

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 815**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7105 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2011 E 11799816 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2627339**

54 Título: **Molécula de ARNnpU1 humana modificada, gen que codifica para la molécula de ARNnpU1 humana modificada, vector de expresión que incluye el gen y el uso del mismo en terapia génica**

30 Prioridad:

15.10.2010 IT TO20100840

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

16.09.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FERRARA (100.0%)
Via Savonarola, 9
44100 Ferrara, IT**

72 Inventor/es:

**PAGANI, FRANCO y
PINOTTI, MIRKO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 545 815 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

Molécula de ARNnpU1 humana modificada, gen que codifica para la molécula de ARNnpU1 humana modificada, vector de expresión que incluye el gen y el uso del mismo en terapia génica

5 La presente invención se refiere a moléculas de ARNnp humanas modificadas (a continuación en el presente documento designadas como U1 específicas de exón, ExSpeU1), que son adecuadas para usarse en métodos de terapia génica. En particular, la invención se refiere a moléculas de ARNnp que pueden corregir procesos de corte y empalme aberrantes provocados por mutaciones genéticas y relacionados con enfermedades humanas con diferentes historiales clínicos, que son a menudo muy graves.

10 Muchas enfermedades genéticas humanas (aproximadamente el 15%) están provocadas por mutaciones genéticas que, al interferir en la maduración intracelular correcta del ARN mensajero, comprometen la posterior biosíntesis de proteínas exacta e inducen la síntesis de proteínas no funcionales. Principalmente, las mutaciones puntuales responsables de defectos de corte y empalme se producen en secuencias génicas que son críticas para el reconocimiento del transcrito primario por la maquinaria destinada al procesamiento del mismo. Los sitios donador y aceptor ubicados en los límites exón-intrón, así como elementos reguladores específicos de gen en exones o intrones (Cartegni L *et al.*, 2002; Pagani *et al.*, 2004) están entre las secuencias más significativas. Como consecuencia de estas mutaciones, pueden inducirse diversos acontecimientos moleculares, que lo más frecuentemente producen la exclusión de un exón del transcrito maduro, el denominado salto de exón.

20 Se sabe desde hace mucho tiempo que cambios moleculares en el procesamiento del ARN mensajero, que implican por ejemplo salto de exón, representan el mecanismo etiopatógeno principal de diversas enfermedades humanas, entre las cuales se encuentran la hemofilia B, fibrosis quística y atrofia muscular espinal, que comparten la gravedad de su evolución clínica. Diferentes tipos de mutaciones pueden inducir salto de exón, y específicamente mutaciones en el sitio donador (o sitio de corte y empalme en 5'), mutaciones en el sitio aceptor (sitio de corte y empalme en 3') o mutaciones exónicas. Como ejemplos de diferentes tipos de mutaciones que inducen salto de exón, a continuación se describen tres modelos de enfermedades humanas.

25 El defecto en el factor de coagulación IX (FIX) explica la aparición de hemofilia B, una enfermedad a la que acompañan grados variables de manifestaciones hemorrágicas, algunas veces muy graves e incapacitantes. En algunos casos, la enfermedad está provocada por defectos de corte y empalme. En particular, la exclusión del exón 5 del ARNm durante el proceso de corte y empalme está provocado tanto por mutaciones en la posición -2 dentro del sitio donador del exón 5 del gen del factor IX (F9), como por mutaciones en las posiciones -8 y -9 dentro de la secuencia de poli-pirimidina en el sitio aceptor.

30 Las limitaciones de la terapia actual para la hemofilia B, que se basa principalmente en la infusión frecuente de FIX exógeno recombinante o de FIX derivado directamente de plasma, ponen de relieve la necesidad de desarrollar enfoques alternativos que se caractericen por una mayor eficacia y un efecto de larga duración.

35 La fibrosis quística (CF) es la enfermedad hereditaria congénita mortal más frecuente en la población de raza blanca: un recién nacido de cada 2500-2700 lactantes nacidos vivos se ve afectado por la misma.

La patogenia de esta enfermedad es secundaria a una anomalía de una proteína designada como CFTR (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) ubicado en la membrana apical de células epiteliales y que tiene la función de regular los intercambios hidroelectrolíticos.

40 Como consecuencia de la modificación de CFTR, la transferencia de sales a través de las membranas celulares se ve comprometida, provocando principalmente una producción de secreciones que podrían definirse como "deshidratado": un sudor muy rico en sodio y cloro y una mucosidad densa y viscosa que tiende a obstruir los conductos, comprometiendo la función de diversos órganos y sistemas. En el transcurso de varios estudios, se identificaron muchas modificaciones en la secuencia génica de CFTR asociadas con fibrosis quística, que inducen salto de exón. En particular, el salto del exón 12 está provocado tanto por mutaciones ubicadas dentro del sitio donador de corte y empalme del propio exón, como por mutaciones exónicas.

45 La atrofia muscular espinal (SMA, OMIM 253300, 253550 y 253400) es una enfermedad neuromuscular autosómica recesiva caracterizada por degeneración de motoneuronas alfa de la médula espinal, con una prevalencia estimada de 1/10.000 nacidos. SMA está asociada con síndromes clínicos que van de extremadamente graves, con hipotonía muscular crítica y debilidad desde el nacimiento, a formas más leves en las que la aparición se produce más tarde durante la infancia o la adolescencia. Hasta la fecha, no se ha identificado aún ningún tratamiento para esta enfermedad, que conduce generalmente a la muerte a una edad que depende de la gravedad del historial clínico.

55 En el 95% de los casos, la enfermedad está provocada por la ausencia del gen de SMN1. En el genoma humano, hay un gen homólogo a SMN1 denominado SMN2. Sin embargo, la expresión de SMN2 se ve alterada por una mutación sinónima en el exón que da como resultado una maduración aberrante del ARN mensajero con el consiguiente salto del exón 7 y la inactivación del propio gen. Enfoques diseñados para aumentar el número de transcritos de SMN2 que contienen el exón 7 permitirían por tanto aplicar una terapia de compensación para la

ausencia del gen de SMN1 gracias a la expresión correcta de SMN2, con considerables implicaciones para un posible tratamiento eficaz para SMA.

5 Durante el proceso de corte y empalme, los ARN nucleares pequeños (ARNnp) desempeñan un papel importante como componentes esenciales del espliceosoma, la maquinaria celular destinada a mediar en todo el proceso de maduración del ARNm. En particular, el ARN pequeño U1 (ARNnpU1), de 164 ribonucleótidos de longitud, está codificado por genes que aparecen en varias copias dentro del genoma humano y representa el componente ribonucleico de la partícula nuclear RNPnpU1. Las moléculas de ARNnpU1 tienen una estructura tridimensional de tallo y bucle y dentro de la región 5' incluyen una secuencia monocatenaria, generalmente de 9 nucleótidos de longitud, que puede unirse por apareamiento de bases complementarias al sitio donador de corte y empalme en la molécula de pre-ARNm (Horowitz *et al.*, 1994). La figura 1 muestra una representación esquemática de la estructura de ARNnpU1 silvestre. La secuencia en la región 5' que puede reconocer el sitio donador de corte y empalme se muestra apareada con la secuencia consenso del sitio donador de corte y empalme en los transcritos primarios de genes eucariotas. Una secuencia de este tipo presenta grados variables de conservación y está ubicada en la unión exón/intrón. El reconocimiento mediado por la región en 5' de ARNnpU1 es crítico para definir las uniones exón/intrón en el transcrito primario y para un correcto ensamblaje del complejo del espliceosoma.

15 El creciente número de enfermedades genéticas humanas asociadas con defectos de corte y empalme del pre-ARNm, y la frecuente gravedad de la evolución clínica de las mismas, estimuló en los últimos años la investigación de moléculas terapéuticas dirigidas a corregir defectos de corte y empalme a nivel molecular.

20 El uso de moléculas de ARNnpU1 modificadas que pueden inducir *in vitro* la inclusión correcta del exón y la restauración del corte y empalme correcto del ARNm de factor de coagulación VII en el caso de mutaciones ubicadas en el sitio 5'ss se describe en Pinotti M *et al.* 2008 y Pinotti M *et al.*, 2009. El mecanismo ilustrado se basa en el reconocimiento y la unión del ARNnpU1 modificado directamente sobre el sitio de corte y empalme mutado en 5'. Sin embargo, este método presenta un cierto grado de no especificidad de acción de la molécula de ARNnp terapéutica hacia el gen diana, debido a la conservación relativa de los sitios 5'ss y el consiguiente riesgo de interferir en la maduración de transcritos generados a partir de otros genes silvestres funcionales. Además, requiere el uso de un ARNnpU1 modificado para cada mutación en 5'ss.

30 Gorman L, Mercatante DR, Kole R. Restoration of correct splicing of thalassemic beta-globin pre-mRNA by modified U1 snRNAs, J. Biol. Chem. 17 de noviembre de 2000; 275(46):35914-9, dan a conocer una molécula humana de ARNnp U1 caracterizada por el hecho de que una parte de su región monocatenaria en 5' se sustituye por una secuencia antisentido que se une a una región ubicada en el intrón 2 de β -globina que contiene un sitio de corte y empalme en 3' aberrante, críptico. Esta molécula de ARNnp U1 modificada permite restaurar el corte y empalme correcto del pre-ARNm de β -globina. El sitio de corte y empalme en 3' críptico del transcrito de β -globina se encuentra 126 nucleótidos en el sentido de 5' de la posición 705 en el intrón 2, donde una mutación T \rightarrow G genera un sitio de corte y empalme donador (5') aberrante y activa dicho sitio de corte y empalme aceptor (3') críptico.

35 El documento US20100087511 da a conocer el oligonucleótido antisentido "Anti N1", que se une a una región de SM2. Este oligonucleótido antisentido puede inducir la inclusión del exón 7. Un ARNnp U1 mutante con una longitud aumentada de la región complementaria con el pre-ARNm de desde 6 hasta 11 nucleótidos se da a conocer en Singh NN, Singh RN, Androphy EJ. Modulating role of RNA structure in alternative splicing of a critical exon in the spinal muscular atrophy genes. Nucleic Acid Res. 2007; 35(2):371-89 da a conocer un ARNnpU1 mutante que comprende una región complementaria al sitio de unión exón/intrón.

40 Pagani F, Buratti E, Stuani C, Bendix R, Dörk T, Baralle FE. A new type of mutation causes a splicing defect in ATM. Nat. Genet. abril de 2002; 30(4):426-9. Publicación electrónica del 11 de marzo de 2002 da a conocer que la delección de cuatro nucleótidos en el intrón 20 del gen ATM, o una mutación en el mismo sitio, provoca la introducción de un exón aberrante en el ARNm maduro. También dan a conocer moléculas de ARNnp U1 modificadas que se unen a la región de interés mediante dicha mutación y restauran el procesamiento de normal de intrones.

El documento WO2007002390 da a conocer oligonucleótidos antisentido para la corrección del corte y empalme aberrante en el gen de SMN2.

50 Nlend Nlend R, Meyer K, Schümperli D. Repair of pre-mRNA splicing: prospects for a therapy for spinal muscular atrophy. RNA Biol. Julio-agosto de 2010; 7(4):430-40 da a conocer el uso de oligonucleótidos antisentido para la corrección del corte y empalme de SMN2. Entre otros, se da a conocer el uso de derivados de U7 Sm OPT. La selección como diana del intrón 7 con derivados de U7 Sm OPT provocó un fuerte salto del exón 7.

55 La presente invención demuestra que moléculas de ARNnp U1 modificadas complementarias a las secuencias de intrón en el sentido de 3' del sitio de corte y empalme en 5' (y en el presente documento definidas como U1 específicas de exón, ExSpeU1), pueden restaurar, durante el proceso de corte y empalme, la inclusión del exón que se alteró por diferentes tipos de mutaciones. En tres modelos de enfermedad genética humana diferentes de interés terapéutico (atrofia muscular espinal, hemofilia y fibrosis quística), la presente invención demuestra que una única ExSpeU1 o un grupo de ExSpeU1 pueden incluir la inclusión del correspondiente exón para cada modelo de

enfermedad. Una única ExSpeU1 o un grupo de ExSpeU1 corrigen el salto de exón provocado por mutaciones en el sitio donador, mutaciones en el tramo de poli-pirimidina del sitio aceptor y mutaciones en secuencias de exón reguladoras. La eficacia de corrección obtenida con las ExSpeU1 es la misma que la descrita en la técnica anterior, pero garantizaría una mayor selectividad de acción sobre el transcrito del gen diana de interés terapéutico. El enfoque de ExSpeU1 permite usar un único U1-ARNnp modificado para corregir un panel de diferentes mutaciones genéticas que provocan salto de exón.

Estos y otros objetos se logran mediante una molécula de ARNnpU1 humana modificada tal como se define en la reivindicación 1. La molécula de ARNnpU1 humana modificada se caracteriza porque una parte de la secuencia monocatenaria de nucleótidos en la región en 5' del ARNnpU1 humano silvestre se reemplaza por una secuencia monocatenaria de unión de nucleótidos que puede hibridarse con una secuencia de nucleótidos diana en el transcrito primario de un gen diana de interés terapéutico que porta una mutación que induce corte y empalme aberrante. La secuencia de nucleótidos diana de la molécula de ARNnpU1 está ubicada en una región del pre-ARNm comprendida entre 2 y 50 pares de bases en el sentido de 3' de un sitio de unión exón/intrón (5'ss), siempre que la secuencia de nucleótidos diana no comprenda dicho sitio de unión exón/intrón. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos diana tiene de 5 a 50 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de 9 a 30 nucleótidos.

En comparación con la técnica anterior, las moléculas de ARNnpU1 objeto de la invención tienen la ventaja de realizar una acción dirigida y selectiva (específica de exón), ya que se unen a secuencias de nucleótidos diana en el transcrito primario localizadas dentro de las regiones de intrón que flanquean al sitio donador de corte y empalme, que presentan un menor grado de conservación en comparación con las secuencias de los sitios de unión exón/intrón. Sin embargo, es sorprendente que, aunque funcionan sobre secuencias diana que no incluyen el sitio de unión exón/intrón, las moléculas de ARNnpU1 de la invención pueden inducir toda la inclusión del exón en presencia de diferentes tipos de mutaciones, incluyendo las exónicas o aquéllas en el sitio aceptor.

Se definen características adicionales de la invención en las reivindicaciones adjuntas, que son parte integral de las enseñanzas técnicas de la presente memoria descriptiva.

En una realización preferida, la parte de la región monocatenaria en 5' del ARNnpU1 silvestre que se reemplaza por la secuencia de unión de nucleótidos tiene desde 9 hasta 12 nucleótidos de longitud.

Preferiblemente, las mutaciones que se corrigen por las ExSpeU1 y provocan salto de exón están ubicadas en la secuencia comprendida entre 3 y 50 pares de bases en el sentido de 5' de un sitio de unión intrón/exón (sitio de corte y empalme en 3'), mutaciones exónicas y mutaciones dentro de la secuencia consenso del sitio donador de corte y empalme.

Los genes de factor de coagulación IX, SMN2 y CFTR se mencionan a modo de ejemplo entre los genes de interés terapéutico, es decir los que portan mutaciones relacionadas con enfermedades que se prestan por sí mismas al tratamiento con las ExSpeU1 de la presente invención.

En una realización preferida, la molécula de ARNnpU1 humana modificada de la invención incluye una secuencia de unión de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 11, más preferiblemente desde 1 hasta 10.

En una realización preferida, el gen comprende una secuencia promotora y una secuencia de señal de poliadenilación. Los inventores verificaron que el promotor endógeno del gen que codifica para ARNnpU1 humano es particularmente adecuado, aunque también pueden usarse otros promotores conocidos *per se*, que puede seleccionar fácilmente un experto habitual en la técnica.

La secuencia de la hebra directa del gen que codifica para ARNnpU1 humano silvestre (designado como SEQ ID NO: 12 en la lista de secuencias) se notifica a continuación en el presente documento a modo de ejemplo, en la que la parte de la región monocatenaria en 5' que se reemplaza en la molécula de ARNnpU1 modificada por la secuencia de unión, está en negrita. Las secuencias de los sitios de restricción BglII y BclI únicos, usados para insertar las secuencias de unión, están subrayadas. Además de la región que codifica para ARN, que se muestra en mayúsculas, la secuencia génica de SEQ ID NO: 12 también comprende algunos elementos reguladores requeridos para su expresión, tales como el promotor y la señal de poliadenilación.

5'-

taaggaccagcttctttgggagagaacagacgcaggggcgggagggaaaaagggagagggcagacgtcacttccccttgg

cggctctggcagcagattggtcgggtgagtggcagaaagggcagacggggactgggcaaggcactgtcgggtgacatcacgg

acagggcgacttctatgtagatgaggcagcgcagaggctgacgttcttccacttctgcttcaccacgaaggagttcccgt

gccctgggagcgggttcaggaccgctgatcggaagtgagaatcccagctgtgtgtcagggctggaaagggctcgggagtg
 cgcggggcaagtgaccgtgtgtgtaaagagtgagggcgtatgaggctgtgtcggggcagaggcccaagatctgATACT
TACCTGGCAGGGGAGATACCATGATCACGAAGGTGGTTTTCCAGGGCGAG
GCTTATCCATTGCACTCCGGATGTGCTGACCCCTGCGATTTCGCCAAATGTG
GGAAACTCGACTGCATAATTTGTGGTAGTGGGGGACTGCGTTCGCGCTTTCC
 CCTGactttctggagtttcaaagtagactgtacgctaa-3' (SEQ ID NO:12)

5 Obviamente, la secuencia génica anterior se proporciona únicamente a modo de ejemplo. Alternativamente, con el fin de construir el gen que codifica para el ARNnpU1 modificado de la invención, puede usarse cualquier secuencia génica homóloga a SEQ ID NO: 12, que pueda codificar para un ARNnpU1 que puede mediar eficazmente en el reconocimiento del sitio donador de corte y empalme.

El método de preparación para las diferentes moléculas de ARNnpU1 modificadas objeto de la invención, que contienen las diferentes secuencias de unión, se describe en detalle en la sección de los ejemplos.

10 Todavía otro objeto de la invención es un vector de expresión que comprende un gen aislado tal como se definió anteriormente. El vector de expresión preferido en la mayoría de los casos es un vector de virus adenoasociado, aunque también pueden usarse otros tipos de vectores de expresión, que se conocen *per se* por un experto habitual en la técnica.

15 Tal como se describió anteriormente, la molécula de ARNnpU1 humana modificada, el gen que codifica para una molécula de ARN de este tipo y el vector que incluye dicho gen son adecuados para usarse para el tratamiento terapéutico de una enfermedad genética provocada por o asociada con un corte y empalme aberrante y caracterizada por salto de exón. Preferiblemente, pero no a modo de limitación, la enfermedad es fibrosis quística, hemofilia B o atrofia muscular espinal.

20 Para ese fin, la molécula de ARNnpU1 modificada, el gen y/o el vector se formulan en una composición farmacéutica que comprende, además de las moléculas terapéuticamente activas, un portador farmacéuticamente aceptable. La selección del portador y de los excipientes farmacéuticos opcionales está muy dentro de la experiencia de un experto habitual en la técnica.

Otro aspecto de la invención es un método *in vitro* para restaurar, en una célula en cultivo, el corte y empalme correcto de un gen diana de interés terapéutico que porta una mutación que induce un corte y empalme aberrante, transfectando la célula en cultivo con un vector de expresión tal como se definió anteriormente.

25 Las moléculas de ARNnpU1 modificadas objeto de la invención se generaron usando métodos de biología molecular convencionales que se conocen bien por un experto habitual en la técnica. Para evaluar los efectos del ARNnpU1 objeto de la invención sobre la corrección de los procesos de corte y empalme aberrantes, y para identificar los más eficaces, los inventores usaron extensamente el método de minigenes, cuya aplicación se ha documentado ampliamente en la bibliografía científica. Un método de este tipo comprende clonar una parte del gen que porta la mutación que provoca los defectos de corte y empalme en un vector de expresión y luego transfectar el vector recombinante en células en cultivo *in vitro*. El análisis de los transcritos originados a partir de la parte del gen de interés se lleva a cabo mediante RT-PCR, permitiendo así la identificación de moléculas de ARNm de longitud anómala derivadas de los procesos de corte y empalme aberrantes. La aparición de transcritos de interés de longitud normal tras la cotransfección de los ARNnpU1 modificados con los minigenes, y la secuenciación de los mismos, representa una indicación clara de la capacidad de las moléculas de ARNnpU1 para restaurar procesos de
 30 de corte y empalme correctos.
 35

Sin embargo, la analogía entre la restauración del procesamiento de ARN mensajero correcto y la restauración de los niveles de proteína finales, que tienen la significación terapéutica real, no es obvia.

40 Por este motivo, los inventores usaron el método de minigenes híbridos que permite el estudio del corte y empalme, pero también de la proteína expresada. Este método lo introdujeron los inventores para estudiar una mutación de corte y empalme en el factor de coagulación FVII (Pinotti *et al.*, 2009). Un método de este tipo comprende clonar en un vector de expresión una parte de un gen que contiene unos cuantos intrones en la región que porta la mutación que provoca el defecto de corte y empalme, dentro de la secuencia codificante completa ("constructo de ADNc de corte y empalme competente"), y posteriormente transfectar el vector recombinante en células en cultivo *in vitro*. El análisis de los transcritos originados a partir de la parte del gen de interés mediante RT-PCR, y la medición de los niveles y la actividad de la proteína sintetizada permiten la evaluación de la restauración de la función biológica.
 45

Los siguientes se proporcionan a modo de ilustración y no de limitación del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO 1: Generación de los ARNnp U1 modificados

Se generaron los ARNnp U1 modificados mediante el siguiente procedimiento: se digirió el plásmido que contenía la secuencia del gen de U1-ARNnp silvestre, que es el U1-ARNnp no modificado, con las enzimas de restricción BglII y BclI. Se reemplazó la secuencia comprendida entre estos dos sitios de restricción por un oligonucleótido bicatenario que comprende la secuencia de unión. Las secuencias directa e inversa de cada oligonucleótido se describen en la tabla 1 a continuación y los U1-ARNnp modificados resultantes se nombran tras los oligonucleótidos empleados.

Además, la figura 2 muestra una representación esquemática de los elementos génicos de ARNnp U1. Se indica la estrategia de clonación mediante la cual se prepararon los diferentes ARNnp U1. La figura 2 muestra el gen de ARNnpU1 con los elementos promotores DSE y PSE, la región que codifica para ARNnp U1 (en la parte central) y la caja de procesamiento en 3', insertada en un vector de plásmido (pGEM). El sitio de inicio de la transcripción está indicado por una flecha. La secuencia entre los sitios de restricción BglII y BclI incluye la región que codifica para la cola de ARNnpU1 monocatenaria que se ha reemplazado por oligonucleótidos que son específicos para generar los ARNnp U1 modificados indicados en la tabla 1.

Tabla 1

Oligonucleótidos para el	SEQ ID
exón 5 de U1 FIX	
FIX U1 ex5 C3T5A6 dir	GATCTCattatgacctgGCAGGGGAGATACCAT 13
FIX U1 ex5 C3T5A6 inv	GATCATGGTATCTCCCCTGCcaggtcataatGA 14
U1FIXex5 SH-7 dir	gatctcataTGACCTGCTGGgcaggggagataccat 15
U1FIXex5 SH-7 inv	gatcatggtatctcccctgcCCAGCAGGTCAtatga 16
U1FIXex5 SH1 dir	gatctcataGATTATGACgcaggggagataccat 17
U1FIXex5 SH1 inv	gatcatggtatctcccctgcGTCATAATCtatga 18
U1FIXex5 SH7 dir	GATCTCatcttattcagatGCAGGGGAGATACCAT 19
U1FIXex5 SH7 inv	GATCATGGTATCTCCCCTGCatctgaataagatGA 20
U1FIXex5 SH9 dir	GATCTCattcttattcagGCAGGGGAGATACCAT 21
U1FIXex5 SH9 inv	GATCATGGTATCTCCCCTGCctgaataagaatGA 22
U1FIXex5 SH10 dir	GATCTCatatcttattcaGCAGGGGAGATACCAT 23
U1FIXex5 SH10 inv	GATCATGGTATCTCCCCTGCtgaataagatatGA 24
U1FIXex5 SH13 dir	gatctcataAAATCTTATgcaggggagataccat 25
U1FIXex5 SH13 inv	gatcatggtatctcccctgcATAAGATTTtatga 26
U1FIXex5 SH16 dir	gatctcataTAAAAAATCTgcaggggagataccat 27
U1FIXex5 SH16 inv	gatcatggtatctcccctgcAGATTTTTTAtatga 28
U1FIXex5 SH22 dir	gatctcataTTTCTTTAAAgcaggggagataccat 29
U1FIXex5 SH22 inv	gatcatggtatctcccctgcTTTAAAGAAAtatga 30
U1FIXex5 SH33 dir	GATCTCattcagatacagaGCAGGGGAGATACCAT 31
U1FIXex5 SH33 inv	GATCATGGTATCTCCCCTGCtctgtatctgaatGA 32
U1FIXex5 SH38 dir	GATCTCatagtttcagatGCAGGGGAGATACCAT 33
U1FIXex5 SH38 inv	GATCATGGTATCTCCCCTGCatctgaaactatGA 34
U1FIXex5 SH63 dir	GATCTCatttatgtaggtGCAGGGGAGATACCAT 35
U1FIXex5 SH63 inv	GATCATGGTATCTCCCCTGCacctacataaatGA 36
Oligonucleótidos para U1 SMN	
U1ex7SMN -1G-2G-3A inv	GAT CAT GGT ATC TCC CCT GCG GAG TAA GTT ATG A 37 GAT CTC ATA ACT TAC TCC GCA GGG GAG ATA CCA
U1ex7SMN -1G-2G-3A dir	T 38

ES 2 545 815 T3

U1ex7SMN sh2 inv	GAT CAT GGT ATC TCC CCT GCT AAG TCT GCT ATG A GAT CTC ATA GCA GAC TTA GCA GGG GAG ATA CCA	39
U1ex7SMN sh2 dir	T	40
U1ex7SMN sh17 inv	GAT CAT GGT ATC TCC CCT GCT ATG AAA GTT ATG A	41
U1ex7SMN sh17 dir	GAT CTC ATA ACT TTC ATA GCA GGG GAG ATA CCA T	42

Oligonucleótidos para el exón 12 de U1 CFTR

U1 -1A 4T dir	gatctcATACaTACtTGgcaggggagataccat	43
U1 -1A 4T inv	gatcatggtatctcccctgcCAaGTAAtGTATga	44
U1 G3 T4 dir	gatctcATACacACCTGgcaggggagataccat	45
U1 G3 T4 INV	gatcatggtatctcccctgcCAGGTgtGTATga	46
U1 T4 A5 dir	gatctcATAtaTACCTGgcaggggagataccat	47
U1 T4 A5 INV	gatcatggtatctcccctgcCAGGTAtaTATga	48
U1 CF sh+1 dir	gatctcTCAAAGAACATACgcaggggagataccat	49
U1 CF sh+1 INV	gatcatggtatctcccctgcGTATGTTCTTTGAga	50
CF12 SH+9 Dir	gatctcATAGGTATTCAAAGcaggggagataccat	51
CF12 SH+9 INV	gatcatggtatctcccctgcTTTGAATACCTATga	52
CF12 SH+11 Dir	gatctcATAAGTAAGGTATTCAgcaggggagataccat	53
CF12 SH+11 Inv	gatcatggtatctcccctgcTGAATACCTTACTTATga	54
CF12 SH+33 DIR	gatcatggtatctcccctgCTCATGCTAAAATAgA	55
CF12 SH+33 INV	gatctcTATTTTAGCATGAGcaggggagataccat	56

EJEMPLO 2: Transfección de los minigenes en células en cultivo y análisis de los productos de corte y empalme

5 Se insertaron los vectores de contención en las células mediante transfección transitoria con Lipofectamine (liposomas). Tras la extracción del ARN celular total con Trizol, se analizó el ARN mediante RT-PCR con cebadores específicos.

La reacción se produce en dos etapas: la transcripción inversa del ARN para dar una hebra de ADNc mediante una transcriptasa inversa usando cebadores al azar como moldes, y amplificación del ADNc obtenido mediante una ADN polimerasa.

Se llevó a cabo la reacción PCR en un volumen final de 25 µl de una mezcla que contenía:

- 10 - 5 µl de tampón AMV/Tfl 5x adecuado para el correcto funcionamiento de ambas enzimas mencionadas anteriormente;
- 1 µl de mezcla de dNTP 10 mM;
- 50 pmol de cebador directo y 50 pmol de cebador inverso;
- 2 µl de MgSO₄ 25 mM;
- 15 - 2 µl de ARN extraído de células;
- 1 µl de AMV-RT (0,1 µl/µl), 1 µl de Tfl ADN polimerasa;
- c.s. de H₂O ultrapura

20 Se realizó la etapa de transcripción inversa a 45°C durante 45 min. Entonces se llevó a cabo una etapa en la que se ajustó la mezcla de PCR a la temperatura de 94°C durante 2 min, seguido por 40 tandas de PCR, y finalmente por una etapa de extensión durante 7 s a 68°C.

Se separaron los productos de amplificación mediante electroforesis en un gel de agarosa y/o se procesaron mediante electroforesis capilar.

Ejemplo 3: Mutaciones exónicas cerca del sitio donador y mutaciones en la secuencia de poli-pirimidina en el sentido de 5' del sitio aceptor del exón en 5' del factor de coagulación IX están asociadas con hemofilia B

- 5 En el gen del factor IX (F9), las mutaciones exónicas en la posición -2 dentro del sitio donador, así como las mutaciones en las posiciones -8 y -9 dentro del sitio aceptor del exón 5, están asociadas con hemofilia B. Es interesante observar que las mutaciones en la posición -2 en el exón son sinónimas y no modifican la secuencia codificante sino que inducen salto de exón y por tanto pueden clasificarse como mutaciones de corte y empalme. Las mutaciones en las posiciones -8 y -9 dentro del sitio aceptor también inducen el salto del exón 5.
- 10 La tabla 2 muestra las mutaciones comentadas que se identificaron en pacientes afectados por hemofilia B (base de datos internacional de hemofilia B). Los nucleótidos pertenecientes al exón 5 se muestran en mayúsculas, mientras que los pertenecientes al intrón están en minúsculas.

Cada posición, mostrada en la parte inferior de la figura, se ve afectada por una o más mutaciones, cuyo cambio de nucleótido se muestra en negrita.

15 Tabla 2

	Posición	Sustitución de nucleótido	Secuencia del sitio aceptor/donador <i>Posiciones: -12 a -1\+1 a +6</i>
Sitio aceptor	-8	T>G	tgctgcttttag ATG
	-9	T>G	tgcgctcttttag ATG
Sitio donador	-2	A>C	<u>CGG</u> gtcata
	-2	A>G	<u>CGG</u> gtcata
	-2	A>T	<u>CTG</u> gtcata

Se construyó un vector para la expresión de un constructo de minigén designado como pTB Ndel FIX para estudiar el corte y empalme de FIX normal y mutado. Para hacer esto, se insertó una parte de ADN genómico a 308 pb en el sentido de 5' del exón 5 y a 283 pb en el sentido de 3' de la región afectada por las mutaciones en un vector ampliamente usado para estudiar el corte y empalme *in vitro*, el plásmido pTBNdel (Pagani *et al.*, 2000; Pagani *et al.* 2002; Pagani *et al.*, 2003).

En la figura 3, se representa esquemáticamente la parte central del constructo pTB FIX ex5 usado para estudiar el corte y empalme. Los rectángulos representan las regiones centrales del constructo de α -globina y del exón 5 de FIX, representándose los intrones como líneas. Se clonaron el exón 5 y las regiones intrónicas flanqueantes (IVS4 e IVS5) en el plásmido pTB. La transcripción está bajo el control del promotor de α -globina y del potenciador de SV40. Se indican las dos posibles isoformas de corte y empalme.

Tras insertar las mutaciones, los inventores han demostrado entonces el efecto causante de las mismas mediante la expresión de minigenes generados en células eucariotas HepG2, un modelo celular ideal para estudiar proteínas de origen hepático, tales como FIX. En particular, se insertaron los vectores en las células mediante transfección transitoria y se analizó el ARN tal como se indica en el método adjunto, usando los oligonucleótidos alfa2-3 y BRA2 como cebadores. Específicamente, todas las mutaciones inducen salto de exón (figura 4).

En la tabla 3, se notifican la lista de los U1-ARNnp modificados creados, las secuencias diana de los mismos y la localización de los mismos alrededor del sitio donador.

Tabla 3: Secuencias de unión de los U1-ARNnp modificados para la corrección de los defectos de corte y empalme del exón 5 del gen del factor IX

ARNnp U1 de FIX	Secuencia de unión (5'→3')	Secuencia diana (5'→3')	Longitud (pb)	SEQ ID NO:
C3T5A6	uau gaccug	cagg tcata	9	57
FIX-7	ug accugcugg	ccagcag gtca	11	58
FIX1	aga uuau gac	gtcata aatct	9	1
FIX7	ucu uuu caga	tctga ataaga	13	2
FIX9	ucu uuu ca	tga ataaga	9	3

FIX10	aucuuauuc	gaataagat	9	4
FIX13	aaaaucuua	taagatfff	9	5
FIX16	uaaaaaauc	gattttta	9	6
FIX22	uuucuuaa	ttaaagaaa	9	7
FIX33	auucagauacaga	tctgtatctgaat	13	7a
FIX38	auaguucagau	atctgaaactat	12	7b
FIX63	auuuanguaggu	acctacataaat	12	7c

En la figura 5, se muestra la localización de los sitios de unión en los ARNnp U1 modificados empleados para la corrección de defectos de corte y empalme del exón 5 del factor de coagulación IX. La secuencia del exón 5 se indica en mayúsculas, mientras que la secuencia restante indica el intrón.

5 Se sometieron a prueba los diferentes ARNnp U1 modificados para determinar la mutación en la posición -2C, y en la figura 6 se muestra su efecto sobre el porcentaje de inclusión del exón 5. Tal como puede observarse, muchos ARNnp U1 modificados pueden aumentar significativamente el porcentaje de inclusión del exón 5, compensando de ese modo los efectos de la mutación en la posición -2C. Esto indica que la unión de ARNnp U1 al sitio donador o en las proximidades (ExSpeU1) favorece la definición del exón 5. La eficacia depende de la posición, y el U1-FIX1, FIX9, FIX10 muestran una mayor actividad. La eficacia disminuye con la distancia creciente desde el sitio de corte y empalme 5'ss. Es importante observar que la complementariedad de ARNnp U1 con secuencias intrónicas no conservadas que flanquean al sitio de corte y empalme es importante para aumentar la especificidad del mismo. Además, debe señalarse que incluso pequeños aumentos en FIX (>2% de lo normal) darían como resultado una mejora significativa de la tendencia hemorrágica de los pacientes. Por este motivo, incluso las moléculas de ExSpeU1 menos eficientes pueden tener una significación terapéutica en hemofilia B, así como en otros defectos de coagulación. Con las moléculas de ARNnpU1 modificadas se lograron efectos análogos con las otras mutaciones dentro del sitio donador (-2A>G, -2A>T) y el sitio aceptor (-8T>G, -9T>G).

Cabe destacar particularmente la demostración de que un único ARNnpU1 modificado, y particularmente el que se aparea en la posición 9 (FIX9), puede restaurar significativamente el corte y empalme en presencia de todas las diferentes mutaciones investigadas.

20 En la figura 7, se muestran los datos relacionados con este hallazgo, nunca notificados hasta ahora.

La eficacia de cualquier enfoque terapéutico queda atestiguada por la capacidad del mismo para inducir síntesis de proteínas, cuyos niveles disminuyen en los estados patológicos.

25 Para verificar si la corrección observada a nivel del ARN mensajero da como resultado un aumento de la síntesis y función del FIX secretado, se creó un minigén en el que el exón 5 y sus secuencias intrónicas flanqueantes se han insertado en la secuencia codificante de longitud completa de FIX. La figura 8 notifica esquemáticamente el constructo generado para este estudio y clonado en el vector pBskFIX. Los rectángulos indican las secuencias codificantes, con el codón de iniciación ATG y el codón de terminación TAA, mientras que los intrones se notifican como líneas. La transfección de este minigén en células de riñón de hámster BHK, seleccionadas por su capacidad para sintetizar y secretar un FIX funcional, demostró que el ARN mensajero se procesa y traduce correctamente en una proteína (figura 9). De hecho, se miden cantidades considerables de proteína funcional en el medio de cultivo. En cambio, mutaciones en el sitio donador (-2A>G, -2A>T) o en el sitio aceptor (-8T>G, -9T>G) provocan la exclusión del exón 5 y la síntesis de una variante de proteína truncada no funcional en un ensayo de coagulación normal. Mediante inmunotransferencia de tipo Western (panel superior), se demostró realmente que la mutación provocaba la síntesis de una variante de FIX que tenía un menor peso molecular, debido a la ausencia del exón 5 en la secuencia codificante. Ninguna actividad de coagulación apreciable corresponde a esta forma (panel inferior).

La expresión del ExSpeU1 fix9 intrónico puede restaurar el corte y empalme y aumentar los niveles de FIX secretado funcional hasta niveles que, si se alcanzaran en pacientes, estarían bastante por encima del umbral terapéutico. Estos resultados confirman la eficacia del enfoque de ExSpeU1.

Ejemplo 4: Atrofia muscular espinal

40 Se usaron vectores que expresan los minigenes SMN1 (pCI-SMN1) y SMN2 (pCI-SMN2) para el estudio (Hua *et al.*, 2007). Tales minigenes se usan ampliamente para validar el efecto de moléculas terapéuticas que pueden corregir el defecto de corte y empalme en el gen de SMN2 (Hua *et al.*, 2007; Hua *et al.*, 2008).

45 Los dos minigenes se componen de 111 nucleótidos del exón 6, 200 nucleótidos del intrón 6, los 54 nucleótidos del exón 7, los 444 nucleótidos del intrón 7 y los primeros 75 nucleótidos del exón 8, bajo el control del promotor de CMV. Los dos minigenes difieren por la presencia de una sustitución de nucleótido en la posición 6 en el exón 7. En pCI-SMN1 hay una C, mientras que en pCI-SMN2 hay una T. Una sustitución sinónima de este tipo induce un

defecto de corte y empalme en pCI-SMN2 con salto del exón 7 en el transcrito maduro. En la figura 10, se representa esquemáticamente el minigén pCI-SMN2. Se indica la variante sinónima en la posición +6T en el exón, que induce salto de exón.

5 Muchas pruebas experimentales han demostrado que la corrección del corte y empalme en el gen de SMN2 representa una estrategia terapéutica eficaz en SMA (Hua *et al.*, 2007; Hua *et al.*, 2008; Lorson *et al.*, 2010). La tabla 5 muestra una lista de los U1-ARNnp modificados generados, las secuencias diana de los mismos y su localización alrededor del sitio donador. Se sometieron a prueba los diferentes U1-ARNnp modificados y su efecto sobre el porcentaje de inclusión del exón 7, en el minigén de SMN2 y como control en el minigén de SMN1.

10 **Tabla 5:** Secuencias de reconocimiento (U1-SR) en el gen para los U1-ARNnp modificados para la corrección del defecto de corte y empalme del exón 7 en el gen de SMN2

U1-ARNnp de SMN	Secuencia de unión (5'→3')	Secuencia diana (5'→3')	Longitud (pb)	SEQ ID NO:
-1G-2G-3A	acuuacucc	ggagtaagt	9	60
SMN_SH2	gcagacuua	taagtctgc	9	8
SMN_SH17	acuuucaua	tatgaaagt	9	9

La figura 11 muestra la localización de los ARNnp U1 de SMN modificados empleados para corregir el defecto de corte y empalme del gen de SMN2.

15 Se insertaron los minigenes en células HeLa mediante transfección transitoria con Lipofectamine (liposomas). Se analizó el ARN mediante RT-PCR tal como se indicó en el ejemplo 2. Entonces se sometió el ARN extraído de las células a RT-PCR con los cebadores pCIfwdB y E8-75 R para evaluar los productos de corte y empalme.

20 Tal como puede observarse en la figura 12, la transfección del plásmido pCI SMN2 en células en cultivo muestra principalmente el salto del exón 7. La cotransfección con el plásmido de control U1-Wt (pocillo 2) no tuvo ningún efecto. La cotransfección de los plásmidos U1ex7SMN -1G-2G-3A (pocillo 3), U1ex7SMN sh2 (pocillo 4) y U1ex7SMN sh17 (pocillo 5) induce una disminución significativa en el porcentaje de inclusión del exón 7. La cotransfección de los diferentes ARNnp U1 de SMN modificados en el plásmido de control de SMN1 no mostró ningún efecto.

25 En particular, la figura 12 muestra el efecto de los U1 de SMN modificados sobre el corte y empalme de SMN2. Se indican el perfil de corte y empalme del exón 7 del gen de SMN2 (pocillo 1) y el efecto de la coexpresión de los ARNnp U1 modificados (pocillos 2-5) en la parte superior de la figura. Se indican las dos isoformas de inclusión (+) y exclusión (-) del exón 7. En el panel inferior, el histograma muestra el porcentaje de inclusión del exón 7, y por tanto, del corte y empalme correcto. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes.

Ejemplo 5: Mutaciones en el exón y el sitio donador del exón 12 de CFTR asociadas con fibrosis quística

30 La fibrosis quística está provocada por mutaciones en el gen de CFTR. En la tabla 6, se indican mutaciones localizadas en el sitio de corte y empalme del exón 12, asociadas con formas graves de la enfermedad, que inducen salto de exón aberrante. Unas cuantas mutaciones localizadas en el exón 12 inducen salto de exón (Pagani *et al.*, 2003). En la tabla 7, se indican mutaciones exónicas que inducen la exclusión del exón 12.

Tabla 6: Lista de mutaciones en el sitio donador del exón 12 del gen de CFTR. Las mutaciones se muestran en negrita

Posición	Sustitución de nucleótido	Secuencia del sitio donador del exón 12 de CF <i>Posiciones: -3-2-1\+1+2+3+4+5+6</i>
-1	G>A	AAA\gtatgt
-1	G>T	AAT\gtatgt
+3	A>G	AAG\gtgtgt
+3	A>C	AAG\gtctgt
+5	T>A	AAG\gtatat

Tabla 7

Sustitución de nucleótido	Sustitución de aminoácido	Posición en el exón
G>A	A566T	+17

C>T	Y577Y	+52
-----	-------	-----

La tabla 8 muestra la secuencia de reconocimiento en el gen de U1-ARNnp modificado para la corrección de los defectos de corte y empalme en el exón 12 del gen de CFTR, que se seleccionó a partir de un panel más grande de ARNnp U1 modificados.

Tabla 8

U1-ARNnp de CFTR	Secuencia de unión (5'→3')	Secuencia diana (5'→3')	Longitud (pb)	SEQ ID NO:
cf11	AUAAGUAAGGTAUUCA	TGAATAC- CTTACTTAT	16	11

- 5 En la figura 13, se representa esquemáticamente el minigén pTB CFex12 empleado (Pagani *et al.*, 2003). Los rectángulos representan las regiones centrales del constructo de α -globina, y del exón 12 de CFTR, representándose los intrones como líneas. Se clonaron el exón 12 y las regiones intrónicas flanqueantes, en el plásmido pTB. La transcripción está bajo el control del promotor de α -globina y el potenciador de SV40. Se indican las dos posibles isoformas de corte y empalme.
- 10 La figura 14 muestra la localización del ExSpeU1 cf11 que se usó para corregir los defectos de corte y empalme del exón 12 del gen de CFTR.
- Se analizó el ARN mediante RT-PCR tal como se indicó en el ejemplo 2: transfección de los minigenes en células en cultivo y análisis de los productos de corte y empalme, usando alfa2-3 y BRA2 como cebadores y minigén.
- 15 La figura 15 muestra el efecto de ExSPeU1 cf11 sobre el corte y empalme aberrante inducido por diferentes tipos de mutaciones localizadas en 5'ss y en el exón. ExSPeU1 cf11 induce un aumento significativo en el porcentaje de inclusión del exón 12 en todos los mutantes analizados.
- Se indican el perfil de corte y empalme de las diferentes variantes (pocillos impares) y el efecto de la coexpresión de ExSPeU1 cf11 (pocillos pares) en la parte superior de la figura 15. Se indican las dos isoformas de inclusión (+) y exclusión (-) del exón 12. En el panel inferior, el histograma muestra el porcentaje de inclusión del exón 12, y por tanto, del corte y empalme correcto. Los datos son el promedio de 3 experimentos independientes.
- 20 Se transfectaron las células con 0,5 μ g de vectores que expresaban cada variante específica. Se evaluó el perfil de corte y empalme mediante RT-PCR con los cebadores ALPHA2,3 y BRA2. Se separaron los fragmentos amplificados en un gel de agarosa al 2%. La identidad de los transcritos que incluyen (+) o excluyen (-) el exón 12 se indica en el lado a mano derecha del gel y se ha validado mediante secuenciación.
- 25 **Bibliografía**
- Cartegni, L., S. L. Chew, y A. R. Krainer. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3:285-98.
- Horowitz DS, Krainer AR. Mechanisms for selecting 5' splice sites in mammalian pre-mRNA splicing. *Trends Genet.* Marzo de 1994; 10(3):100-6.
- 30 - Hua, Y., T. A. Vickers, B. F. Baker, C. F. Bennett, y A. R. Krainer. 2007. Enhancement of SMN2 exon 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon. *PLoS Biol* 5:e73.
- Hua, Y., T. A. Vickers, H. L. Okunola, C. F. Bennett, y A. R. Krainer. 2008. Anti-sense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. *Am J Hum Genet* 82:834-48.
- 35 - Lorson, C. L., H. Rindt, y M. Shababi. Spinal muscular atrophy: mechanisms and therapeutic strategies. *Hum Mol Genet* 19:R111-8.
- Pagani, F., E. Buratti, C. Stuani, M. Romano, E. Zuccato, M. Niksic, L. Giglio, D. Faraguna, y F. E. Baralle. 2000. Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element. *J Biol Chem* 275:21041-7.
- 40 - Pagani, F., E. Buratti, C. Stuani, R. Bendix, T. Dork, y F. E. Baralle. 2002. A new type of mutation causes a splicing defect in ATM. *Nat Genet* 30:426-9.
- Pagani, F., C. Stuani, M. Tzetis, E. Kanavakis, A. Efthymiadou, S. Doudounakis, T. Casals, y F. E. Baralle. 2003. New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. *Hum Mol Genet* 12:1111-20.
- Pagani, F., y F. E. Baralle. 2004. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev*

Genet 5:389-96.

- Pinotti, M., L. Rizzotto, D. Balestra, M. A. Lewandowska, N. Cavallari, G. Marchetti, F. Bernardi y F. Paganil. Maestri, F. Pagani, y F. Bernardi. 2008. U1-snRNA mediated rescue of mRNA processing in severe factor VII deficiency. *Blood* 111:2681-2684.

- 5 - Pinotti, M., D. Balestra, L. Rizzotto, I. Maestri, F. Pagani, y F. Bernardi. 2009. Rescue of coagulation factor VII function by the U1+5A snRNA. *Blood* 113:6461:6464.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ARNnpU1 humana modificada, que puede corregir el salto de un exón provocado por una mutación localizada en la secuencia comprendida entre 50 pares de bases en el sentido de 5' y 20 pares de bases en el sentido de 3' de un exón, caracterizándose la molécula de ARNnpU1 humana modificada porque una parte de la secuencia monocatenaria de nucleótidos de la región en 5' del ARNnpU1 humano silvestre se reemplaza por una secuencia monocatenaria de unión de nucleótidos que puede hibridarse con una secuencia de nucleótidos diana en el pre-ARNm transcrito de un gen diana de interés terapéutico que porta una mutación que induce salto de exón, que se selecciona del grupo que consiste en mutaciones en la secuencia comprendida entre 50 pares de bases en el sentido de 5' y 20 pares de bases en el sentido de 3' de un exón, estando la secuencia diana ubicada en una región del pre-ARNm del gen diana comprendida entre 2 y 50 pares de bases en el sentido de 3' de un sitio de unión exón/intrón, cuyo corte y empalme se ve afectado por dicha mutación.
2. La molécula de ARNnpU1 humana modificada según la reivindicación 1, en la que la parte de la región en 5' que se reemplaza por la secuencia de unión de nucleótidos tiene de 9 a 20 nucleótidos de longitud.
3. La molécula de ARNnpU1 humana modificada según la reivindicación 1 ó 2, en la que el gen diana de interés terapéutico es el gen del factor de coagulación IX, el gen de SMN2 o el gen de CFTR.
4. La molécula de ARNnpU1 humana modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la secuencia de unión de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.
5. La molécula de ARNnpU1 humana modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en el tratamiento terapéutico de una enfermedad genética provocada por o asociada con el salto de exón.
6. La molécula de ARNnpU1 humana modificada para su uso según la reivindicación 5, en la que la enfermedad es fibrosis quística, hemofilia B o atrofia muscular espinal.
7. Un gen aislado que codifica para una molécula de ARNnpU1 humana modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
8. El gen aislado según la reivindicación 7, que comprende una secuencia promotora y una secuencia de señal de poliadenilación.
9. El gen aislado según la reivindicación 8, en el que el promotor es el promotor endógeno del gen que codifica para ARNnpU1 humano.
10. El gen aislado según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, para su uso en el tratamiento terapéutico de una enfermedad genética provocada por salto de exón.
11. El gen aislado para su uso según la reivindicación 10, en el que la enfermedad es fibrosis quística, hemofilia B o atrofia muscular espinal.
12. Un vector de expresión que comprende un gen aislado según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
13. El vector de expresión según la reivindicación 12, que es un vector de virus adeno-asociado.
14. El vector de expresión según las reivindicaciones 12 ó 13, para su uso en el tratamiento terapéutico de una enfermedad genética provocada por o asociada con salto de exón.
15. El vector de expresión para su uso según la reivindicación 14, en el que la enfermedad es fibrosis quística, hemofilia B o atrofia muscular espinal.
16. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de ARNnpU1 humana modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un gen aislado según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, o un vector de expresión según la reivindicación 12 ó 13, y un portador farmacéuticamente aceptable.
17. Un método *in vitro* para restaurar en una célula en cultivo el corte y empalme correcto de un gen diana de interés terapéutico que porta una mutación que induce salto de exón, que comprende transfectar la célula en cultivo con un vector de expresión según la reivindicación 12 ó 13.

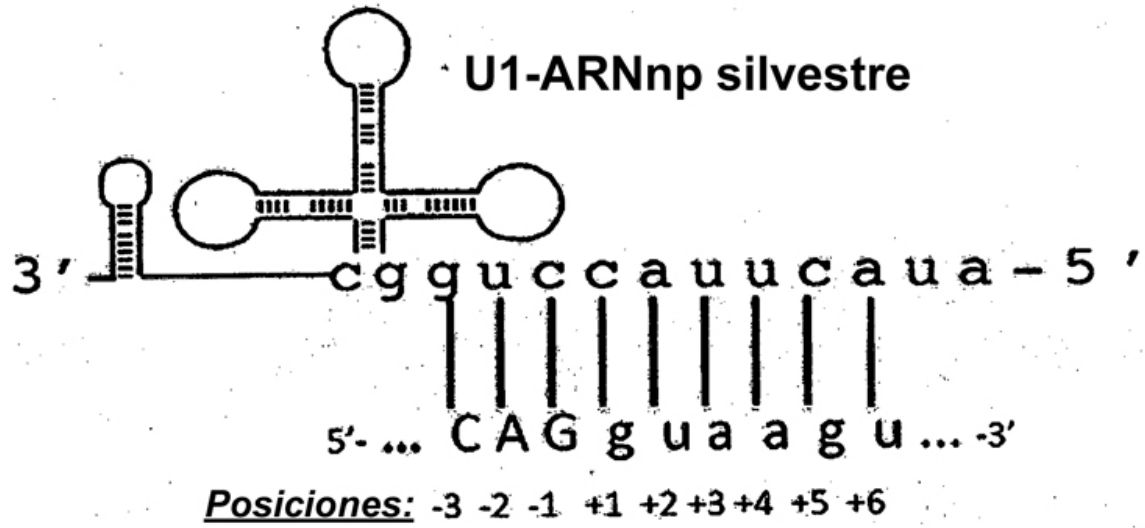


Figura 1

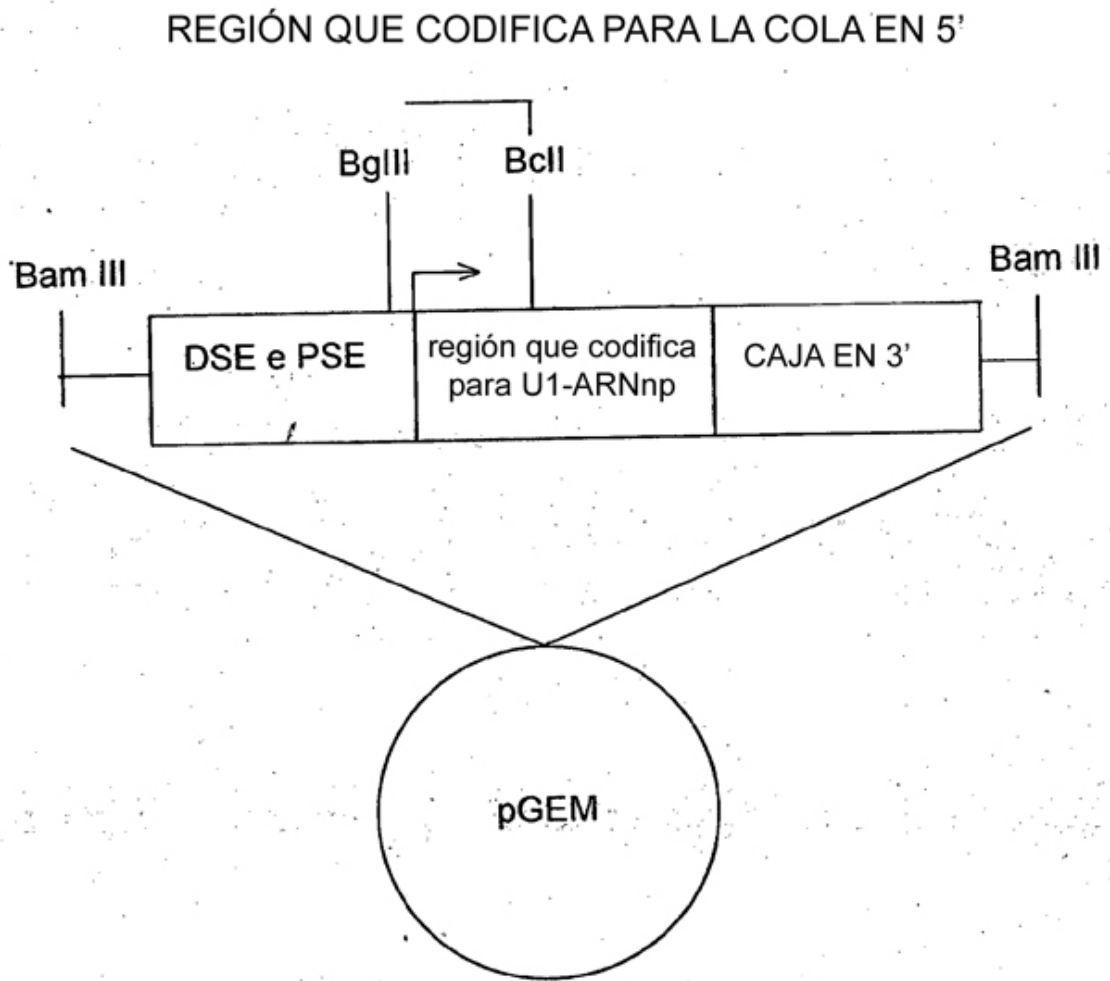


Figura 2

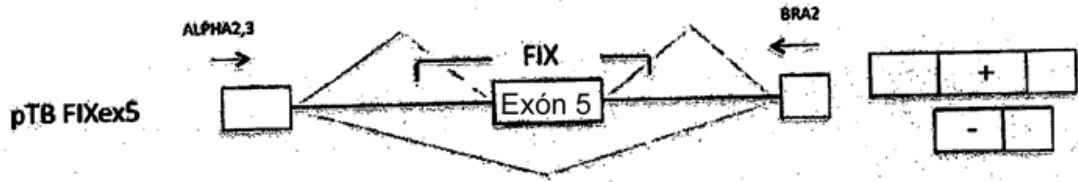


Figura 3

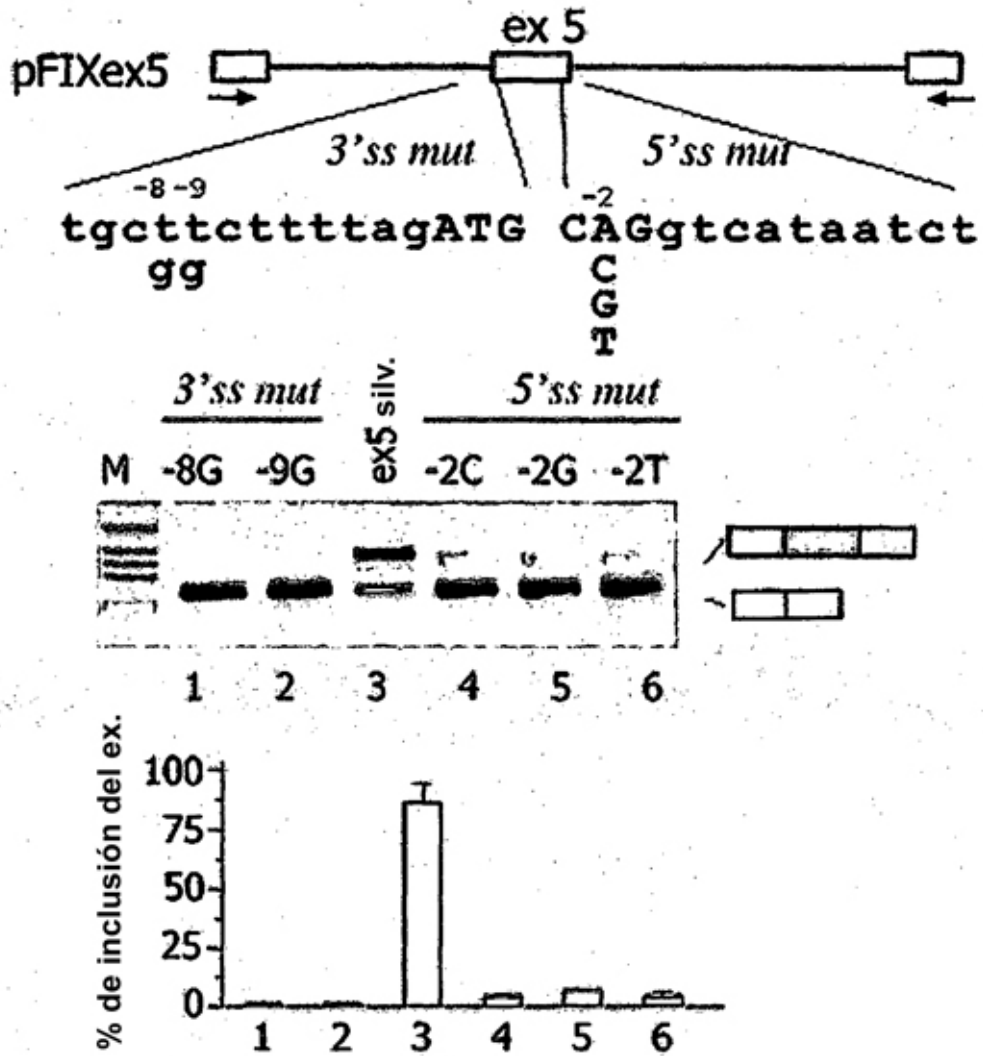


Figura 4

_____ fix22
_____ fix16
_____ fix13
_____ fix10
_____ fix9
_____ fix7
_____ fix1
CCAGCAGgtcataatctgaataagatTTTTaaagaaaatctgtatctgaacttcagcattttaacaaacctacat
_____ fix38
_____ fix33
_____ fix63

Figura 5

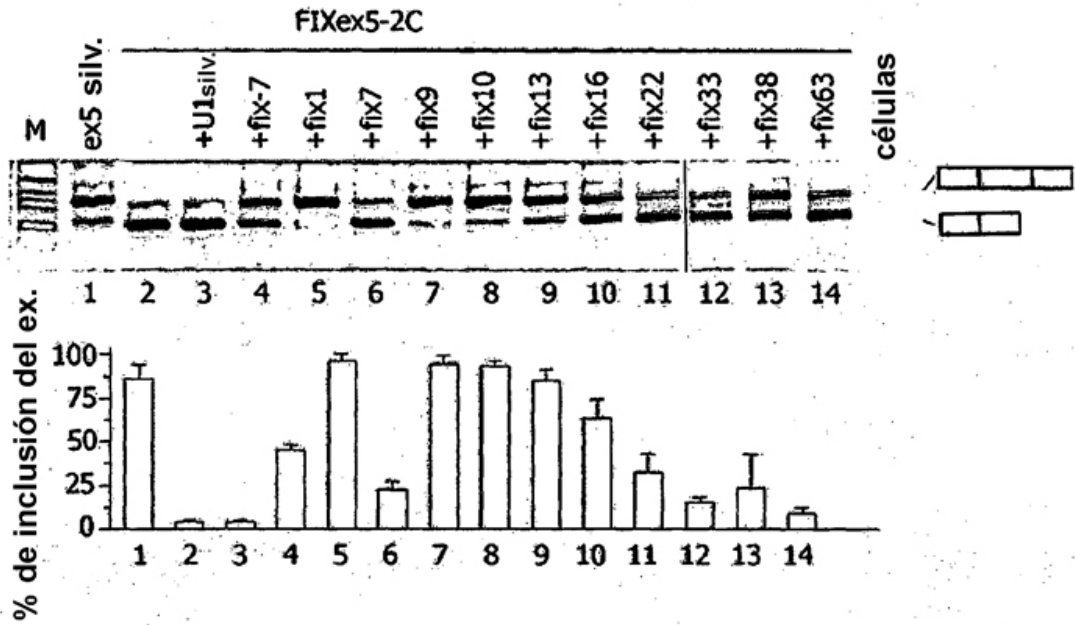


Figura 6

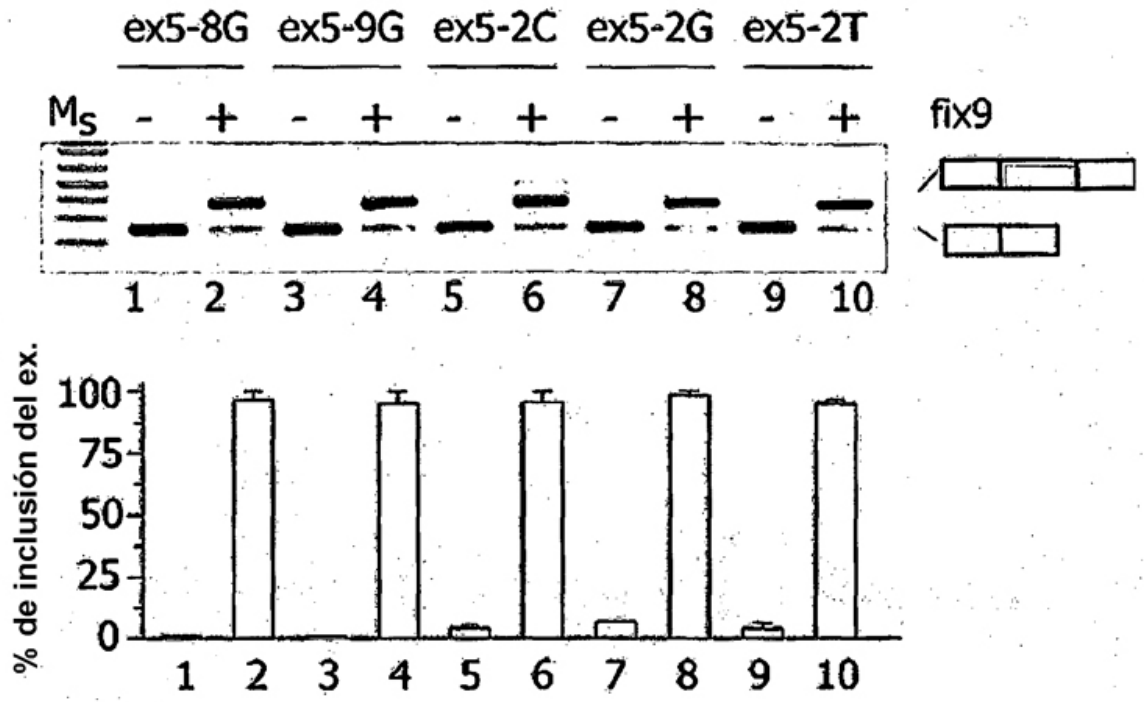


Figura 7

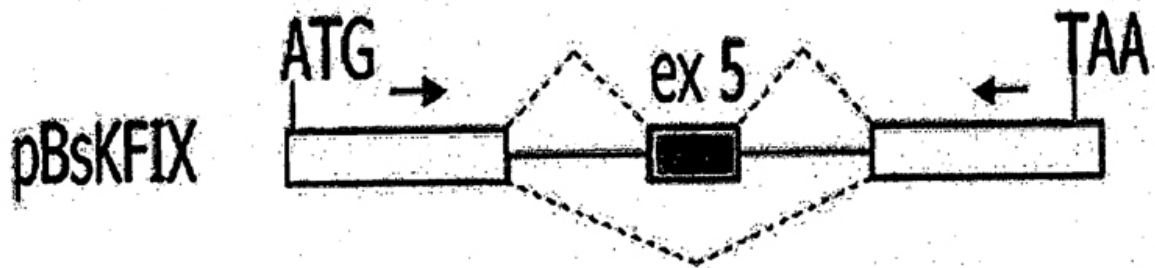


Figura 8

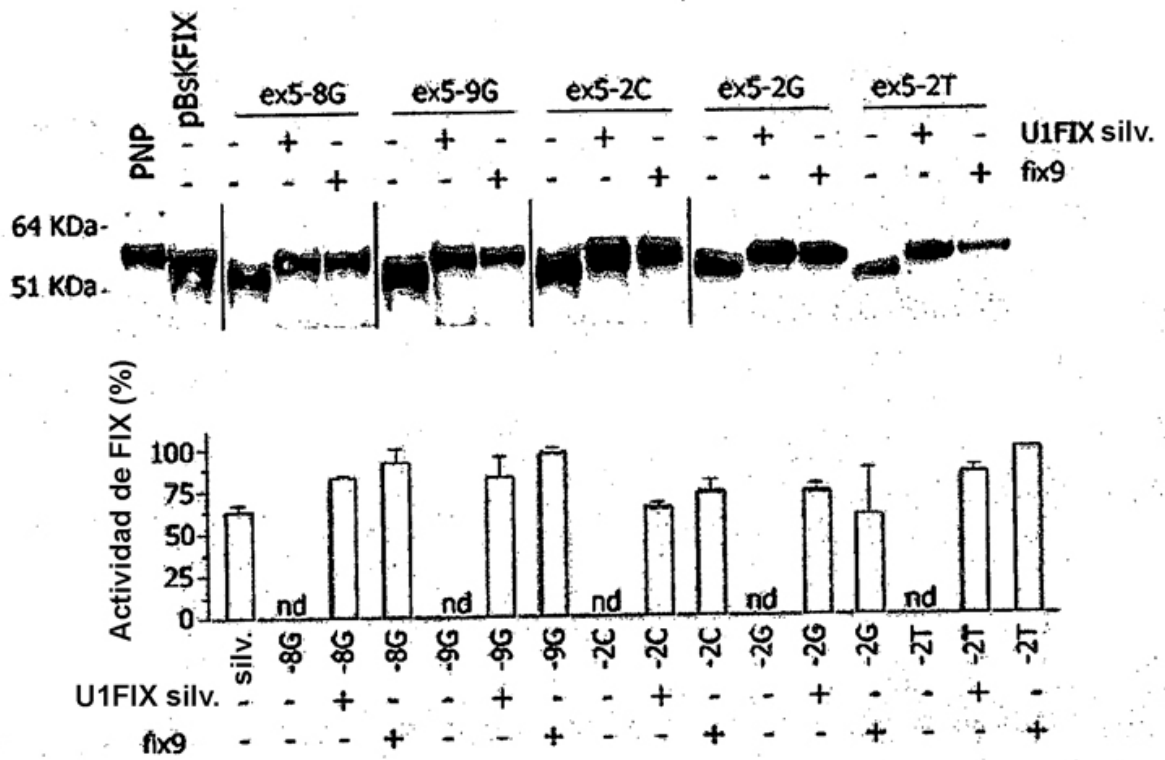


Figura 9

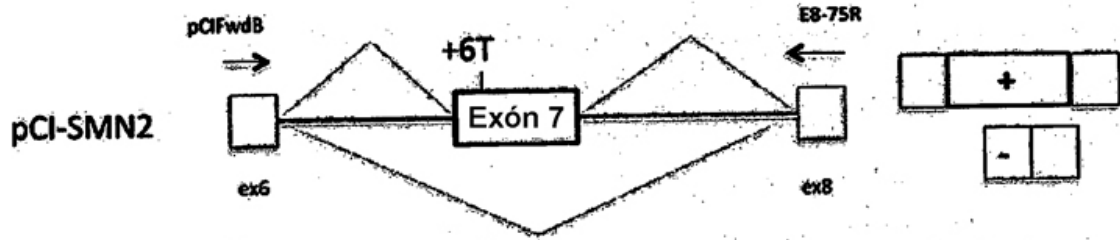


Figura 10

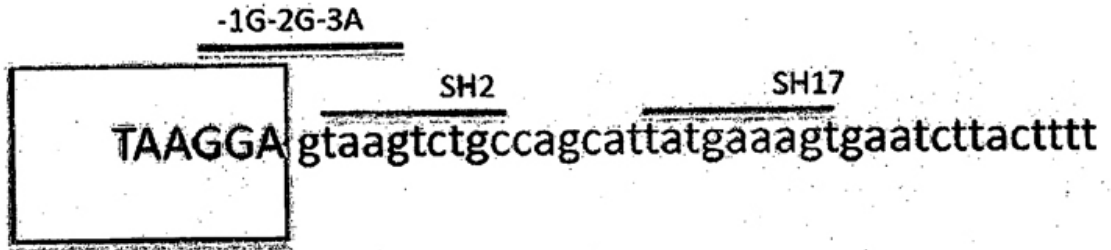


Figura 11

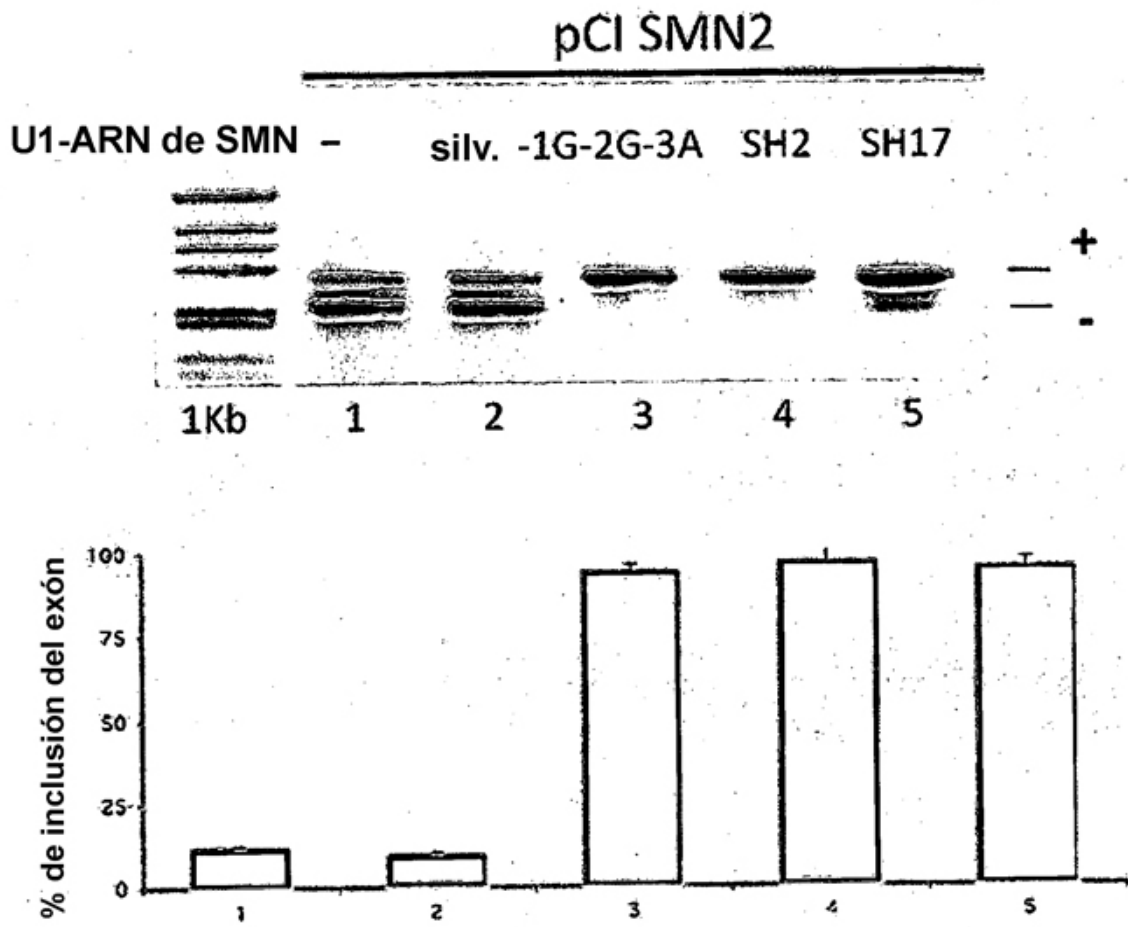


Figura 12

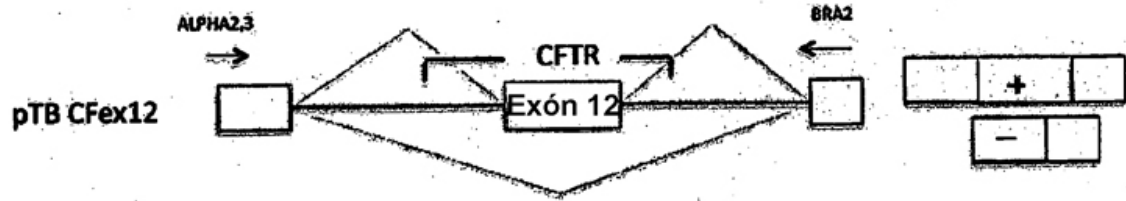


Figura 13

AAAGgtatggtccttgaataccttacttataatgctcatgctaaaat

_____cf1

Figura 14

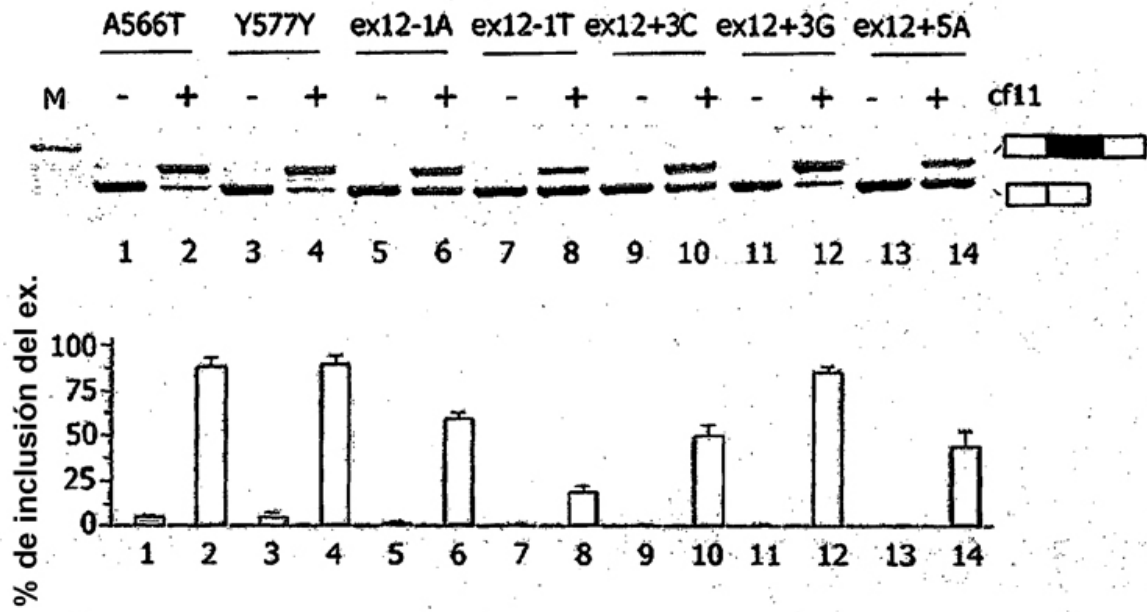


Figura 15