanizada (hrGFP) en el putamen de macaco cynomolgus. (Hadaczek, et al. (2009). Transduction of nonhuman primate brain with adeno-associated virus serotype 1: vector trafficking and immune response. Hum Gene Ther 20: 225-237.) Además, también se observó una fuerte respuesta de anticuerpos anti-hrGFP, junto con la infiltración de linfocitos CD4+ y las respuestas microgliales locales, sugiriendo que hrGFP puede tolerarse menos en el putamen de primate no humano en comparación con eGFP.

Nuestro hallazgo de que AAV2/1 transduce astrocitos, así como las neuronas, en el putamen puede proporcionar un beneficio adicional en modelos animales de la enfermedad y en pacientes con EH. Si bien la mayoría de las estrategias terapéuticas para la EH se han dirigido a las neuronas vulnerables, un cuerpo creciente de evidencia ha demostrado que los astrocitos también contienen cuerpos de inclusión positivos a mHTT. Los astrocitos que expresan mHTT contienen menos transportadores de glutamato y son menos capaces de proteger contra la excitotoxicidad mediada por glutamato. Además, Bradford y colaboradores demostraron que los modelos de ratón de EH transgénicos dobles que expresan mHTT truncada tanto en neuronas como en la glía presentan síntomas neurológicos más graves que los ratones que expresan mHTT en neuronas en solitario (Bradford, et al. (2010). Mutant huntingtin in glial cells exacerbates neurological symptoms of Huntington disease mice. J Biol Chem 285: 10653-10661). Por lo tanto, la supresión parcial de la *HTT* en tanto en las neuronas como en la glía puede tener un impacto clínico más sólido.

También encontraron neuronas y fibras positivas a eGFP, pero no glía, en el globo pálido interno y externo, así como en la sustancia negra pars reticulata, que indica el transporte retrógrado y anterógrado del vector, respectivamente. Las fibras positivas a eGFP solo se observaron en el núcleo subtalámico. Estos hallazgos pueden tener implicaciones clínicas importantes para la EH, ya que estas regiones de los ganglios basales también experimentan la pérdida de células inducida por mHTT y gliosis. Las inyecciones en una sola región cerebral (putamen) pueden tener la capacidad de dirigirse terapéuticamente a múltiples regiones cerebrales vulnerables. Específicamente, las neuronas transducidas en el globo pálido y la sustancia negra también deben expresar miARN específicos de HTT y, por lo tanto, pueden ser susceptibles a la terapia con ARNi. Los análisis en curso en el laboratorio del solicitante están investigando actualmente los niveles de expresión de miARN y los niveles concomitantes de supresión del ARNm de *HTT* en estas regiones del cerebro.

Estos resultados inmunohistoquímicos y moleculares demuestran una disminución significativa del 45 % en la *HTT*, un nivel de supresión que ha demostrado un beneficio terapéutico en modelos de ratón de EH sin inducir toxicidad (que se dirige tanto a los alelos mutantes como de tipo silvestre). Este nivel de supresión no indujo la pérdida de células positivas a NeuN ni reguló negativamente la expresión de DARPP-32. Se detectó una regulación positiva muy leve de astrocitos positivos a GFAP en regiones transducidas del putamen. Debido a que se detectó astrogliosis en animales de los tres grupos, no se debió a una reducción en la expresión de Htt en las neuronas adyacentes. Más

bien, la leve astrogliosis fue probablemente debido a la propia inyección. Debido a que los cerebros se evaluaron a las 6 semanas después de la inyección, este bajo nivel de gliosis se predice que disminuirá con el tiempo. De manera importante, no se observó una regulación positiva en la microglía reactiva o en la expresión de citocinas proinflamatorias, que se predice que aumentará si la reducción de *HTT* indujera toxicidad neural.

Se ha demostrado que la transferencia génica de AAV recombinante al SNC intacto provoca una respuesta mediada por linfocitos T mínima sin una respuesta inmunológica mediada por células plasmáticas en estudios preclínicos en animales. Además, los hallazgos alentadores de ensayos clínicos recientes de terapia génica en estadio temprano para la enfermedad de Canavan (CD), enfermedad de Parkinson (EP) y amaurosis congénita de Leber (LCA), en las que AAV, serotipo 2, se inyectó directamente en el parénquima cerebral (CD, EP) o la retina (LCA), demostraron solo aumentos leves en los niveles de Nab después de la inyección sin signos de inflamación o eventos neurológicos adversos. Los resultados aquí apoyan aún más estos hallazgos y demuestran que, aunque los monos tenían un rango de niveles preexistentes de Nab circulante antes de la cirugía (desde indetectables hasta 1:160), no hubo un aumento importante en los niveles de Nab (de dos a cuatro veces máximo) 6 semanas después de la inyección. Además, a pesar del pequeño aumento en los niveles de Nab en 4/11 animales, no hubo correlación de los niveles de Nab con la fracción de área de las células GFP+ en el putamen. Curiosamente, la presencia de títulos de Nab preexistentes en el rango superior de lo que se informa ha demostrado que anula sustancialmente la expresión génica después de la inyección sistémica, intravascular de diversos serotipos de AAV para dirigirse al cerebro o los tejidos periféricos. Estos datos son alentadores y sugieren que a pesar de que los NHP y los seres humanos tienen anticuerpos circulantes naturales contra AAV2/1, así como otros serotipos, una carga de anticuerpos preexistente, al menos hasta los valores indicados aquí, no limitará la transferencia génica y no debe ser un criterio de exclusión para ensayos clínicos que impliquen inyecciones directas en el cerebro.

En resumen, estos resultados en el cerebro de macaco rhesus respaldan y extienden adicionalmente experimentos anteriores en roedores que demuestran la seguridad y eficacia de una reducción de *HTT* no específica de alelo. Estos hallazgos, junto con el perfil de seguridad bien establecido de rAAV en ensayos clínicos de fase temprana para una diversidad de trastornos neurológicos, subraya el potencial del ARNi mediado por virus como terapia para la EH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. En este estudio se utilizaron once macacos rhesus adultos de origen indio (machos, 7-10 kg). Todos los monos se mantuvieron uno por jaula en un horario de 12 horas de luz/12 horas sin iluminación con acceso libre a comida y agua. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por el Oregon National Primate Research Center y la Oregon Health and Science University Institutional Animal Care y el Use Committee y el Institutional Biosafety Committee.

Construcciones de ARNi y producción de vectores virales. Todos los ARNs se generaron utilizando un algoritmo desarrollado para reducir el potencial de inespecificidad de las secuencias antisentido. (Véase el Ejemplo 1 anterior) Las secuencias de ARNs que se dirigen a una secuencia en el exón 52 de huntingtina de ratón, rhesus y humana, o un ARNs de control se incluyeron en un andamio de miARN artificial comparable con miR-30 humano para generar miHDS1 (pri: 5'-AGUGAGCGAUGCUGGCUCGCAUGGUCGAUACUGUAAAGCCACAGAUG GGUGUCGACCAUGCGAGCCAGCACCGCCUACU-3', secuencia antisentido predicha en negrita, SEQ ID NO: 33) o miCONT (pri: 5'-AGUGAGCGCAGCGAAC GACUUAACGCGUUUACUGUAAAGCCACAGAUGGGUAAACGCGUAAGUC GUUCGCUACGCCUACU, secuencia antisentido predicha en negrita). Los tallos-bucles de miARN artificiales se clonaron en un vector de expresión U6 de ratón, y los casetes de expresión se clonaron posteriormente en plásmidos derivados de pFBGR que coexpresan GFP impulsada por CMV. Los plásmidos lanzadera (pAAVmiHDS1-GFP y pAAVmiCONT-GFP) contienen las unidades transcripcionales respectivas que están flanqueadas en cada extremo por serotipo 2 de AAV de 145 pb de secuencias de repetición terminales invertidas. La producción de rAAV se realizó utilizando el sistema de baculovirus de AAV. (Smith, RH, Levy, JR y Kotin, RM (2009). A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells. *Mol Ther* 17: 1888-1896). Las células de insecto Sf9 se infectaron con un baculovirus que expresaba proteínas auxiliares de AAV rep2, AAV cap 1, y adenovirus y un segundo baculovirus que expresaba el miARN y el eGFP flanqueados por las ITR de AAV2. El lisado celular se ejecutó a través de un gradiente de yodixanol (del 15 %-60 % peso/volumen), y la fracción de yodixanol que contenía las partículas de rAAV se purificó adicionalmente utilizando una membrana de filtro de intercambio iónico Mustang-Q. El título de partícula de rAAV se determinó mediante análisis de QPCR y FACS. Los vectores se generaron por el Gene Transfer Vector Core en la Universidad de Iowa y se enviaron al Oregon National Primate Research Center para las inyecciones. Doce horas antes de la cirugía, todas las preparaciones de vectores virales se dializaron contra el Tampón de formulación 18 (Hyclone) para eliminar las sales (3 horas de diálisis en total) y se diluyeron hasta un título final de 1e12 vg/ml.

Imagen por resonancia magnética y cirugía estereotáxica. Inmediatamente antes de la cirugía, los animales se anestesiaron con ketamina HCl (10 mg/kg), se transportaron a la IRM, se intubaron y se mantuvieron en isoflurano al 1 % vaporizado en oxígeno durante la duración de la exploración. Los animales se colocaron en una estructura quirúrgica estereotáxica compatible con la IRM; se realizó una imagen por resonancia magnética (IRM) ponderada en T1 para obtener las coordenadas quirúrgicas (unidad Siemens 3.0 T Trio MR). Después de la exploración, los animales

fueron llevados directamente a la sala de operaciones y prepararon para una cirugía estéril. Cada animal recibió tres microinyecciones por hemisferio (seis inyecciones en total): el primer 1 mm rostral con respecto a la comisura anterior (12 µl) y las dos inyecciones restantes (12 µl y 10 µl, respectivamente) separadas 3 y 6 mm caudales con respecto a la primera inyección. Los animales fueron inyectados con 1e12 vg/ml de AAV2/1-miHDS1-eGFP ($n = 4$), AAV2/1-miCONT-eGFP ($n = 4$) o AAV2/1-eGFP ($n = 4$) a una velocidad de 1 µl/minuto, y la aguja se deja en su lugar durante 5 minutos más para permitir que el volumen de inyección se difunda desde la punta de la aguja. Después de completadas las microinyecciones, la apertura del cráneo se llenó de espuma en gel y se cerró la incisión.

Análisis de conducta

Actividad general en la jaula: Todos los animales se equiparon con collares de nylon o de aluminio (Primate Products) con acelerómetros Actical (Respironics) montados en la estructura. Cada monitor Actical contenía un sensor omnidireccional que integraba la velocidad y la distancia de la aceleración de todo el cuerpo y producía una corriente eléctrica que varía en magnitud dependiendo de un cambio en la aceleración. El monitor se programó para almacenar el número total de recuentos de actividad para cada periodo de 1 minuto. Los animales llevaban collares de actividad las 24 horas del día, 7 días a la semana durante 3 semanas antes de la cirugía y cada semana a partir entonces durante la duración del estudio.

MRS: Tres observadores independientes, cegados a la identidad grupal, evaluaron la conducta en las jaulas semanalmente. Se evaluaron veinticuatro conductas separadas asociadas con el putamen, incluidas el seguimiento ocular horizontal y vertical, tratar la recuperación con ambas extremidades anteriores, capacidad de soportar peso en ambas extremidades posteriores, la postura, el equilibrio, respuesta de sobresalto, y bradicinesias, distonías y coreas de cada extremidad y el tronco. Una puntuación de 0 indica un fenotipo normal, mientras que una puntuación de 3 indica movimientos fenotípicos muy anormales. Todos los animales se evaluaron en la MRS antes de la cirugía para obtener puntuaciones de referencia y una vez por semana durante la duración del estudio.

Prueba Lifesaver: Los animales fueron entrenados para ensartar golosinas duras y comestibles de una varilla de metal recta (poste recto) y luego se evaluó su capacidad para retirar las golosinas del poste recto y un poste en forma de signo de interrogación. Todas las tareas de destreza manual se presentaron en un aparato de pruebas generales de Wisconsin (WGTA) y la latencia para recuperar con éxito la golosina se midió por separado para las extremidades anteriores izquierda y derecha. Los animales fueron entrenados durante 21 días en el poste recto. Después, se recopilaron 2 semanas de datos de referencia solo en el poste recto. Dos semanas después de la cirugía, los animales se probaron dos veces por semana tanto en el poste recto como en el poste en forma de signo de interrogación. Los días de prueba, cada animal se colocó en el WGTA y sus movimientos se registraron en vídeo digital. Cada mano se probó dos veces con un límite de tiempo de 5 segundos para el poste recto y 10 segundos para el poste del signo de interrogación para completar la tarea. La latencia para retirar cada golosina se evaluó a través del software Sony PMB con una capacidad de medición de milisegundos en un momento posterior.

Necropsia y procesamiento de tejidos. Seis semanas después de la cirugía, los animales se sedaron con ketamina y después se anestesiaron profundamente con pentobarbital sódico seguido de desangrado. Los cerebros se perfundieron a través de la arteria carótida ascendente con una solución del 21 al 0,9 %, se extrajeron del cráneo, se colocaron en una matriz cerebral de acero enfriada con hielo y se bloquearon en placas de 4 mm de espesor en el plano coronal. Las punciones de tejido utilizadas para los análisis moleculares se obtuvieron del hemisferio izquierdo de cada animal del putamen transducido (las placas se colocaron bajo el alcance fluorescente para verificar las regiones de fluorescencia por eGFP) y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para conservar el ADN, ARN, y la proteína. Posteriormente, las placas se fijaron en paraformaldehído al 4 % para análisis histológicos.

PCR cuantitativa en tiempo real. El ARN se aisló a partir de punciones de tejido tomadas de putamen positivo a eGFP utilizando el kit Qiagen RNeasy, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y transcripción inversa con cebadores aleatorios y transcriptasa inversa Multiscribe (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). La expresión génica relativa se evaluó mediante QPCR mediante el uso de conjuntos de cebadores TaqMan/sondas para DARPP-32 (Hs00259967_m1), CD4 (Rh02621720_m1), CD8 (Rh02839711_m1), IL1-β(Rh02621711_m1), o TNF-α(Rh02789784). Todos los valores se cuantificaron utilizando el método $\Delta\Delta CT$ (normalización a 18S) y se calibraron con respecto al putamen inyectado con AAV-GFP. Los cebadores para la cuantificación del ARNm de HTT de rhesus se diseñaron para flanquear el sitio de unión a miHDS1 en el Exón 52 usando Primer Express (Applied Biosystems): Directo: 5'-CGGGAGCT GTGCTCACGT-3', Inverso: 5'-CATTTCTACC CGGCGACAAG-3', y la expresión se evaluó utilizando la detección SYBR Green. En conclusión, se realizó un análisis de la curva de disociación (curva de fusión) para confirmar la amplificación específica.

Análisis inmunohistoquímicos. Se procesaron secciones de cerebro coronal de flotación libre de 40 µm de espesor para la visualización inmunohistoquímica de la expresión de eGFP (eGFP, 1:000, Invitrogen), neuronas (NeuN, 1:1000, Millipore), astrocitos reactivos (GFAP, 1:2000, DAKO) o microglías (Iba1, 1:1.000; WAKO) utilizando el procedimiento de anticuerpos marcados con biotina. Tras la inhibición de la peroxidasa endógena y los lavados, los tejidos se bloquearon durante 1 hora en suero de burro al 5 %, y las incubaciones con anticuerpos primarios se realizaron durante 24 horas a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron en anticuerpos secundarios IgG biotinilados anti-conejo o anti-ratón de burro (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 1 h a temperatura ambiente. En todos los

procedimientos de tinción, la eliminación del anticuerpo primario sirvió como control. Las secciones se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina y se cubrieron con Cytoseal 60 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Las imágenes se capturaron utilizando un microscopio de luz Olympus BX51 y una cámara digital a color DP72, junto con el software Olympus DP Controller.

Análisis de inmunofluorescencia. Se procesaron secciones cerebrales coronales de flotación libre de 40 µm de espesor para la visualización inmunofluorescente de neuronas de proyección espinosa medias (DARPP-32, 1:25, Cell Signaling, Danvers, MA), neuronas colinérgicas grandes (ChAT, 1:500, Millipore, Billerica, MA), astrocitos reactivos (GFAP, 1:1000, DAKO, Carpinteria, CA), o microglías (Ibal, 1:500; WAKO, Richmond, VA). Tras los lavados, los tejidos se bloquearon durante 1 hora en suero de burro al 5 %, y las incubaciones con anticuerpos primarios se realizaron durante 24 horas a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron en anticuerpos secundarios conjugados con Alexa-546 anti-conejo o anti-cabra de burro (1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina y se cubrieron con medio de montaje de anti-desvanecimiento Slowfade Gold que contenía DAPI (Invitrogen). Las imágenes se capturaron a 20 aumentos utilizando un microscopio confocal Leica SP5.

Determinación estereológica de la distribución vectorial. El Fraccionador de la Fracción de Área (Microbrightfield) se utilizó para cuantificar la fracción de células positivas a eGFP en el putamen (solamente el hemisferio derecho). Cada 12ª se seleccionó una sección coronal (serie 1/2, secciones de 40 µm de espesor) a través del putamen que contenía células GFP+ para el análisis. El putamen se expuso bajo 2 aumentos, y se superpuso una red rectangular de puntos. Se usó un marcador para seleccionar puntos que cayeron dentro de la región de interés (putamen), y se usó un segundo marcador para seleccionar puntos que cayeron dentro de la subregión de interés (contenía células positivas a GFP). El área del cuadro de recuento fue de 1000 1000 µm, La colocación XY fue de 1600 1600 µm, y el espaciado de la cuadrícula fue de 120 µm. La estimación de la fracción de área de las células GFP+ en el putamen se determinó dividiendo el área de las células GFP+ por el área del putamen y las estimaciones proporcionadas se promediaron de todas las secciones cuantificadas. Se creó una reconstrucción en 3D del putamen transducido con eGFP utilizando el software StereoInvestigator alineando los contornos de cada sección desde el putamen rostral al caudal y colocando revestimientos sobre cada una. La diseminación anterior a posterior de la transducción de eGFP se determinó ubicando la mayoría de las secciones rostrales y caudales a través del putamen que contenía GFP y utilizando una IRM combinada y un atlas de histología del cerebro de mono rhesus (Saleem y Logothetis) para identificar la distancia entre los dos (1 mm de resolución).

Ensayo de anticuerpos neutralizantes. Se extrajo sangre entera en tubos de suero Vacutainer (BD) de tapón rojo de animales antes de la cirugía y en la autopsia, el suero se recogió después de la centrifugación a 2500 rpm durante 20 minutos y se almacenó a -80 °C hasta el análisis. El suero se envió al Immunology Core at the University of Pennsylvania para analizar los niveles de anticuerpos AAV2/1 a través de un ensayo de transducción *in vitro*. Se sembró una placa de 96 pocillos con células Huh7 y se infectó con AAV2/1-LacZ y diluciones seriadas de suero rhesus antes y después de la cirugía. Los valores informados son la dilución de suero a la que las unidades relativas de luminiscencia (ULR) se redujeron en un 50 % en comparación con los pocillos de control de virus (muestra sin suero). El límite inferior de detección fue una dilución de 1/5, y se utilizó suero de conejo anti-AAV2/1 en un control positivo.

Análisis estadístico. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico SigmaStat (SYSTAT). Los análisis de QPCR para determinar la expresión de HTT, DARPP-32, CD4, CD8, IL1-β, y TNF-α, así como análisis del fraccionador de la fracción de área, se realizaron utilizando un ANOVA unidireccional. Tras un efecto significativo, se realizaron análisis post hoc de Bonferroni para evaluar las diferencias significativas entre los grupos individuales. Para los análisis de actividad en jaulas y Lifesaver, se ejecutó un ANOVA de medidas repetidas bidireccional utilizando el grupo y el tiempo como variables para determinar las diferencias entre grupos o en el tiempo. Se realizaron análisis post hoc cuando se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Para los análisis de MRS, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis seguida de una comparación pareada de Dunn para detectar diferencias entre grupos. Los datos correlacionales entre la fracción de área de GFP en el putamen y los niveles de Nab prequirúrgicos se determinaron mediante la correlación de Pearson para los datos paramétricos. Los datos correlacionales entre la fracción de área de GFP en el putamen y el cambio múltiple de los títulos de Nab antes y después de la cirugía se determinaron utilizando una correlación de Spearman para datos no paramétricos. En todos los casos, $P < 0,05$ se consideró significativo.

El uso de los términos "un" y "uno/una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención debe interpretarse de modo que cubra tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otro modo en el presente documento o se contradiga claramente en el contexto. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye", y "que contiene" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, que significan "incluyendo, pero sin limitación"), a menos que se indique lo contrario. La enumeración de intervalos de valores en el presente documento está destinada simplemente a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se citara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado, a menos que se indique otra cosa en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento,

pretende simplemente ilustrar mejor la invención y no plantear una limitación sobre el alcance de la invención a menos que se reivindique otra cosa. Ninguna expresión de la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

5 LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION

<120> COMPUESTOS TERAPÉUTICOS

10

<130> P103341EP

<140> 12745030.2

<141> 13-02-2012

15

<150> US 61/522.632

<151> 11-08-2011

20

<150> US 61/442.218

<151> 12-02-2011

<160> 221

<170> PatentIn versión 3.5

25

<210> 1

<211> 86

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 1

35

cucgagugag cgaugcuggc ucgcaugguc gauacuguaa agccacagau gggugucgac 60

caugcgagcc agcaccgccu acuaga 86

<210> 2

<211> 86

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

45

<400> 2

cucgagugag cgcucccggu caucagcgac uauuccguuaa agccacagau ggggauaguc 60

gcugaugacc gggauccgccu acuaga 86

50

<210> 3

<211> 86

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 3

cucgagugag cgcuccucuu guuuacgacg ugaucuguaa agccacagau gggauuacgu 60
 cguaaacaag aggaacgccu acuagu 86

5 <210> 4
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 4
 gucgaccaug cgagccagca c 21

15 <210> 5
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 5
 auagucgcug augaccggga u 21

25 <210> 6
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 6
 uuacgucgua aacaagagga a 21

35 <210> 7
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 7
 cgaccaugcg agccagca 18

45 <210> 8
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 8
 agucgcugau gaccggga 18

60 <210> 9
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

	<400> 9 acgucguaaa caagagga 18	
5	<210> 10 <211> 163 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Polinucleótido sintético	
	<400> 10	
	gcgguuuagug aaccgucaga ugguaccguu uaaacucgag ugagcgaucc ugucucgcau	60
	ggucgauacu guaaagccac agaugggugu cgaccaugcg agccagcacc gccuacuaga	120
15	gcggccgcca cagcggggag auccagacau gaaagauac auu	163
	<210> 11 <211> 163 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Polinucleótido sintético	
25	<400> 11	
	gcgguuuagug aaccgucaga ugguaccguu uaaacucgag ugagcgaucc cggucaucag	60
	cgacuauucc guaaagccac agauggggau agucgcugau gaccgggauc gccuacuaga	120
	gcggccgcca cagcggggag auccagacau gaaagauac auu	163
30	<210> 12 <211> 8 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 12 gugagcga 8	
40	<210> 13 <211> 8 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 13 gugagcgc 8	
50	<210> 14 <211> 9 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético	

<400> 14
 uaaacucga 9

5 <210> 15
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 15
 ctcgag 6

15 <210> 16
 <211> 10
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 16
 ugguaaccguu 10

25 <210> 17
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 17
 cgcyuac 7

35 <210> 18
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 18
 cgccuac 7

45 <210> 19
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 19
 ctcaga 6

55 <210> 20
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 20
 ctcagt 6

5 <210> 21
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 21
 agcggccgcc a 11

20 <210> 22
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> modified_base
 <222> (3)..(17)
 <223> a, c, u, g, desconocido u otro

30 <400> 22
 cunnnnnnnn nnnnnnngg 19

35 <210> 23
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <220>
 <221> modified_base
 <222> (3)..(17)
 <223> a, c, u, g, desconocido u otro

50 <400> 23
 ccnnnnnnnn nnnnnnngg 19

55 <210> 24
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <400> 24
 cugugaagcc acagauggg 19

<210> 25
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

	<400> 25 ccgugaagcc acagauggg	19
5	<210> 26 <211> 2 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 26 uu 2	
15	<210> 27 <211> 3 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 27 uuu 3	
25	<210> 28 <211> 4 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 28 uuuu 4	
35	<210> 29 <211> 3 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
45	<400> 29 cuu 3	
	<210> 30 <211> 4 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
55	<400> 30 cuuu 4	
60	<210> 31 <211> 5 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Oligonucleótido sintético	

	<400> 31 uuuuu 5	
5	<210> 32 <211> 3 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 32 uag 3	
15	<210> 33 <211> 86 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 33	
	cucgagugag cgaugcuggc ucgcaugguc gauacuguaa agccacagau gggugucgac	60
25	caugcgagcc agcaccgccu acuaga	86
30	<210> 34 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 34 gtcgtggctc gcatggtcga t 21	
35	<210> 35 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 35 atcccgttca tcagcgacta t 21	
45	<210> 36 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
50	<400> 36 ctgcttctt gtcagcgct c 21	
55	<210> 37 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 37 gcggggcagc aggagcggt g 21	
60	<210> 38 <211> 21 <212> ADN	

	<213> Homo sapiens	
5	<400> 38 ttcctctgtg ttacgacgtg a	21
	<210> 39 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
10	<400> 39 tgggatgtag agaggcgtta g	21
15	<210> 40 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 40 tcccttgga tgcatatgc t	21
25	<210> 41 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30	<400> 41 aacgtggacc tgcctacgga g	21
	<210> 42 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
35	<400> 42 agggacagta cttcaacgt a	21
40	<210> 43 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
45	<400> 43 tggggacagt acttcaacgc t	21
50	<210> 44 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 44 aaggagttca tctaccgcat c	21
55	<210> 45 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
60	<400> 45 gagctggctc acctgggtcg g	21
65	<210> 46 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	

ES 2 739 804 T3

	<400> 46 ctgccccagt ttctagacga c	21
5	<210> 47 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
10	<400> 47 tgccccagtt tctagacgac t	21
15	<210> 48 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 48 gccccagttt ctagacgact t	21
25	<210> 49 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30	<400> 49 ccccagtttc tagacgactt c	21
35	<210> 50 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 50 cagctaccaa gaaagaccgt g	21
45	<210> 51 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
50	<400> 51 ctgctgtgca gtgatgacgc a	21
55	<210> 52 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
60	<400> 52 atggagaccc acaggttcga g	21
65	<210> 53 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 53 ttccgtgtgc tggctcgcat g	21
	<210> 54 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 54 tccgtgtgct ggctcgcatg g	21

5	<210> 55 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 55 ctggctcgca tggcgacat c	21
10	<210> 56 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
15	<400> 56 cacccttcag aagacgagat c	21
20	<210> 57 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
25	<400> 57 aacctttct gcctggtcgc c	21
30	<210> 58 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 58 gaggatgact ctgaatcgag a	21
35	<210> 59 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 59 ccggacaaag actggtacgt t	21
45	<210> 60 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 60 aagcaacgac ctgaagatcg a	21
50	<210> 61 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
55	<400> 61 ctggagaagt cagaagacga a	21
60	<210> 62 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
65	<400> 62 aaccaagagc ggagcaacga a	21
	<210> 63	

	<211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
5	<400> 63 acgggacaga attggacgaa a	21
10	<210> 64 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
15	<400> 64 gtggaaaaga ttcacccgaa a	21
20	<210> 65 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 65 cagggtagaa gaaaacgatt t	21
25	<210> 66 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30	<400> 66 cggctcagga aagaaacgca a	21
35	<210> 67 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 67 ccccacatgg cccacgtacc t	21
40	<210> 68 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
45	<400> 68 atccaactgc ccatgcgcca a	21
50	<210> 69 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
55	<400> 69 cgccaatgat gctaatacgc a	21
60	<210> 70 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 70 cagccattc cagtctcgac a	21
65	<210> 71 <211> 21 <212> ADN	

ES 2 739 804 T3

	<213> Homo sapiens		
	<400> 71		
5	acccacatg gccacgtac c	21	
	<210> 72		
	<211> 21		
	<212> ADN		
10	<213> Homo sapiens		
	<400> 72		
	agccattcc agtctcgaca a	21	
	<210> 73		
15	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 73		
20	tccaatgat atgttcgat a	21	
	<210> 74		
	<211> 21		
	<212> ADN		
25	<213> Homo sapiens		
	<400> 74		
	tccaatgat atgttcgat a	21	
30	<210> 75		
	<211> 79		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 75		
	agugagcgau gcuggcucgc auggucgaua cuguaaagcc acagaugggu gucgaccaug		60
	cgagccagca ccgccuacu		79
40			
	<210> 76		
	<211> 57		
	<212> ADN		
45	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
50	<400> 76		
	aaaactcgag tgagcgatgc tggctcgcat ggtcgatact gtaaagccac agatggg	57	
	<210> 77		
	<211> 56		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
60	<400> 77		
	aaaaactagt aggcggtgct ggctcgcatg gtcgacacc atctgtggct ttacag	56	

ES 2 739 804 T3

5	<210> 78 <211> 79 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 78	
	agugagcgcu cccggucauc agcgacuauu ccguaaagcc acagaugggg auagucgcug	60
	augaccggga ucgccuacu	79
15	<210> 79 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 79	
	aaaactcgag tgagcgctcc cggatcatcag cgactattcc gtaaagccac agatggg	57
25	<210> 80 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 80	
	aaaaactagt aggcgatccc ggtcatcagc gactatcccc atctgtggct ttacag	56
35	<210> 81 <211> 79 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<220> <223> Descripción de la molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético	
45	<400> 81	
	agugagcggg gcuucuuugu cagcgcguuu ccguaaagcc acagaugggg gacgcgctga	60
	caaagaagca gcgccuacu	79
50	<210> 82 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 82	
60	aaaactcgag tgagcgggtgc ttctttgtca ggcggttcc gtaaagccac agatggg	57
	<210> 83	

	<211> 56		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 83		
10	aaaaactagt aggcgctgct tcttgtcag cgcgcccc atctgtggct ttacag	56	
	<210> 84		
	<211> 79		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 84		
20	agugagcgac ggggcagcag gagcgguaa cuguaaagcc acagaugggu uuaccgcucc	60	
	ugcugccccc cgcuccuacu	79	
	<210> 85		
	<211> 57		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
30	<400> 85		
	aaaactcgag tgcgcgacgg ggcagcagga gcggtagact gtaaagccac agatggg	57	
	<210> 86		
35	<211> 56		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
40	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 86		
	aaaaactagt aggcggcgagg gcagcaggag cggtaaaccc atctgtggct ttacag	56	
45	<210> 87		
	<211> 79		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 87		
	agugagcgcu ccucuuguuu acgacgugau cuguaaagcc acagauggga uuacgucgua	60	
55	aacaagagga acgccuacu	79	
	<210> 88		
	<211> 57		
60	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		

	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 88	
5	aaaactcgag tgagcgctcc tctgtttac gacgtgatct gtaaagccac agatggg	57
	<210> 89	
	<211> 56	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 89	
15	aaaaactagt aggcgttcct ctgtttacg acgtaatccc atctgtggct ttacag	56
	<210> 90	
	<211> 79	
	<212> ARN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 90	
	agugagcgcg ggauguagag aggcguuagu cuguaaagcc acagauggga uuaacgccuc	60
	ucuacauccc acgccuacu	79
	<210> 91	
30	<211> 57	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 91	
	aaaactcgag tgagcgcggg atgtagagag gcgttagtct gtaaagccac agatggg	57
40	<210> 92	
	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 92	
50	aaaaactagt aggcgtggga ttagagagag cgtaatccc atctgtggct ttacag	56
	<210> 93	
	<211> 79	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 93	
60	agugagcgcc ccuuggaau cauaucguug cuguaaagcc acagaugggu agcgauaugc	60
	auuccaagg acgccuacu	79

5	<210> 94 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 94 aaaactcgag tgagcgcccc ttggaatgca tatcgttgct gtaaagccac agatggg	57
15	<210> 95 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 95 aaaaactagt aggcgtccct ttggaatgcat atcgctaccc atctgtggct ttacag	56
25	<210> 96 <211> 79 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 96 agugagcgcga cguggaccug ccuacggagg ccguaaaagcc acagaugggu uuccguaggc	60
	agguccacgu ucgccuacu	79
35	<210> 97 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
45	<400> 97 aaaactcgag tgagcgcacg tggacctgcc tacggaggcc gtaaagccac agatggg	57
50	<210> 98 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
55	<400> 98 aaaaactagt aggcgaacgt ggacctgcct acggaaaccc atctgtggct ttacag	56
60	<210> 99 <211> 79 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	

	<400> 99		
	agugagcgca ccgugugaau cauugucuaa cuguaaagcc acagaugggu uagacaauga	60	
	uucacacggu acgccuacu	79	
5	<210> 100 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 100 aaaactcgag tgagcgacc gtgtgaatca ttgtctaact gtgaagccac agatggg	57	
	<210> 101 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
25	<400> 101 aaaaactagt aggcgtaccg tgtgaatcat tgtctaacc atctgtggct ttacag	56	
	<210> 102 <211> 79 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
35	<400> 102 agugagcgaa gcagcuuguc cagguuuuag cuguaaagcc acagaugggu auaaaccugg	60	
	acaagcugcu ccgccuacu	79	
40	<210> 103 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
50	<400> 103 aaaactcgag tgagcgaagc agctgtcca ggtttatgct gtgaagccac agatggg	57	
	<210> 104 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
60	<400> 104 aaaaactagt aggcggagca gctgtccag gtttataccc atctgtggct ttacag	56	
	<210> 105		

	<211> 79		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 105		
	agugagcgaa gcagcugugu uagguuuuag cuguaaagcc acagaugggu auaaaccuaa	60	
10	cacagcugcu ccgccuacu	79	
	<210> 106		
	<211> 57		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
20	<400> 106		
	aaaactcgag tgagcgaagc agctgtgtta gtttatgct gtgaagccac agatggg	57	
	<210> 107		
	<211> 56		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
30	<400> 107		
	aaaaactagt aggcggagca gctgtgttag gtttatccc atctgtggct ttacag	56	
	<210> 108		
35	<211> 79		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
40	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 108		
	agugagcgaa gcuguagcua ugugccuuag cuguaaagcc acagaugggu uaaggcacau	60	
	agcuacagcu ccgccuacu	79	
45	<210> 109		
	<211> 57		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 109		
55	aaaactcgag tgagcgaagc ttagctatg tgccttagct gtgaagccac agatggg	57	
	<210> 110		
	<211> 56		
	<212> ADN		
60	<213> Secuencia artificial		

ES 2 739 804 T3

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 110 aaaaactagt aggcggagct gtagctatgt gccttaaccc atctgtggct ttacag	56	
	<210> 111 <211> 79 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 111 agugagcgca gcaggaguua uucugccuua cuguaaagcc acagaugggu aaggcagaau	60	
	aacuccugcu acgccuacu	79	
20	<210> 112 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 112 aaaactcgag tgagcgcagc aggagttatt ctgccttact gtaaagccac agatggg	57	
30	<210> 113 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
40	<400> 113 aaaaactagt aggcgtagca ggagttattc tgccttacc atctgtggct ttacag	56	
	<210> 114 <211> 79 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
50	<400> 114 agugagcgca gcgaacgacu uacgcguuua cuguaaagcc acagaugggu aaacgcguua	60	
	gucguucgcu acgccuacu	79	
55	<210> 115 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
60	<220> <223> Oligonucleótido sintético		

	<400> 115 aaaactcgag tgagcgcagc gaacgactta cgcgtttact gtaaagccac agatggg	57
5	<210> 116 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 116 aaaaactagt aggcgtagcg aacgacttac gcgtttaccc atctgtggct ttacag	56
15	<210> 117 <211> 79 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 117 agugagcgcga ccaucgaacc gucagaguua cuguaaagcc acagaugggu aacucugacg	60
25	guucgauggu acgccuacu	79
30	<210> 118 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 118 aaaactcgag tgagcgcacc atcgaaccgt cagagttact gtgaagccac agatggg	57
40	<210> 119 <211> 56 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 119 aaaaactagt aggcgtacca tcgaaccgtc agagttaccc atctgtggct ttacag	56
50	<210> 120 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 120 ttcgatctgt agcagcagct t	21
60	<210> 121 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 121
 gatccgactc accaatacc 19

10 <210> 122
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 122
 ttccgaataa actccaggct t 21

20 <210> 123
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 123
 acgtaaacaaggacgtcc 19

30 <210> 124
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 124
 aacgttagct tcaccaacat t 21

40 <210> 125
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 125
 taacgtaaca gtcgtaaga 19

50 <210> 126
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

60 <400> 126
 acagcgagtt agataaagc 19

65 <210> 127
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 5 <400> 127
 cacacgggca cagactcca a 21

 <210> 128
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 15 <400> 128
 aggtgtatct cctagacact t 21

 <210> 129
 <211> 18
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25
 <400> 129
 tgtgtacgt tctacgag 18

 <210> 130
 30 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 130
 tgtggacaaa gtctcttc 19
 40
 <210> 131
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 131
 50 tgatgtcata gattggact 19

 <210> 132
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 132
 60 tctgatctgt agcagcagct t 21

 <210> 133
 <211> 19
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 133
 ggtaagtggc catccaagc 19

10 <210> 134
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 134
 cgagttagat aaagccccc 19

25 <210> 135
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 135
 ttaacctaat ctctcccc 19

40 <210> 136
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 136
 tgatgatggt gcgcagacc 19

55 <210> 137
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <400> 137
 tatagagaga gagagaaga 19

70 <210> 138
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

80 <400> 138
 ttgatccgga ggtaggtctt t 21

85 <210> 139
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 139
 5 ttgtattca gtgtgatga 19

 <210> 140
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 140
 15 ttactctcaa actttcctc 19

 <210> 141
 <211> 19
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25
 <400> 141
 tattgtaatg ggctctgtc 19

 <210> 142
 30 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 142
 tgccttgca aactttctt 19
 40
 <210> 143
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 143
 50 accaatttat gcctacagc 19

 <210> 144
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 144
 60 ttgctctgt agcagcagct t 21

 <210> 145
 <211> 19
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 145
 ccaatctcaa agtcatcaa 19

10 <210> 146
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 146
 tagttattca ggaagtcta 19

25 <210> 147
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 147
 aatcaagtag atcctcctcc 20

40 <210> 148
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 148
 tgcctctcct tgtctacgc 19

55 <210> 149
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <400> 149
 tcaagctctg caaaccaga 19

<210> 150
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 150
 atgatgatgg tgcgcagac 19

<210> 151
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 5 <400> 151
 tcttctagcg ttgaagtact g 21

 10 <210> 152
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 20 <400> 152
 tcttctagcg ttgaattact g 21

 <210> 153
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 153
 gaattgttgc tggttgcact c 21

 30 <210> 154
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 154
 taggactagt cactgtgc 19

 40 <210> 155
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 50 <400> 155
 tataatgctc agcctcaga 19

 <210> 156
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 60 <400> 156
 tttgattgt agcagcagct t 21

 <210> 157
 <211> 21
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 157
 ttttatctgt agcagcagct t 21

10 <210> 158
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 158
 gagtctcttg ttccgaagc 19

25 <210> 159
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 159
 tatcactcta ttctgtctc 19

40 <210> 160
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 160
 tcacctcaa actatgtcc 19

55 <210> 161
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <400> 161
 attgtcttca ggtcttcagt t 21

70 <210> 162
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

80 <400> 162
 gcactccagg gcttcacg 19

85 <210> 163
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 5 <400> 163
 aagccccgaa aaccggctt 19

 10 <210> 164
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 164
 ttgtccagga agtcctcaag tct 23

 20 <210> 165
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 165
 ccaaggctct aggtgtgca 19

 30 <210> 166
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 166
 gcaccactag ttggtgtc 19

 40 <210> 167
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 167
 tcactctcagc cactctgctt t 21
 50

 <210> 168
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 168
 60 gtcactctcag ccactctgct t 21

 <210> 169
 <211> 19
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 5 <400> 169
 aatgcagtat acttcctga 19

 <210> 170
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 15 <400> 170
 cacaatggca cagactcca a 21

 <210> 171
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25
 <400> 171
 cacaatggcg cagactcca a 21

 <210> 172
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35
 <400> 172
 tctcctcagc cactctgctt t 21

 40 <210> 173
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 173
 50 ctctcagcc actctgctt t 21

 <210> 174
 <211> 19
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 174
 60 ttctctaaat tctttctc 19

 <210> 175
 <211> 19
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 175
 5 ttgtacatca taggactag 19

 <210> 176
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 176
 15 ttgtctttga gatccatgc 19

 <210> 177
 <211> 22
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25
 <400> 177
 tcagcccaca cacagtgcct tg 22

 <210> 178
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35
 <400> 178
 taacaagcca gagttggctc 19

 <210> 179
 <211> 21
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 45
 <400> 179
 50 ttccagaatt gatactgact t 21

 <210> 180
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 180
 60 ttcccttgg ccacttctg 19

 <210> 181
 <211> 21
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 181
 5 aagcagagtt caaaagccct t 21

 <210> 182
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 182
 15 ttggggatag gctgtcgcc 19

 <210> 183
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25
 <400> 183
 atcttcaata gacacatcgg c 21

 <210> 184
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35
 <400> 184
 ttccccagct ctcccaggc 19

 <210> 185
 <211> 19
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 45
 <400> 185
 50 ttccccaaac ctgaagctc 19

 <210> 186
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 186
 60 ttcttctcat ttcgacacc 19

 <210> 187
 <211> 19
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 5 <400> 187
 gtctcggatg atgatgttc 19

 <210> 188
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 15 <400> 188
 atttcaggaa ttgttaaag 19

 <210> 189
 <211> 19
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25
 <400> 189
 ctttcagact ggacctctc 19

 <210> 190
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 190
 actgaggagt ctctgatct t 21

 40 <210> 191
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 191
 50 aagcaaaaca ggtctagaat t 21

 <210> 192
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 192
 60 ccctccctcc gttctttt 19

 <210> 193
 <211> 19
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 5 <400> 193
 gtgtttgca gctctgtgc 19

 <210> 194
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 15 <400> 194
 attctctctg actcctctc 19

 <210> 195
 <211> 19
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25
 <400> 195
 taatacaaag acctttaac 19

 <210> 196
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35
 <400> 196
 tatttaagga gggatgatt t 21

 40 <210> 197
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 197
 50 aagaaatcat gaacaccgc 19

 <210> 198
 <211> 19
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 198
 60 taaacaaagg acgtccgc 19

 <210> 199
 <211> 19
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
5	<400> 199		
	aattttcaa agttccaat	19	
	<210> 200		
	<211> 79		
10	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<400> 200		
	agugagcgcga gcgaacgacu uacgcguuua cuguaaagcc acagaugggu aaacgcguaa		60
	gucguucgcu acgccuacu		79
	<210> 201		
20	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> Cebador sintético		
	<400> 201		
	cgggagctgt gctcacgt	18	
30	<210> 202		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> Cebador sintético		
	<400> 202		
40	catttctacc cggcgacaag	20	
	<210> 203		
	<211> 85		
	<212> ARN		
45	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<220>		
50	<221> modified_base		
	<222> (1)..(3)		
	<223> a, c, u, g, desconocido u otro		
	<220>		
55	<221> modified_base		
	<222> (83)..(85)		
	<223> a, c, u, g, desconocido u otro		
	<400> 203		
60	nnnagcgagc gcagcgaacg acuuacgcgu uuacuguaaa gccacagaug ggcaaacgcg		60
	uaagucguuc gcuucgccua cunnn		85

5 <210> 204
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 10 <400> 204
 gcgaacgacu uacgcguuuu c 21

 <210> 205
 <211> 21
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 20 <400> 205
 aaacgcguuaa gucguucgcu u 21

 <210> 206
 <211> 29
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 30
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> a, c, u, g, desconocido u otro
 35
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (27)..(29)
 <223> a, c, u, g, desconocido u otro
 40
 <400> 206
 nnnaagcgaa cgacuuacgc guuuacnnn 29

 <210> 207
 <211> 29
 45 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 50
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 55 <223> a, c, u, g, desconocido u otro

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (27)..(29)
 60 <223> a, c, u, g, desconocido u otro

 <400> 207
 nnnacagccua cacgagacgc guuuacnnn 29

 65 <210> 208
 <211> 26

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 208
 tgtgctggct cgcatggtcg acatcc 26

 10 <210> 209
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 20 <221> modified_base
 <222> (21)..(22)
 <223> a, c, u, g, desconocido u otro

 <400> 209
 gcuggcucgc auggucgaua nn 22
 25
 <210> 210
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 210
 35 ugucgaccu gcgagccagc ac 22

 <210> 211
 <211> 22
 <212> ARN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 45 <400> 211
 uaaggcagaa uaacuccugc ua 22

 <210> 212
 <211> 22
 50 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55
 <400> 212
 uuaaggcaca uagcuacagc uc 22

 <210> 213
 60 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> Oligonucleótido sintético

	<400> 213 gauagucgcu gaugaccggg au	22	
5	<210> 214 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 214 uuagacaaug auucacacgg ua	22	
15	<210> 215 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 215 uauaaaccug gacaagcugc uc	22	
25	<210> 216 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 216 uauaaaccua acacagcugc uc	22	
35	<210> 217 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 217 uaaacgcgua agucguucgc ua	22	
45	<210> 218 <211> 61 <212> ARN <213> Secuencia artificial		
50	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
55	<400> 218 gcuggcucgc auggucgaua cuguaaagcc acagaugggu gucgaccaug cgagccagca	60	
	c	61	
60	<210> 219 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial		

ES 2 739 804 T3

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 219
 gcuggcucgc auggucgaua cu 22

10 <210> 220
 <211> 61
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 220
 cccgggucauc agcgacuauu ccguaaagcc acagaugggg auagucgcug augaccggga 60
 u 61

20 <210> 221
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 221
 cccgggucauc agcgacuauu cc 22

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que codifica un transcrito de miARN primario artificial (pri-miARN) que consiste en, en orden de posición, una región flanqueante 5', una región no guía, una región de bucle, una región guía, y una región flanqueante 3', en el que la región guía es un 100 % idéntica a cgaccaugcgagccagca (guía de miHDS.1, SEQ ID NO:7), o al menos un 90 % idéntica a agucgcugaugaccggga (guía de miHDS.2, SEQ ID NO:8), y la región no guía es al menos un 80 % complementaria a la región guía.
2. El ácido nucleico de la reivindicación 1, en el que la región flanqueante 5' está unida de forma contigua a la región no guía, la región de bucle está posicionada entre la región no guía y la región guía, y la región guía está unida de forma contigua a la región flanqueante 3'.
3. El ácido nucleico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la región guía tiene una longitud de 15-30 nucleótidos y la región no guía es al menos un 80 % complementaria a la región guía.
4. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la región flanqueante 5' comprende una secuencia de unión 5' unida de forma contigua a la región no guía, en el que la secuencia de unión 5' consiste opcionalmente en 5-8 nucleótidos.
5. El ácido nucleico de la reivindicación 4, en el que la región flanqueante 5' comprende además
 - (i) una secuencia de bulto de 5' posicionada aguas arriba de la secuencia de unión 5', en el que la secuencia de bulto 5' consiste opcionalmente en 1-10 nucleótidos, y opcionalmente
 - (ii) una secuencia espaciadora 5' posicionada aguas arriba de la secuencia de bulto 5', en el que la secuencia espaciadora 5' consiste opcionalmente en 10-12 nucleótidos, y opcionalmente
 - (iii) una secuencia aguas arriba 5' posicionada aguas arriba de la secuencia espaciadora 5', en el que la secuencia aguas arriba 5' tiene una longitud de aproximadamente 30-2000 nucleótidos.
6. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la región flanqueante 3' comprende una secuencia de unión 3' unida de forma contigua a la región guía en la que la secuencia de unión 3' consiste opcionalmente en 5-8 nucleótidos.
7. El ácido nucleico de la reivindicación 6, en el que
 - (i) la región flanqueante 3' comprende además una secuencia de bulto 3' posicionada aguas abajo de la secuencia de unión 3', en el que la secuencia de bulto 3' consiste opcionalmente en 1-10 nucleótidos, opcionalmente, en el que la secuencia de bulto 5' es opcionalmente complementaria a la secuencia de bulto 3' en solo un nucleótido en cada extremo de la secuencia de bulto, y opcionalmente
 - (ii) la región flanqueante 3' comprende además una secuencia espaciadora 3' posicionada aguas abajo de la secuencia de bulto 3', en el que la secuencia espaciadora 3' consiste opcionalmente en 10-12 nucleótidos, y opcionalmente
 - (iii) la región flanqueante 3' comprende además una secuencia aguas abajo 3' situada aguas abajo de la secuencia espaciadora 3', en el que la secuencia aguas abajo 3' tiene opcionalmente de 30-2000 nucleótidos de longitud.
8. El ácido nucleico de las reivindicaciones 6 o 7, en el que la secuencia de unión 3' es al menos aproximadamente un 85 % complementaria a la secuencia de unión 5', y/o en el que la secuencia espaciadora 3' es al menos aproximadamente un 70 % complementaria a la secuencia espaciadora 5'.
9. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la región de bucle tiene 15-25 nucleótidos de longitud.
10. Un casete de expresión que comprende un promotor unido de forma contigua al ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el promotor es opcionalmente un promotor específico de tejido o un promotor inducible.
11. Un vector que comprende el casete de expresión de la reivindicación 10, en el que el vector es opcionalmente un vector de virus adenoasociado (AAV).
12. Un casete de expresión que comprende el ácido nucleico aislado descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
13. Un ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, el casete de expresión de la reivindicación 10 o la reivindicación 12, o el vector de la reivindicación 11, para su uso en terapia.
14. Un ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, el casete de expresión de la reivindicación 10 o la reivindicación 12, o el vector de la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

15. Un miARN aislado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la molécula de miARN produce un nivel disminuido de toxicidad inespecífica.

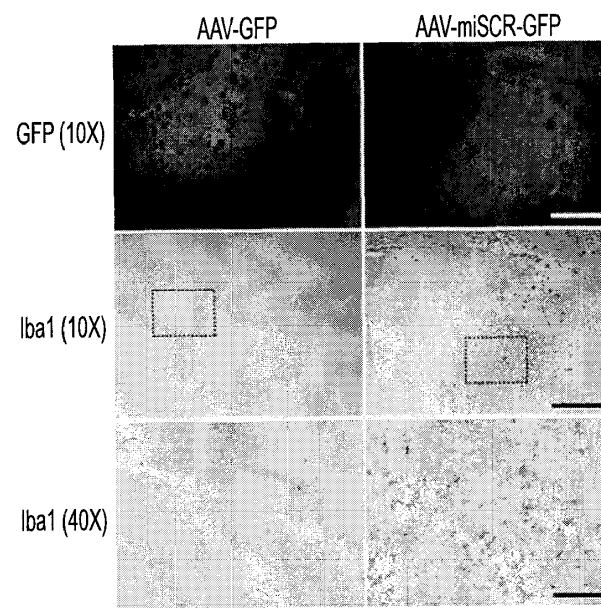
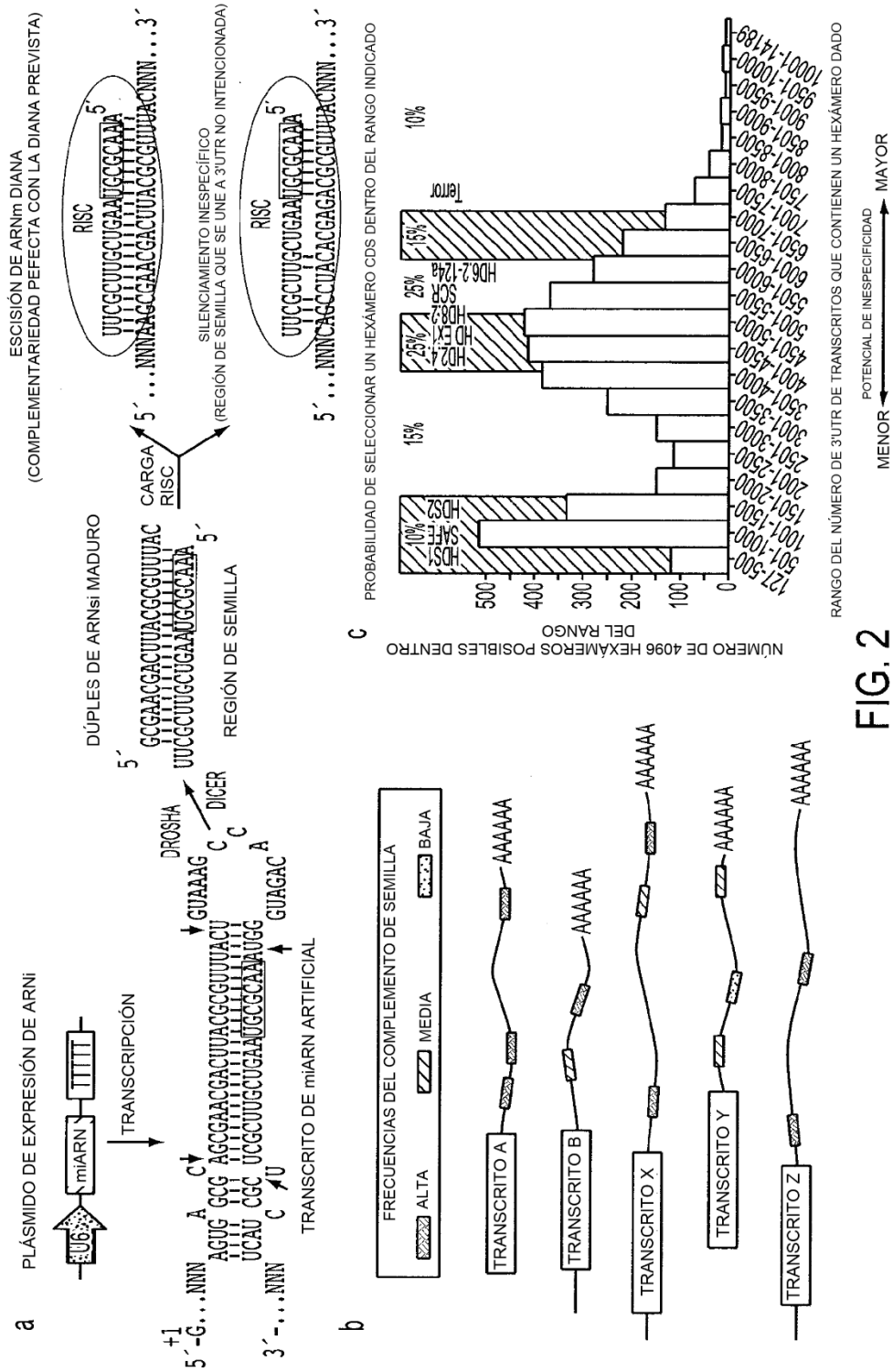


FIG. 1



a

LOS SITIOS EN ARNm DE Htt SE SELECCIONARON PARA CONTENER COMPLEMENTOS DE SEMILLA SAFE ()
Y PERMITIERON UNA CARGA APROPIADA DE CADENA ANTISENTIDO (5' G-C, Y 3' A/G-U)

CDS de ARNm de Htt ...TGTGGTGGCTCGCATGGTCCGATCC...

DÚPLEX DE ARNsi
5'-GCUGGCUCGCAUGGUCGAUANN-3'
5'-CACGACCGAGCGUACCAGCUGU-3'

b

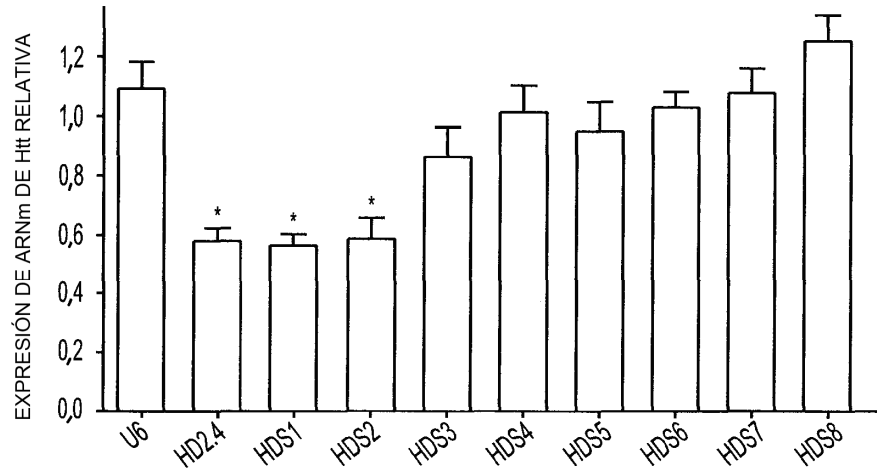


FIG. 3

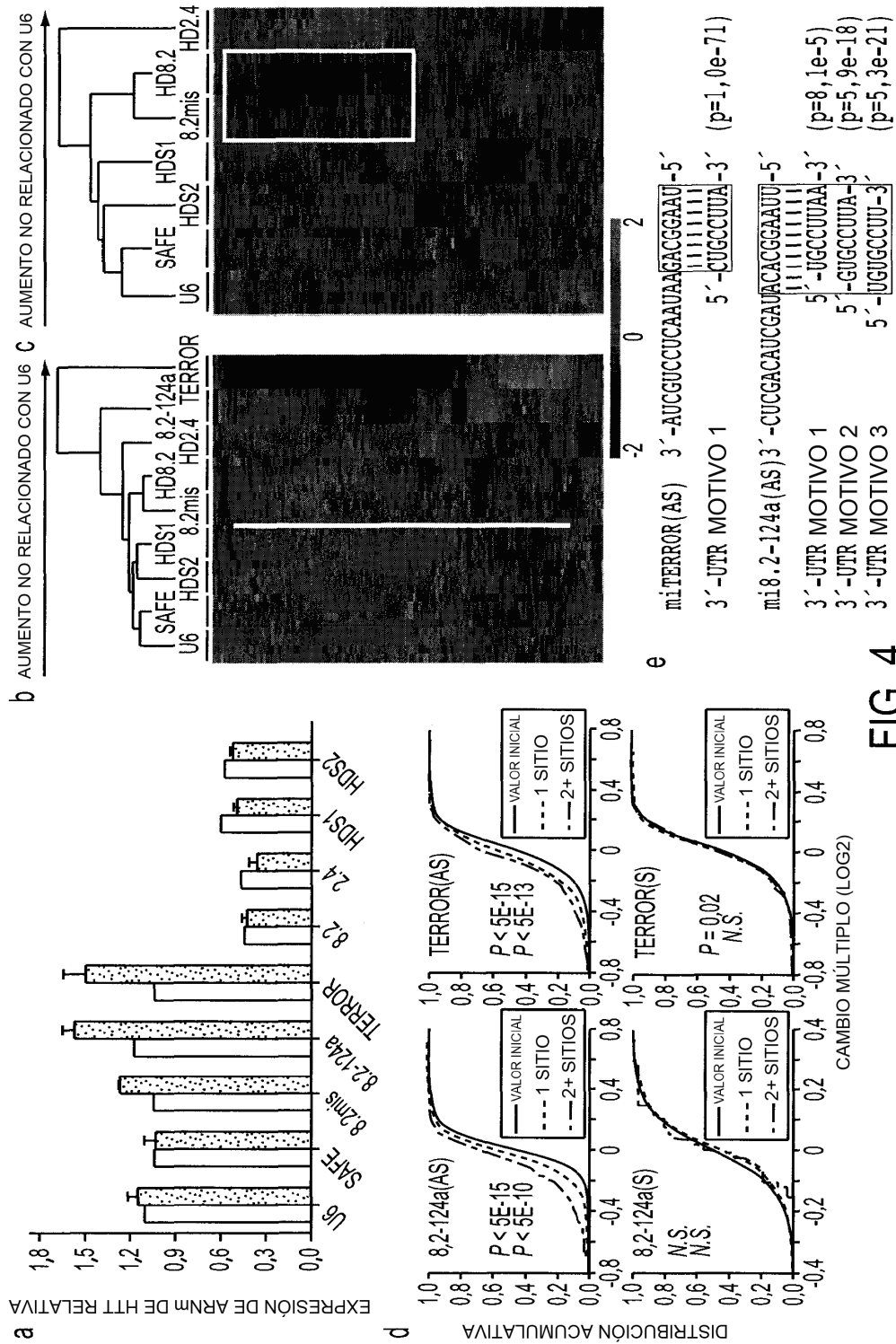


FIG. 4

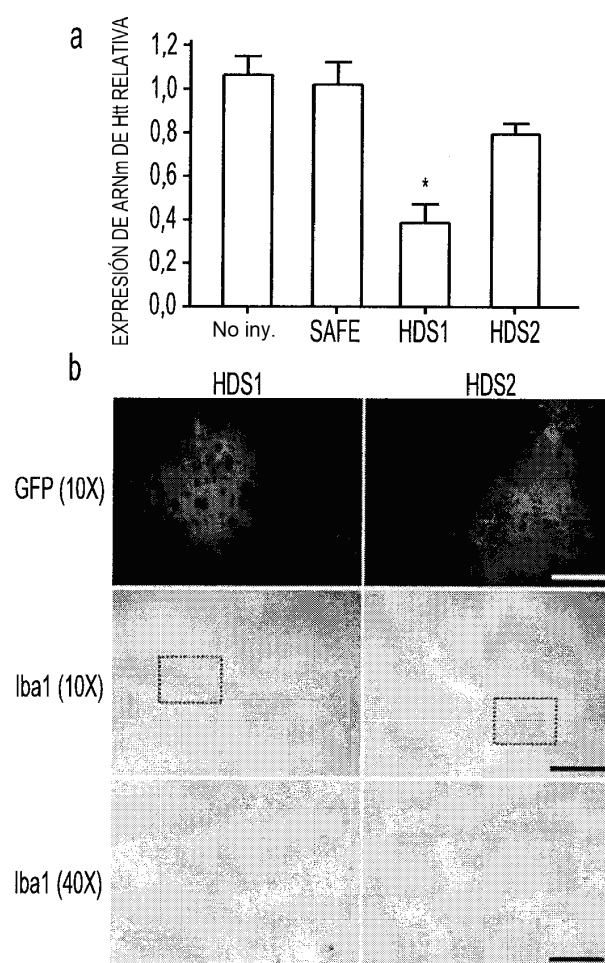


FIG. 5

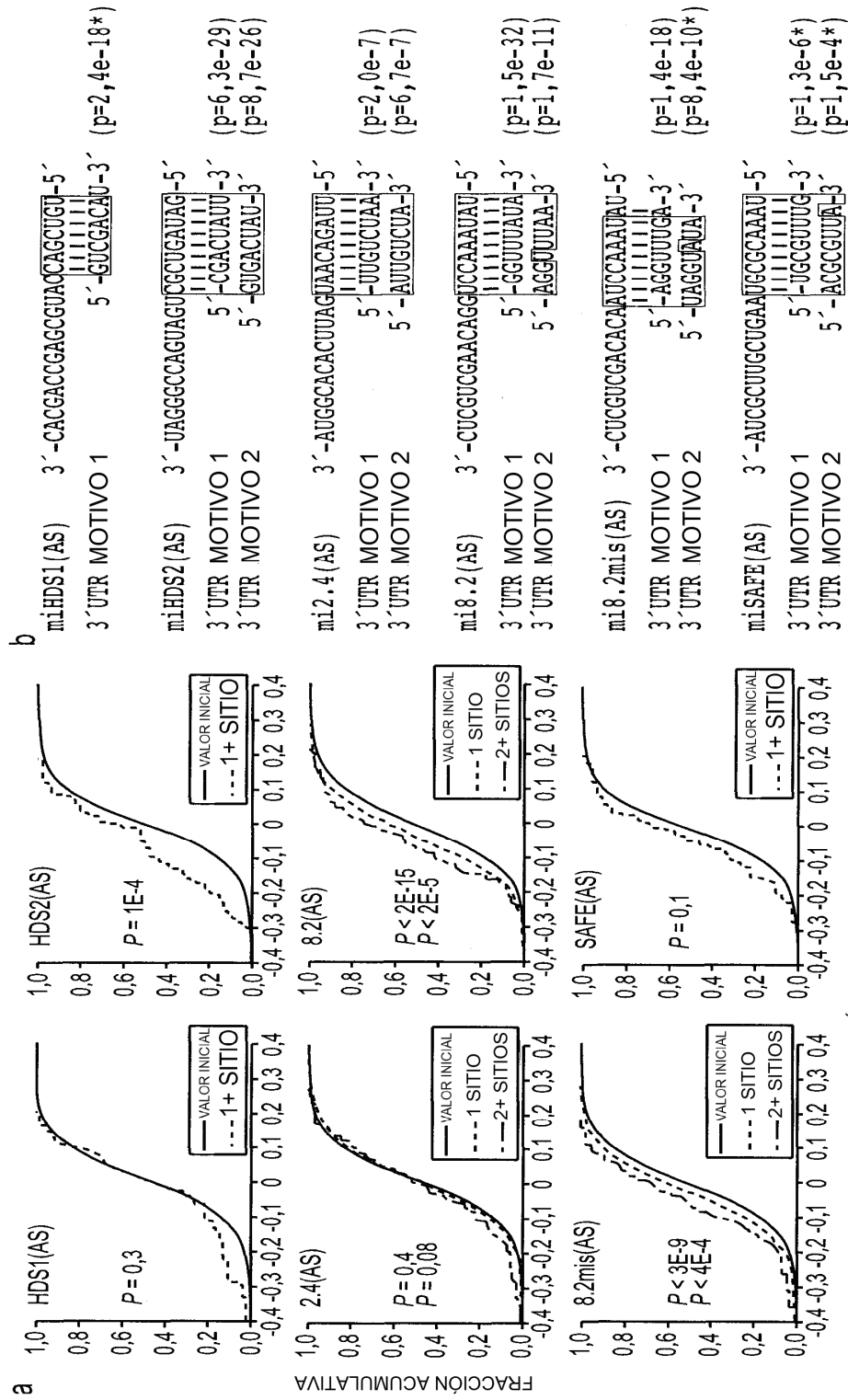


FIG. 6



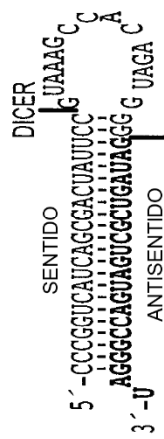
DÚPLEX DE miHDS1 MADURO



FIG. 7



Pre-miHDS2



DÚPLEX DE miHDS2 MADURO

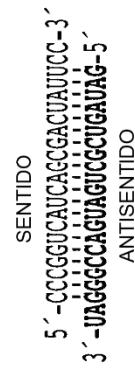


FIG. 8