

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 553**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2011 E 11710168 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 2547768**

54 Título: **ARNnp U7 modificados para el tratamiento de las enfermedades neuromusculares**

30 Prioridad:

17.03.2010 US 314830 P

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

13.04.2016

73 Titular/es:

**ASSOCIATION INSTITUT DE MYOLOGIE (100.0%)
Bâtiment Babinski 47-83, Boulevard de l'Hôpital
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**GARCIA, LUIS;
FURLING, DENIS;
BELEY, CYRIAQUE y
VOIT, THOMAS**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 566 553 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

ARNnp U7 modificados para el tratamiento de las enfermedades neuromusculares.

5 La presente invención se refiere a un método para mejorar la actividad de los ARNnp U7 manipulados que se utilizan en el contexto de los terapéuticos basados en el ARN; en particular en las estrategias de salto de exón, inclusión de exón y eliminación de ARNm.

10 La terapia génica convencional se ha centrado mayoritariamente en la sustitución génica en las células diana. Las estrategias basadas en el ARN ofrece una serie de nuevas aplicaciones terapéuticas, entre ellas la alteración del procesamiento del transcrito pre-ARNm diana, la reprogramación de los defectos genéticos mediante la reparación del ARNm y el silenciamiento dirigido de los transcritos génicos específicos de alelo o de isoforma. De manera similar, en los trastornos del procesamiento del ARN, tales como el empalme génico aberrante, puede resultar preferible reparar el patrón endógeno de empalme, que podría corregir también múltiples isoformas alternativas.

15 Muchos genes utilizan el empalme alternativo para generar múltiples productos génicos. La capacidad de modular la ruta de empalme de un gen particular (procesamiento alternativo a demanda) presenta muchas aplicaciones potenciales en el campo de la terapia génica. Por ejemplo, el salto forzado de un exón preciso podría utilizarse para inhibir la función génica o para estimular la síntesis de una proteína internamente delecionada o truncada, dependiendo de si los exones remanentes se fusionan dentro del marco o fuera del marco. De manera similar, la inclusión forzada de un exón, que se procesa anormalmente a partir del ARNm final, también resultaría clínicamente relevante en muchas condiciones patológicas hereditarias.

20 Las enfermedades neuromusculares se refieren a un grupo de enfermedades musculares hereditarias que debilitan los músculos que permiten el movimiento del cuerpo humano. Entre ellas se incluyen enfermedades tales como, por ejemplo, las distrofias neuromusculares y la atrofia muscular espinal. Existen nueve enfermedades, incluyendo Duchenne, Becker, de cinturas, congénita, fascioescapulohumeral, miotónica, oculofaríngea, distal y de Emery-Dreifuss que en todos los casos se clasifican como distrofia neuromuscular, aunque existen más de 100 enfermedades en total con similitudes con la distrofia neuromuscular. Estas condiciones presentan una base genética y las diferentes enfermedades musculares genéticas siguen diversos patrones hereditarios. El tipo mejor conocido, la distrofia neuromuscular de Duchenne (DMD) es una forma ligada al cromosoma X recesiva grave caracterizada por la ausencia de una proteína de 427 kDa denominada distrofina. La ausencia de una proteína distrofina funcional se debe a la alteración de la traducción causada por mutaciones sin sentido o por deleción en el gen de la distrofina, un gen de gran tamaño situado en Xp21.2 (Muntoni *et al.*, Lancet Neurol. 2:731-740, 2003). Una estrategia para corregir la DMD consiste en utilizar oligonucleótidos antisentido (OAS) para omitir algunos exones y expresar de esta manera una forma truncada aunque funcional de la proteína. Este técnica, denominada de salto de exón, utiliza oligonucleótidos complementarios a las secuencias que participan en el empalme de los exones que deben omitirse (Wood *et al.*, PLoS Genet. 3(6):e109, 2007; Du y Gatti, Curr. Opin. Mol. Ther. 11(2):116-23, 2009). En particular, los presentes inventores han demostrado que resulta posible corregir la DMD mediante salto de exón en el ratón mediante la utilización de un ARNnp U7 modificado que se ha redirigido al empalmosoma ("spliceosome") mediante la sustitución del dominio endógeno de unión a sm por uno de los ARNnp de U1, el smOPT (documento nº WO 2006/021724; Goyenvalle *et al.*, Science 306:1796-1799, 2004). Sin embargo, esta técnica todavía no ha sido adaptada a la utilización en pacientes humanos.

45 Otra distrofia importante es la distrofia miotónica (DM), siendo la de tipo 1 (DM1, también conocida como enfermedad de Steinert) la forma más prevalente. La DM1 es una enfermedad hereditaria dominante causada por repeticiones de CTG expandidas en la región 3' no traducida del gen de la DM proteína quinasa (DMPK) (locus en el mapa génico: 19q13.2-q13.3). El ARNm de la DMPK mutante es atrapado en el núcleo y la expansión de CUG altera la unión de las proteínas de unión al ARN a la molécula (Davis *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7388-7393, 1997). Esta acumulación altera la regulación del empalme alternativo, que en consecuencia conduce al empalme erróneo de varios transcritos pre-ARNm y a disfunción neuromuscular. Se han evaluado estrategias para el rescate fenotípico en la DM1 mediante la utilización de OAS dirigidos a las expansiones de CUG en modelos murinos de DM1 (Wheeler *et al.*, Science 325:336-339, 2009; Mulders *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:13915-13920, 2009; Du y Gatti, Curr. Opin. Mol. Ther. 11(2):116-23, 2009). Sin embargo, la utilización de oligonucleótidos sintéticos requiere tratamientos repetidos. En efecto, actualmente no existe cura o tratamiento específico para la distrofia miotónica.

60 Aparte de las distrofias musculares, otra enfermedad muscular importante es la atrofia muscular espinal (AME): es la causa más común de muerte neonatal determinada genéticamente. La AME es una enfermedad neuromuscular hereditaria caracterizada por la degeneración de las neuronas motoras que resulta en la atrofia muscular progresiva (atrofia) y debilidad. El trastorno está causado por un gen anormal o faltante conocido como el gen de la neurona motora de supervivencia (NMS), una proteína esencial para las neuronas motoras. En el ser humano existen dos copias del gen NMS, denominadas NMS1 y NMS2, y ambas se localizan en el locus 5q12.2-q13.3. La inactivación del gen NMS1 conduce a enfermedad debido a que el gen NMS2 no puede compensar la ausencia del primero. El motivo de ello es una sustitución crítica de C por U en el exón 7 del gen NMS2 que no modifica el codón pero evita su reconocimiento por la maquinaria de empalme. Como resultado de dicha sustitución, el gen NMS2 produce

predominantemente (90% de los transcritos) un transcrito en el que el exón 7 resulta omitido, conduciendo a la producción de una proteína truncada y a la incapacidad de compensar la inactivación de NMS1.

Entre las estrategias actuales para desarrollar terapéuticos para la AME se incluyen la identificación de fármacos que incrementan los niveles de NMS2, potencial la función de NMS2 residual o de otra manera compensan la pérdida de la actividad de NMS1. Algunos fármacos, tales como los butiratos, el ácido valproico, la hidroxiurea y el riluzol (Rilutek®, Sanofi-Aventis) se encuentran, o han estado, bajo investigación clínica para la AME. Aunque las estrategias de sustitución génica se están sometiendo a ensayo en animales (Foust *et al.*, Nat. Biotechnol. 28(3):271-4, 2010), el tratamiento actual para la AME consiste en la prevención y el control de los efectos secundarios de la pérdida crónica de unidades motoras. Actualmente no existe fármaco conocido para alterar el curso de la AME.

De esta manera, todavía existe una necesidad de nuevos tratamientos para las enfermedades neuromusculares. En particular, los inventores han desarrollado un nuevo ARNnp U7 humano modificado que comprende un dominio smOPT y una secuencia antisentido respecto a por lo menos una parte del pre-ARNm diana. Han demostrado que se requiere una interacción entre la fracción antisentido y el bucle de U7 para obtener RNPnp derivadas de U7 activas que pueden utilizarse para el tratamiento de enfermedades neuromusculares.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han demostrado que un ARNnp U7 modificado que comprende la secuencia de smOPT (U7smOPT) y una secuencia antisentido resulta útil para el tratamiento de enfermedades neuromusculares en particular mediante salto de exón, inclusión de exón o eliminación de ARNm perjudiciales. Las solicitudes nº WO 2006/021724, nº US 2003/0114411 y nº US 2003/0036519 dan a conocer sistemas basados en U7 murino para la administración de oligonucleótidos antisentido en las células. Sin embargo, la introducción de las secuencias antisentido correctas en U7smOPT no resulta suficiente y, en muchos casos, el U7 manipulado consecuente no interfiere eficientemente con la maquinaria de empalme. Algunos polinucleótidos antisentido, aunque están diseñados para interactuar perfectamente con una secuencia de pre-ARNm diana, no conducen al empalme correcto (ver, por ejemplo, el antisentido SD23 o M23D en los ejemplos experimentales).

Los inventores ahora han encontrado que resulta necesario el pliegue correcto del U7smOPT antisentido para que sea eficiente. Sin respaldo teórico, una hipótesis para explicar este fenómeno es que las secuencias antisentido podrían impactar sobre el pliegue de la consiguiente RNPnp, dificultando finalmente el tráfico celular y reconocimiento por parte del mismo del empalmosoma. De esta manera, resulta esencial una interacción mediante hibridación entre la parte antisentido de la molécula y el bucle de U7 para que resulte posible el pliegue correcto de la molécula modificada. Además, los inventores han encontrado que, en el caso de que no exista naturalmente dicha interacción, resulta posible manipular la molécula U7-SmOPT antisentido mediante la adición a dicha molécula de un dominio, el "dominio kiss", capaz de hibridarse con la horquilla.

Según un primer aspecto, la invención se refiere a un ARNnp U7 modificado tal como se indica en la reivindicación 1. La presente exposición se refiere además a un ARNnp U7 modificado en el que el dominio de unión a Sm ha sido sustituido por una secuencia smOPT y la secuencia antisentido, por otro u otros polinucleótidos. En un ejemplo, por lo menos otro polinucleótido es un antisentido de por lo menos parte de un pre-ARN mensajero (pre-ARNm) diana. En otro ejemplo, por lo menos otro polinucleótido (el dominio kiss) es capaz de hibridarse con el bucle de U7. En todavía otro ejemplo, por lo menos otro polinucleótido es un antisentido de por lo menos parte de un pre-ARNm diana y por lo menos otro polinucleótido (el dominio kiss) es capaz de hibridarse con el bloque de U7.

De esta manera, la presente exposición proporciona un ARNnp huU7 modificado que comprende los elementos siguientes unidos covalentemente de extremo 3' a extremo 5':

- un polinucleótido que presenta la secuencia SEC ID nº 1,
- un polinucleótido que presenta la secuencia SEC ID nº 2, y
- uno o más polinucleótidos, en el que:

- por lo menos uno de dichos polinucleótidos es un antisentido de por lo menos parte de un pre-ARNm diana, y
- por lo menos uno de dichos polinucleótidos (el dominio kiss) es capaz de hibridarse con por lo menos dos nucleótidos comprendidos dentro de los nucleótidos comprendidos entre los nucleótidos 12 y 20 de SEC ID nº 1.

El ácido ribonucleico nuclear pequeño (ARNnp) es una clase de moléculas de ARN pequeño que se encuentran dentro del núcleo de las células eucarióticas. Participan en una diversidad de importantes procesos tales como el empalme del ARN (la eliminación de intrones del pre-ARNm), la regulación de factores de transcripción (ARN 7SK) o la ARN polimerasa II (ARN B2) y el mantenimiento de los telómeros. Siempre se observan asociados a proteínas específicas y los complejos de ARN-proteína resultantes se denominan ribonucleoproteínas nucleares pequeñas

(RNPnp) o, en ocasiones, "snurps". Existen muchos ARNnp, denominados U1, U2 ... U10.

El ARNnp del tipo U7 normalmente participa en la maduración del ARNm de las histonas. Este ARNnp se ha identificado en un gran número de especies eucarióticas (56 hasta el momento) y el ARNnp U7 de cada una de dichas especies debe considerarse como igualmente conveniente. Sin embargo, la utilización de ARNnp U7 de origen humano resulta preferente. La expresión "ARNnp huU7" se refiere en la presente memoria a un ARNnp de origen humano; el ARNnp huU7 también se conoce como SU7 o segundo ARNnp U7; en el presente contexto, estas denominaciones son intercambiables. En una forma de realización preferente, el ARNnp U7 es un polinucleótido de cadena sencilla que presenta la secuencia correspondiente al número de entrada de GenBank NR_023317.1.

El ARNnp U7 de tipo salvaje incluye una estructura de horquilla, la secuencia de Sm específica de U7, y una secuencia antisentido respecto al extremo 3' del pre-ARNm de histonas.

La expresión "ARNnp modificado" se refiere en la presente memoria a un ARN en el que las secuencias que participan en la función inicial del ARNnp se encuentran inactivadas. Por ejemplo, es conocido que las moléculas de ARNnp interactúan con un conjunto de proteínas Sm específicas mediante una secuencia de dominio de unión a Sm específico, formando RNPnp. En una forma de realización, un ARNnp modificado es un ARNnp en el que el dominio de unión a Sm ha sido sustituido por el dominio de unión a Sm de otro ARNnp. En dicha forma de realización, la función del ARNnp modificado resulta alterada por el cambio del dominio de unión a Sm. En particular, U7, un ARNnp no relacionado con empalmosoma que normalmente participa en el procesamiento del extremo 3' del pre-ARNm de histonas, se redirigió al empalmosoma mediante transformación del dominio de unión a Sm de U7 en la secuencia de consenso de unión a Sm de U1 y U2, los dos ARNnp que operan al nivel de los sitios de empalme donantes y aceptores, respectivamente (Gorman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(9):4929-34, 1998). En una forma de realización preferente, la secuencia del sitio de unión a Sm ha sido modificado con el fin de inactivar la maduración del pre-ARNm de histonas, incrementando simultáneamente la concentración nuclear del ARNnp U7 mediante sustitución del sitio de unión a Sm natural por el dominio SmOPT de secuencia SEC ID nº 2.

Además del dominio SmOPT, U7 comprende una secuencia antisentido respecto al extremo 3' del pre-ARNm de histonas. Al sustituir dicha secuencia por una secuencia antisentido respecto a otro pre-ARNm diana, se redirige U7 al nuevo pre-ARNm diana. De acuerdo con lo anterior, la expresión estable de los ARNnp U7 modificados que contienen el dominio smOPT y una secuencia antisentido ha resultado en la modificación específica de secuencia de diferentes estructuras de ARNm dirigidas (Suter *et al.*, Hum. Mol. Genet. 8(13):2415-23, 1999; Vacek *et al.*, Blood 101(1):104-11, 2003). Más recientemente, los inventores han demostrado una transferencia génica de alta eficiencia al músculo esquelético y el rescate completo de la distrofina tras la administración de vectores basados en VAA-2/1 que alojaba un gen de U7 murino apropiadamente modificado conjuntamente con su promotor y elementos 3' naturales (Goyenvalle *et al.*, Science 306:1796-1799, 2004).

En un aspecto, el ARNnp U7 modificado dado a conocer en la presente memoria contiene un polinucleótido que es una molécula antisentido respecto a por lo menos parte de un pre-ARNm diana. La expresión antisentido respecto a por lo menos parte del pre-ARNm diana se refiere en la presente memoria a un polinucleótido la secuencia del cual es complementaria respecto a la secuencia de dicha parte del pre-ARNm diana. De esta manera, dicha secuencia puede ser una molécula antisentido con diana en el sitio de empalme de por lo menos un exón, es decir, es capaz de interferir con el empalme de dicho exón. La secuencia antisentido preferentemente es una secuencia complementaria a por lo menos una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de: sitio de empalme 5' (sitio donante); sitio de empalme 3' (sitio aceptor); secuencia de PR (punto de ramificación) intrónico, y opcionalmente secuencias internas ricas en purinas, más concretamente las secuencias interna de intensificador de empalme de exón (IPI) e intrónica de intensificador de empalme (IIP). En otra forma de realización, en el caso de que se desee la inclusión de un exón, la secuencia antisentido preferentemente es una secuencia complementaria a una secuencia intrónica silenciadora (SIS) o a una horquilla terminal (HT). En una forma de realización preferente adicional, el ARNm diana codifica una proteína la función de la cual se encuentra alterada en una enfermedad neuromuscular. En una forma de realización más preferente adicional, dicha proteína es la distrofina, DMPK, NMS1 o NMS2.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "empalme" se refiere a la modificación de un pre-ARNm tras la transcripción, en el que se eliminan intrones y se unen exones. El empalme se produce en una serie de reacciones que son catalizadas por un complejo de ARN-proteína de gran tamaño compuesto de cinco RNPnp denominado empalmosoma, dentro de un intrón, se requiere para el empalme un sitio de empalme 3', un sitio de empalme 5' y un sitio de ramificación. Los componentes de ARN de los RNPnp interactúan con el intrón y pueden participar en la catálisis. Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "aumentador de empalme intrónico (ISE)", "secuencias intrónicas silenciadoras (ISS)", "horquilla en bucle terminal" y "aumentador interno de empalme de exón (ESE)" se refieren a elementos de secuencia dentro de intrones y exones, respectivamente, que controlan el empalme alternativo mediante la unión de factores proteicos de acción en trans dentro de un pre-ARNm, resultando de esta manera en la utilización diferencial de sitios de empalme (ver, por ejemplo, Buratti *et al.*, Nucleic Acids Res. 34(12):3494-510, 2006; Wang y Burge, RNA 14:802-813, 2008). La expresión "salto de exón" en la presente memoria se refiere al proceso de exclusión de un exón del ARNm maduro mediante modificación del empalme constitutivo. Incluye el enmascaramiento de secuencias clave que participan en el empalme de los exones

diana mediante la utilización de secuencias antisentido, tal como la contenida dentro del presente ARNnp U7 modificado, que son complementarias a las secuencias de definición de exón dentro de un pre-ARNm. Tal como se ha comentado anteriormente, el empalme de exones puede resultar útil para restaurar una proteína distrofina semifuncional de longitud prácticamente completa (Wood *et al.*, PLoS Genet. 3(6):e109, 2007; Du y Gatti, Curr. Opin. Mol. Ther. 11(2):116-23, 2009); sin embargo, también puede utilizarse para silenciar una proteína mediante la exclusión de un exón sin mantener el marco de lectura. La expresión "inclusión de exón", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere al proceso que conduce a la inclusión en el ARNm totalmente procesado de un exón que de otro modo se habría omitido del ARN maduro debido a un defecto del empalme. Normalmente implica enmascarar un SIS y/o un HT dentro del pre-ARNm utilizando secuencias antisentido, tal como la contenida dentro del presente ARNnp U7 modificado, que son complementarias a dicha SIS y/o HT.

En otra forma de realización, por lo menos parte de un pre-ARNm diana tal como se detalla en la presente memoria es una expansión de repetición trinucleótida. En una forma de realización preferente adicional, la repetición trinucleótida es CUG. En todavía una forma de realización preferente adicional, la molécula antisentido comprende por lo menos 15 repeticiones del trinucleótido CAG. En otra forma de realización preferente, el pre-ARNm diana codifica una proteína la función de la cual se encuentra alterada en la distrofia neuromuscular. En una forma de realización más preferente adicional, dicha proteína es la distrofina o la DMPK.

Los inventores han encontrado que no resulta suficiente sustituir la secuencia antisentido endógena del ARNnp U7 con una secuencia antisentido respecto a por lo menos parte del pre-ARNm diana. Se requiere una interacción mediante hibridación entre la secuencia antisentido y el bucle de U7. La expresión "bucle de U7" en la presente memoria se refiere al dominio del ARNnp U7 en el que las bases no se encuentran apareadas. Preferentemente, el bucle de U7 consiste de la parte de la molécula de U7 comprendida entre los nucleótidos 12 y 20 de SEC ID nº 1.

Una secuencia antisentido eficiente según la invención es capaz de hibridarse con el bucle de U7. El término "hibridación" en la presente memoria se refiere a la formación de enlaces de hidrógeno entre bases complementarias. La interacción entre la molécula antisentido y la horquilla U7 permite el pliegue correcto del ARNnp U7 modificado. Al experto en la materia no le resultará difícil concebir que, para garantizar un pliegue correcto y estable, la hibridación entre la molécula antisentido y el bucle de U7 requiere una fuerza mínima, es decir, en la interacción debe participar un número mínimo de bases consecutivas. Resulta evidente que cuanto mayor es el número de bases participantes en la interacción molécula antisentido-bucle de U7, más fuerte es dicha interacción. Preferentemente, el número de bases es de por lo menos 3; más preferentemente es de por lo menos 4. En una forma de realización preferente todavía adicional, las bases del bucle de U7 que participan en la interacción son ACUU. En otra forma de realización preferente adicional, las bases del bucle de U7 que participan en la interacción son GCUUU.

Los inventores han encontrado además que resulta posible corregir una secuencia antisentido ineficiente mediante la adición a dicha secuencia antisentido de un polinucleótido, el dominio kiss, capaz de hibridarse con el bucle de U7. Dicho dominio kiss comprende cierto número de nucleótidos capaces de hibridarse con el bucle de U7. Preferentemente, el dominio kiss comprende por lo menos 3 nucleótidos; más preferentemente, comprende por lo menos 4 nucleótidos. En una forma de realización preferente todavía adicional, el dominio kiss presenta una secuencia seleccionada de entre AAGU, GAGU, GGGU y AGGU. En otra forma de realización preferente adicional, el dominio kiss presenta una secuencia seleccionada de entre GCAGU, GAAGU, GCGGU, GGAGU, GAGGU y GGGGU.

La invención se refiere además a un polinucleótido que comprende un gen codificante del ARNnp U7 modificado de la invención. Un gen según la invención es cualquier molécula de ácidos nucleicos codificante de un producto biológico, es decir, un ARN, proteína, polipéptido o péptido. Un gen, dentro del contexto de la presente invención, incluye por lo tanto ADNg, ADNc o ADN sintéticos o semisintéticos. En particular, un gen puede ser cualquier ácido nucleico codificante de un producto biológico, que comprende una o más regiones no traducidas presentes naturalmente o producidas artificialmente. Resulta más útil que el gen no se encuentre limitado a las secuencias directamente codificantes del ARNnp U7 modificado de la invención sino bajo el control de los elementos reguladores necesarios para su expresión. Por lo tanto, la invención comprende un gen que comprende el U7 modificado indicado anteriormente, fusionando dicho gen con las secuencias reguladoras. El experto en la materia conoce un gran número de promotores constitutivos fuertes. Por ejemplo, el experto en la materia puede utilizar cualquiera de los promotores de los genes de mantenimiento humanos listados en Eisenberg *et al.* (Trends in Genetics 19:362-365, 2003). Sin embargo, con el fin de garantizar una expresión correcta del ARNnp U7 modificado de la invención, resulta más ventajoso utilizar el promotor de U7 endógeno. Todavía más ventajosamente, el promotor es el promotor de U7 humano. En una forma de realización muy preferente, el promotor es el promotor de U7 humano que presenta la secuencia SEC ID nº 3.

Con el fin de obtener moléculas de ARN terapéuticas eficaces in vivo, se consideraron varios parámetros importantes. No sólo deben clonarse los genes de estos ARN bajo promotores eficientes, produciendo niveles elevados de expresión sino que, además, el contexto de ARN en el que se incluye el ARN terapéutico debería proporcionar estabilidad y una localización subcelular específica. Además, las secuencias hacia 3' deberían ayudar a definir el sitio de terminación de transcripción correcto del ARNnp U7 modificado de la invención. Por lo tanto, el gen

de la invención incluye además las secuencias reguladoras 3' del gen U7 endógeno. En el caso de que el gen U7 utilizado sea el gen humano, resulta ventajoso utilizar las secuencias hacia 3' de dicho gen humano. En particular, es más ventajoso utilizar los 230 nucleótidos de las secuencias hacia 3' de dicho gen humano representadas por la secuencia SEC ID nº 4.

La invención proporciona vectores que comprenden los polinucleótidos de la invención. En una forma de realización, el vector contiene un polinucleótido que comprende el gen codificante del ARNnp U7 modificado. Este gen puede clonarse ventajosamente bajo el control de las secuencias promotoras apropiadas, tal como se ha detallado anteriormente. Además, resulta beneficioso insertar en el vector de la invención las secuencias 3' correctas hacia 3' del gen de ARNnp U7 modificado. Con el fin de garantizar que se omita el exón, puede resultar útil utilizar en el mismo vector dos ARNnp U7 modificados con secuencias antisentido para dianas diferentes, preferentemente el sitio donante 5' y la secuencia de BP. Las secuencias antisentido dirigidas contra sitios de empalme de por lo menos dos exones diferentes también pueden asociarse en el mismo vector. Alternativamente, resulta posible utilizar varios constructos, llevando cada uno una secuencia antisentido diferente, estando dirigidas dichas secuencias a uno o varios exones. En la práctica, en el caso de que se asocien varias secuencias antisentido (dirigidas al mismo exón o a varios exones diferentes o contra un exón y un intrón), pueden encontrarse los casos siguientes:

- las secuencias antisentido se insertan dentro del mismo ARNnp U7 modificado, en el que dicho ARNnp está alojado en un único vector, o
- las secuencias antisentido se insertan en ARNnp U7 diferentes, en el que cada ARNnp está alojado en un vector.

El vector de la invención puede derivarse de un virus o de un origen no vírico.

Entre los vectores no víricos se incluyen los plásmidos. Dicho plásmido puede ser un plásmido de replicación condicional que no es capaz de replicarse en los pacientes por motivos de seguridad. Estos plásmidos pueden estar basados en los plásmidos descritos en las solicitudes de patente PCT nº WO 97/10343 y nº WO 2009/027351. Puede inyectarse ADN plasmídico desnudo directamente en las células musculares (Wolff *et al.*, Science 247:1465-1468, 1990) o unirse a partículas de oro con las que se bombardea el tejido (Cheng *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4455-4459, 1993). Aunque no muy eficiente, lo anterior puede resultar en un nivel de expresión prolongadamente bajo in vivo. El ADN plasmídico también puede transfectarse en la célula utilizando vectores de administración génica no víricos, denominados sistemas "autoensamblados", basados en moléculas catiónicas, que forman complejos espontáneos con los ácidos nucleicos de carga negativa (Eliyahu *et al.*, Molecules 10:34-64, 2005).

En un aspecto preferente de la invención, el vector es un vector vírico. Mediante la sustitución de los genes que se necesitan para la etapa de replicación del ciclo vital del virus (los genes no esenciales) con los genes foráneos de interés, los vectores víricos recombinantes pueden transducir el tipo celular que infectarían normalmente. Para producir dichos vectores víricos recombinantes, se proporcionan los genes no esenciales en trans, integrados en el genoma de la línea celular de empaquetamiento o en un plásmido. Se encuentran disponibles para la terapia génica varios vectores basados en virus tales como adenovirus, virus adenoasociados (VAA), lentivirus o virus 1 del herpes simple (VHS1). Todos ellos se encuentran comprendidos dentro de la presente invención.

Los vectores adenovíricos actualmente son los vectores víricos utilizados más frecuentemente en la terapia génica en el ser humano. La utilización de vectores adenovíricos denominados de tercera generación (o "gutless") (Lindermann y Schnittler, Thromb. Haemost. 102:1135-1143, 2009) resulta preferente para la utilización en la presente invención. Dichos vectores no necesitan detallarse en la presente memoria, ya que el experto en la materia conocerá completamente las características y los usos de dichos vectores adenovíricos.

Alternativamente, el experto en la materia puede utilizar un vector lentivírico para administrar el ARNnp U7 modificado de la invención. Preferentemente, dicho lentivirus es un lentivirus autoinactivante (AI). Sin embargo, puede utilizarse cualquier vector lentivírico en el contexto de la presente invención. La construcción y manipulación de los vectores lentivíricos son bien conocidos por el experto en la materia.

Los vectores víricos preferentes según la invención se basan en virus asociados a adenoasociados, o VAA. Entre los 8 serotipos, el VAA utilizado para tratar una enfermedad neuromuscular según la invención preferentemente es un VAA1, es decir, su cápside es del serotipo 1. Se ha demostrado que el VAA1 resulta ser el más eficiente para la transducción de las células musculares. Por otra parte, las secuencias de origen vírico, y en particular las RTI, asociadas al transgén son preferentemente de origen VAA2. El vector basado en VAA resultante de la invención presenta, preferentemente, un pseudotipo 2/1. Sin embargo, el experto en la materia entenderá fácilmente que la invención no se encuentra limitada a dicho vector particular; de hecho, todos los serotipos de VAA resultan igualmente adecuados para la utilización en la presente invención. Por ejemplo, VAA6, VAA8 o VAA9 también transducen eficazmente las células de músculo estriado, mientras que VAA5 resulta altamente eficiente en la transducción de células neurales en el cerebro (Markakis *et al.*, Molecular Therapy 18:588-593, 2010); por lo tanto, la totalidad de ellas puede utilizarse con éxito en el contexto de la invención. Al igual que los vectores adenovíricos y lentivíricos, los vectores basados en VAA ya han sido ampliamente utilizados por el experto en la materia con fines

de terapia génica (ver, por ejemplo, Michelfelder y Trepel, *Adv. Genet.* 67:29-60, 2009); de esta manera, no existe necesidad de detallar métodos para la construcción y utilización de dichos vectores VAA.

5 Los vectores según la invención pueden utilizarse además en aplicaciones in vitro y/o ex vivo. Aunque los vectores de la invención se utilizan preferentemente mediante la inyección directa en el músculo diana, o mediante administración sistémica intravenosa o intraarterial, o mediante la administración en el cerebro o en el líquido cerebroespinal, también pueden utilizarse para someter a ensayo la eficiencia de las potenciales secuencias antisentido in vitro, directamente en células musculares diferenciadas, por ejemplo obtenidas del paciente. Además, en el caso de que dichos vectores se introduzcan mediante transfección en una célula capaz de diferenciación muscular, por ejemplo un mioblasto u otra célula troncal miogénica, tal como una célula CD133⁺ (Torrente *et al.*, *Cell Transplant.* 16(6):563-77, 2007), una célula SMALD⁺ (Vauchez *et al.*, *Mol. Ther.* 17(11):1948-58, 2009), un mesangioblasto, o un pericito, la totalidad de los cuales son precursores de las células musculares, dicha célula transfectada seguidamente puede trasplantarse en el paciente. Incluso resulta posible utilizar células humanas que se han transformado en células troncales pluripotentes o iPS (por sus siglas en inglés, induced Pluripotent Stem cells) mediante los métodos de la técnica (ver, por ejemplo, Takahashi *et al.*, *Cell* 131:861-872, 2007; Yamanaka, *Cell Stem Cell.* 1(1):39-49, 2007; Park *et al.*, *Nature* 451(7175):141-6, 2008; Park *et al.*, *Nat. Protoc.* 3(7):1180-6, 2008; patente EP nº 2.096.169, documentos nº WO 2008/118820 y nº US2008/0280362). De esta manera, dichas iPS pueden ser transfectadas por los vectores de la invención y trasplantarse en el paciente.

20 De esta manera, la invención comprende además una célula eucariótica aislada transfectada con los vectores de la invención. Dichas células preferentemente son células miogénicas derivadas de la sangre o de músculo esquelético, un mioblasto o una célula capaz de diferenciación muscular. En una forma de realización específica de la invención, la célula capaz de diferenciación muscular es una célula troncal pluripotente inducida.

25 La invención se refiere además a una composición terapéutica para el tratamiento de una enfermedad neuromuscular que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, en lugar del vector, la composición farmacéutica de la invención contiene una cantidad eficaz de una célula transfectada con el vector de la invención tal como se ha indicado anteriormente, así como un portador farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, dicha composición farmacéutica está destinada al tratamiento de una enfermedad neuromuscular, incluyendo (aunque sin limitación) las enfermedades siguientes: de Duchenne (DMD), de Becker, de cinturas, congénita, fascioescapulohumeral, miotónica (y en particular DM1), oculofaríngea, distal, de Emery-Dreifuss y la AME. Más preferentemente, las composiciones terapéuticas de la invención se utilizan para tratar la DMD, la DM1 o la AME.

35 La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden:

- a) una cantidad eficaz de vector o una célula transfectada de la presente invención, y
- b) un portador farmacéuticamente aceptable, que puede ser inerte o fisiológicamente activo.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portadores farmacéuticamente aceptables" incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos y similares que son fisiológicamente compatibles. Entre los ejemplos de portadores, diluyentes y/o excipientes adecuados se incluyen uno o más de entre agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como una combinación de los mismos. En muchos casos, resulta preferible incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes o cloruro sódico en la composición. En particular, entre los ejemplos relevantes de portador adecuado se incluyen: (1) solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH - 7,4, que contiene o no entre aproximadamente 1 mg/ml y 25 mg/ml de albúmina de suero humano, (2) solución salina al 0,9% (cloruro sódico (NaCl) al 0,9% p/v) y (3) dextrosa al 5% (p/v), y puede contener además un antioxidante, tal como triptamina y un agente estabilizante tal como Tween-20. En el caso de que el vector de la invención esté destinado al tratamiento de la AME, resulta posible utilizar el manitol como portador, ya que el manitol es un interruptor de la barrera hematocefálica bien conocido (Fu *et al.*, *Molecular Therapy* 8:911-917, 2003).

55 Las composiciones en la presente memoria pueden contener además un agente terapéutico adicional, según resulte necesario para el trastorno particular bajo tratamiento. Por ejemplo, dicha composición puede contener, además de un vector que porta el gen para un ARNnp U7 modificado, un segundo vector que comprende otro gen de ARNnp U7 modificado. Dichos genes de U7 modificados pueden contener moléculas antisentido con diana en el mismo exón o en exones diferentes, o en un exón y un intrón, tal como se ha indicado anteriormente.

60 Las composiciones de la invención pueden encontrarse en una diversidad de formas. Entre ellas se incluyen, por ejemplo, las formas de administración líquidas, semisólidas y sólidas, aunque la forma preferente depende del modo deseado de administración y la aplicación terapéutica. La administración de la composición según la presente invención para conseguir los objetivos terapéuticos puede ser local, intramuscular, locorregional, parenteral, intravenosa, intraarterial, intramiocárdica, pericárdica, epicárdica o mediante la administración intracoronaria en el tejido diana del músculo cardíaco o mediante la administración intracerebral o mediante la administración en el líquido cerebroespinal. Preferentemente la administración intramiocárdica, epicárdica, epicárdica o intracoronaria se lleva a cabo utilizando una aguja o un catéter. Las composiciones preferentes típicas se encuentran en forma de

soluciones inyectables o infusionables.

Según una forma de realización de la presente invención, el vector de la invención se administra de manera localizada en el tejido muscular diana. En otra forma de realización, el vector de la invención se administra intracerebralmente o en el líquido cerebroespinal. El sitio de la administración dependerá de la patología que el vector de la invención pretende tratar: resulta evidente que la administración en el músculo resultará más eficaz para las distrofias neuromusculares, mientras que la administración en el cerebro o en el líquido cerebroespinal resultará particularmente útil para la AME. Aunque pueden utilizarse cualesquiera medios adecuados de administración del vector en el tejido diana dentro del contexto de la presente invención, preferentemente dicha inyección localizada en el tejido muscular diana, el cerebro o el líquido cerebroespinal se lleva a cabo inyectando directamente el vector en el músculo, el cerebro o el líquido cerebroespinal utilizando una aguja. El término "inyectar" se refiere a que el vector se introduce de manera forzada en el tejido diana. Puede utilizarse cualquier dispositivo de inyección adecuado según la presente invención.

Al inyectar el vector de la invención directamente en los músculos distróficos o en el cerebro o en el líquido cerebroespinal, las composiciones farmacéuticas preferentemente se encuentran en forma líquida. Las composiciones estériles para inyección pueden prepararse mediante la incorporación del vector de la presente invención en la cantidad requerida en el solvente apropiado, seguido de la esterilización mediante microfiltración. Como solvente o vehículo puede utilizarse agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como una combinación de los mismos. En muchos casos resulta preferido incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes o cloruro sódico en la composición. Estas composiciones pueden contener además adyuvantes, en particular agentes humectantes, isotónicos, emulsionantes, dispersantes y estabilizantes. También pueden prepararse composiciones estériles para la inyección en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en el momento de la utilización en agua estéril o en cualquier otro medio estéril inyectable.

Los niveles de dosis del orden de entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 140 mg por kilogramo de peso corporal al día resultan útiles en el tratamiento de las condiciones anteriormente indicadas (entre aproximadamente 0,5 mg y aproximadamente 7 g por paciente y día). Aunque la dosis eficaz variará según el peso y la condición de un sujeto dado que sufre de una enfermedad neuromuscular, se considera que se encuentra comprendida en los conocimientos del experto en la materia la determinación de la dosis apropiada para un sujeto y condiciones dadas.

El ARNnp U7 modificado de la invención resulta útil para restaurar la función normal de una proteína celular. Más concretamente, el ARNnp U7 modificado de la invención puede estimular el salto de exón, la inclusión de exón o la eliminación de ARNm perjudiciales, de manera que la proteína celular resultante ahora es totalmente o por lo menos parcialmente funcional. De esta manera, la invención se refiere además a un método para restaurar la función de una proteína celular mediante salto de exón, inclusión de exón o eliminación de los ARNm perjudiciales, que comprende la etapa de poner en contacto una célula con el vector de la invención. De esta manera, la utilización de los ARNnp U7 modificados de la invención no se encuentra limitada a un tipo de patología específico, sino que puede aplicarse al tratamiento de cualquier enfermedad que resulte de un defecto del empalme. Sin embargo, en el contexto de la presente solicitud, dicha proteína celular preferentemente es una proteína la función de la cual se encuentra alterada en una enfermedad neuromuscular. Todavía más preferentemente, dicha proteína celular es la distrofina, la DMPK o la NMS.

De esta manera, la invención proporciona además un método para el tratamiento de una enfermedad muscular mediante la administración de una dosis eficaz de cualquiera de los vectores de la invención, preferentemente en una composición farmacéutica tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria. De esta manera, la invención se refiere además a la utilización de los vectores de la invención como medicamento. Más concretamente, los vectores de la invención se utilizan como medicamento para el tratamiento de una enfermedad neuromuscular, incluyendo (aunque sin limitación) las enfermedades siguientes: de Duchenne (DMD), de Becker, de cinturas, congénita, fascioescapulohumeral, miotónica (y en particular DM1), oculofaríngea, distal, de Emery-Dreifuss y la AME. Más preferentemente, los vectores de la invención se utilizan para tratar la DMD, la DM1 o la AME.

Los kits, por ejemplo, que comprenden uno o más de los vectores indicados e instrucciones de utilización de dichos vectores para el tratamiento de enfermedades neuromusculares, también se describen en la presente memoria. Las instrucciones pueden incluir indicaciones para utilizar los vectores in vitro, in vivo o ex vivo. Típicamente el kit presentará un compartimiento que contiene los vectores. Los vectores pueden encontrarse en una forma liofilizada, una forma líquida u otra forma que pueda incluirse en un kit. El kit puede contener además elementos adicionales necesarios para la puesta en práctica del método descrito en las instrucciones del kit, una solución esterilizada para reconstituir unos polvos liofilizados, agentes adicionales para combinar con los vectores antes de la administración en el paciente, y herramientas que ayudan en la administración de los vectores en el paciente.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Silenciamiento de ARNm-CUG^{exp} por U7_h-CAG₁₅. (a) Estructura del U7_h-ARNnp-CAG₁₅ (U7_h-CAG₁₅) que indica el bucle, y las secuencias antisentido de Sm-Opt y CAG. (b) Transferencia northern

representativa y análisis (n=5) de la expresión de ARNm del gen DMPK en células musculares DM1 (13/800 CTG) transducidas con vector lentivírico U7_h-CAG₁₅ (4-8x10⁶ vg/ml). (c) Análisis FISH (n=4) del número de focos de ARNm-CUG^{exp} (puntos rojos) en los núcleos (azul) de células DM1 transducidas con U7_h-CAG₁₅ (800 CTG). (d) Ensayo de RT-PCR de los ARNm de DMPK CUG^{exp}, GAPDH y ARNnpU6 y pre-ARN del gen DMPK en las fracciones nuclear y citoplasmática de células musculares convertidas en DM1 (1.300 CTG). El polimorfismo del sitio de restricción BpmI situado dentro del exón 10 del alelo de DMPK expandido permite distinguir entre los productos normales y del alelo CUG^{exp}.

Figura 2. Consecuencias de la expresión de U7_h-CAG_n en células musculares DM1. (a) Expresión de ARNm del gen DMPK normales y CUG^{exp} en células DM1 (13/800 CTG) transducidas con vectores U7_h-CAG_n (4x10⁶ vg/ml) que alojan secuencias antisentido de 7, 11 o 15 CAG (n=3). (b) Localización del regulador de empalme MBNL1 en células DM1. (c) Corrección de la regulación incorrecta del empalme alternativo de los transcritos de BIN1 (puente integrador 1), DMD (distrofina) y LDB3 (cypher) en células musculares DM1 diferenciadas (2.000 CTG) (n=3). (d) Diferenciación miogénica de células musculares DM1 (2.000 CTG) cuantificada como índice de fusión (n=6).

Figura 3. Secuencia del gen U7 humano modificado que contiene su promotor natural, la secuencia antisentido CAG₁₅ (en rojo), el dominio de unión a Sm (Sm-Opt, en azul), el bucle (en verde) y sus elementos hacia 3' de 3'.

Figura 4. (a) Se analizó la expresión del ARNm del gen DMPK en células musculares DM1 (800 CTG) transducidas con una concentración creciente de vector lentivírico U7_h-CAG₁₅. (b) Se determinó la repartición de los focos de ARNm-CUG^{exp} en los núcleos de las células DM1 (800 CTG) transducidas con una concentración creciente de vector lentivírico U7_h-CAG₁₅.

Figura 5. La expresión de ARNm del gen DMPK en mioblastos de tipo salvaje (13/18 CTG) que expresan U7_h-CAG₁₅ se analizó mediante RT-PCR (exón 9-exón 10). Se utilizó ARNm del gen GAPDH como control de carga (n=4).

Figura 6. (a) La expresión de la isoforma E14/16 del ARNm del gen DMPK procesado (sin exón 15, así como segmento CUG) en células DM1 (800 CTG) se analizó mediante RT-PCR con ARNm de gen GAPDH como control de carga (n=3). (b) Se examinaron los niveles de proteína DMPK en las células DM1 mediante transferencia western utilizando el anticuerpo de MANDM1 que detecta DMPK, aunque también de proteínas CRP (n=7). El nivel de CRP no resultó alterado en las células DM1 y, de esta manera, se utilizó como control interno de igualdad de carga.

Figura 7. El factor de cambio de los transcritos fuera de diana que portaban repeticiones CUG se analizó mediante RT-PCR en mioblastos DM1 (800 CTG) transducidos con vectores lentivíricos U7_h-CAG_n que expresaban las secuencias antisentido 7, 11 o 15 CAG.

Figura 8. Representación esquemática de U7 y U7smOPT.

Figura 9. (a) U7 de ratón de tipo salvaje; (b) U7 humano de tipo salvaje; (c) pliegue hipotético de U7smOPT: necesidad de un "dominio kissing".

Figura 10. Rescate de la distrofina en secciones transversales de músculos AT inyectados con diversos constructos con diana en motivos clave que participan en la definición del exón 23 (DP: donante de empalme; PR22: intrón de punto de ramificación 22).

Ejemplos experimentales

Destrucción selectiva de ARNm mutados en DM1 mediante la utilización de ARNnp U7_h

Materiales y métodos

Cultivo celular

Se aislaron células musculares humanas a partir de biopsias o autopsias de músculo esquelético tal como se ha descrito (Edom *et al.*, Dev. Biol. 164:219-229, 1994) de acuerdo con la legislación francesa en materia de reglas éticas. Se cultivaron mioblastos de tipo salvaje (TS) y DM1 en medio F10 de Ham complementado con SFB al 20% y 5 µg/ml de gentamicina (Invitrogen), bajo 5% de CO₂ y a 37°C. Para inducir la diferenciación, se eliminó el medio de cultivo de los cultivos subconfluentes y se sustituyó por medio DMEM complementado con 10 µg/ml de insulina y 100 µg/ml de transferrina (Sigma). Los fibroblastos DM1 que contenían un sitio de restricción polimórfico BpmI en el alelo DMPK expandido (Hamshire *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7394-7399, 1997) se inmortalizaron y convirtieron en células musculares utilizando un sistema Mood inducible, tal como se ha descrito anteriormente (Chaouch *et al.*, Hum. Gene Ther. 20:784-790, 2009).

Producción y transducción de lentivirus

Se generó un vector lentivirus basado en VIH-1 autoinactivado, pRRL-U7_h-CAGn, a partir del vector previamente descrito pRRL-cPPT-PGK_h-EGFP-WPRE (Follenzi *et al.*, Nat. Genet. 25:217-222, 2000). Se produjeron vectores VS-G-pseudotipados mediante transfección transitoria de células 293T (Charrier *et al.*, Gene Ther. 12:597-606, 2005). El medio condicionado que contenía partículas víricas se recogió y se concentró mediante ultracentrifugación. Se determinaron los títulos de vector (genoma de vector, en vg/ml) mediante PCR cuantitativa de ADN genómico de las células infectadas tal como se ha descrito (Charrier *et al.*, Gene Ther. 12:597-606, 2005). Se utilizaron 1×10^6 a 1×10^7 vg/ml para transducir $1,5 \times 10^5$ células musculares humanas. La transducción del vector se llevó a cabo durante la noche en presencia de 4 μ g/ml de polibreno (Sigma) y las células transducidas se cultivaron y amplificaron por lo menos una semana antes de los análisis.

Aislamiento del ARN y transferencia northern

Se lisaron las células en un tampón de proteinasa K (NaCl 500 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,2, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 10 mM, SDS al 2% y 0,5 mg/ml de proteinasa K) durante 45 minutos a 55°C. A continuación, se aisló el ARN utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Asimismo, se aisló el ARN a partir de las fracciones nuclear y citoplasmática preparadas tal como se ha descrito anteriormente (Hamshire *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7394-7399, 1997) mediante lisis hipotónica en presencia de NP-40. Para el análisis de transferencia northern, se separaron 8-10 μ g de ARN en geles de 1,3% de agarosa MOPS que contenían formaldehído 0,66 M y se transfirieron a membrana Hybond-N⁺ (Amersham Pharmacia Biotech) mediante transferencia capilar con 10x SSC. Se hibridaron las membranas con sonda marcada con ³²P cebada aleatoriamente (fragmento BglII-SacI de ADNc de DMPK) en un tampón de hibridación (SDS al 2%, dextrán-sulfato al 10%, 1xSSPE, 10 μ g/ml de ADN de esperma de salmón y solución de Denhart al 2%) a 68°C durante la noche. Se analizaron las señales en un instrumento phospho-imager (Molecular Imager FX, Bio-Rad) y se cuantificaron utilizando Quantity One (Bio-Rad). Todos los valores se normalizaron respecto a la señal de ARNr 18S tras la hibridación con sondas oligonucleótidas de ARNr 18S marcadas con ³²P en el extremo 5'.

Análisis de RT-PCR

Se realizó la transcripción inversa de un μ g de ARN en ADNc siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen) en un volumen total de 20 μ l. A continuación se utilizó un μ l de preparación de ADNc en un análisis de PCR semicuantitativa siguiendo procedimientos estándares (ReddyMix, Thermo Scientific). La amplificación por PCR se llevó a cabo en 20 a 35 ciclos, dentro del intervalo lineal de amplificación para cada gen. Se utilizó la señal del gen GAPDH para la normalización. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1-3% y se tiñeron con bromuro de etidio. La cuantificación se llevó a cabo utilizando el software Quantity One (Bio-Rad). Para el análisis del empalme alternativo, los genes y exones seleccionados se describieron previamente como alterados en músculo procedente de pacientes DM1: el exón 78 para la DMP (distrofina) (Nakamori *et al.*, Muscle Nerve 36:251-257, 2007), el exón 7 para LDB3 (cypher) (Lin *et al.*, Hum. Mol. Genet. 15:2087-2097, 2006) y el exón 11 para BIN1 (puente integrador 1) (Hammer *et al.*, enviado para publicación). Las proporciones de inclusión de exón se cuantificaron y expresaron como porcentaje de inclusión respecto a las intensidades totales de las señales de las isoformas. Para el análisis del gen DMPK, para distinguir los dos alelos del gen DMPK, se introdujeron 6 μ l de la mezcla de PCR en 25 μ l de una mezcla de digestión que contenía 2,5 unidades de BmpI (New England Biolabs) y se incubó durante la noche a 37°C tal como se ha descrito (Hamshire *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7394-7399, 1997).

Se utilizaron los cebadores siguientes:

GAPDH-F, TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT (SEC ID n° 5),
 GAPDH-R, GATGACAAGCTTCCCGTTCTCAGCC (SEC ID n° 6),
 U6ARNp-F, CTCGCTTCGGCAGCACACA (SEC ID n° 7),
 U6ARNp-R, AACGCTTCACGAATTTGCGT (SEC ID n° 8),
 DMPK exón 9-exón 10-F, CACTGTCCGACATTCGGGAAGGTGC (SEC ID n° 9),
 DMPK exón 9-exón 10-R, GCTTGACAGTGTGGCTCAAGCAGCTG (SEC ID n° 10),
 DMPK exón 9-intrón 10-F, CTACCCACAGGCCAGAAGTT (SEC ID n° 11),
 DMPK intrón 9-intrón 10-R, GGAAGCCCTCACTTTTCTC (SEC ID n° 12),
 DMPK unión de empalme exón 14/16-exón 16-F, CTGCTCCCTGCCAGGGCTGA (SEC ID n° 13),
 DMPK unión de empalme exón 14/16-exón 16-R, TGTCGGGGTCTCAGTGCATCCA (SEC ID n° 14),
 CPA6-F, ACTGATGTCCATATCCCCCA (SEC ID n° 15),
 CPA6-R, TTTGAGTCGTGATCGTCTGC (SEC ID n° 16),
 LTBP3-F, GAGAAGAGCCTGTGTTTCCG (SEC ID n° 17),
 LTBP3-R, GAAAAGTCACTCTCGCCCTG (SEC ID n° 18),
 LRP8-F, CTCCACTGACTTCCTGAGCC (SEC ID n° 19),
 LRP8-R, GTGCTCGGTAGCACCTTCTC (SEC ID n° 20),
 TMCC1-F, GAGCAAAGGTGACTGGCTTC (SEC ID n° 21),
 TMCC1-R, CGCTCCTCCTGTAAGGTCTG (SEC ID n° 22),

5 CASK-F, CAGAGTTCGGCTGGTACAGT (SEC ID nº 23),
 CASK-R, ACAGGACGAAGACTGAGTGC (SEC ID nº 24),
 MAP3K4-F, AAGGGCACGTATAGCATTGG (SEC ID nº 25),
 MAP3K4-R, TGGTTCTCCAGCAGGTCTCT (SEC ID nº 26),
 BIN1-exón 11-F, AGAACCTCAATGATGTGCTGG (SEC ID nº 27),
 BIN1-exón 11-R, TCGTGGTTGACTCTGATCTCGG (SEC ID nº 28),
 DMD-exón 78-F, TTAGAGGAGGTGATGGAGCA (SEC ID nº 29),
 DMD-exón 78-R, GATACTAAGGACTCCATCGC (SEC ID nº 30),
 10 LDB3-exón 7-F, GCAAGACCCTGATGAAGAAGCTC (SEC ID nº 31),
 LDB3-exón 7-R, GACAGAAGGCCGGATGCTG (SEC ID nº 32).

FISH e inmunofluorescencia

15 Se llevó a cabo la hibridación *in situ* fluorescente (FISH, por sus siglas en inglés) tal como se ha descrito (Taneja, Biotechniques 24:472-476, 1998) utilizando una sonda de ácido péptido-nucleico (CAG)₇ marcado con Cy3. Con el fin de determinar el número de focos por núcleo, se contaron más de 500 células DM1 en por lo menos tres experimentos independientes. Se llevó a cabo un experimento combinado de FISH-inmunofluorescencia (FI) tal como se ha descrito (Klein *et al.*, Exp. Cell Res. 314:1652-1666, 2008) utilizando un anticuerpo monoclonal MBNL1 (MB1a desarrollado por G. Morris [Holt *et al.*, Am. J. Pathol. 174:216-227, 2009]) seguido de un anticuerpo secundario de cabra antiratón conjugado con Alexa 488 (Invitrogen). Se captaron fotografías utilizando un microscopio confocal Leica y software (Leica Microsystems) y se procesaron con el software Adobe Photoshop (Adobe System Inc.). Para el análisis del índice de fusión, se llevó a cabo FI en cultivos de células musculares diferenciadas tal como se ha descrito (Jacquemin *et al.*, J. Cell Sci. 120:670-681, 2007) utilizando un anticuerpo de desmina (D33, DAKO) y se contratiñeron los núcleos con Hoechst 33258 (Sigma). Se contaron más de 1.500 núcleos y se determinó el índice de fusión a partir del número de núcleos en los miotubos diferenciados (>2 mionúcleos) como porcentaje del número total de núcleos en las células positivas para desmina.

Transferencia western

30 Se llevó a cabo una transferencia western utilizando métodos estándares con un anticuerpo de DMPK (MANDM1) tal como se ha descrito previamente (Furling *et al.*, Am. J. Pathol. 162:1001-1009, 2003).

Análisis estadísticos

35 Los datos de grupos se expresaron como medias +/- SEM. La comparación entre grupos se llevó a cabo utilizando la prueba t de Student para datos no apareados (fig. 1b, 1c, 5 y 6) y la prueba de Newman-Keuls (fig. 2a, 2b y 2c) utilizando el software GraphPad Prism 4. Las diferencias entre grupos se consideraron significativos en el caso de que P<0,05 (*, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001).

Resultados

45 Los presentes inventores describieron una nueva función para los ARNnp-U7_h modificados diferente del bloque de sucesos de empalme del pre-ARNm. Los ARNnp-U7_h que alojaban una secuencia poli-CAG con diana en el segmento (CUG)_n expandido en la región 3' de los transcritos de DMPK provocaron una degradación nuclear específica de los ARNm de DMPK mutantes sin afectar a los productos del alelo de tipo salvaje. La anulación de la toxicidad del ARN de ganancia de función responsable de la distrofia miotónica apoya la utilización del ARNnp-U7_h para el silenciamiento génico en los trastornos de expansiones de repeticiones no codificantes.

50 La distrofia miotónica de tipo 1 (DM1) es la distrofia neuromuscular más común en el adulto (Harper, Myotonic dystrophy, tercera ed., W.B. Saunder, London, 2001). Es una enfermedad hereditaria dominante que pertenece al grupo de los trastornos de ARN de ganancia de función (Shin *et al.*, M.S. Neurosci. Lett. 466:99-102, 2009) debido a repeticiones CTG expandidas en la región 3' no traducida del gen de la proteína quinasa de DM (DMPK) (Brook *et al.*, Cell 68:799, 1992). Los transcritos de DMPK mutantes que contienen hasta miles de repeticiones de CUG expandidas (CUG^{exp}) resultan atrapados en el núcleo (Davis *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7388-7393, 1997). Esta acumulación altera la regulación del empalme alternativo, que seguidamente conduce a un empalme erróneo de varios transcritos de ARNm y disfunción neuromuscular (Ranum *et al.*, Annu. Rev. Neurosci. 29:259-277, 2006). En efecto, los ARNm CUG^{exp}-DMPK se encuentran plegados de manera que se unen a las proteínas de unión al ARN formando complejos ribonucleoproteicos estables o focos (Miller *et al.*, EMBO J. 19:4439-4448, 2000). Estos complejos secuestran predominantemente las proteínas de tipo muscleblind-like 1 (MBNL1), produciendo una pérdida de función de este regulador esencial de empalme del ARNm (Lin *et al.*, Hum. Mol. Genet. 15:2087-2097, 2006).

65 Las estrategias para el rescate fenotípico en DM1 se han evaluado utilizando oligonucleótidos antisentido sintéticos con diana en las expansiones de CUG en modelos murinos de DM1 (Wheeler *et al.*, Science 325:336-339, 2009; Mulders *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:13915-13920, 2009). Estos estudios han utilizado la administración local de morfolinós o de oligonucleótidos 2'-O-metil-fosforotioato con el objetivo de interferir y desplegar los CUG^{exp}-

ARNm para liberar MBNL1 de los focos, de manera que se encuentra disponible para su función de empalme global. Sin embargo, la utilización de los oligos sintéticos requiere tratamientos repetidos. Para superar este problema los presentes inventores han diseñado un ARNnp-U7_h humano optimizado que aloja secuencias antisentido de CAG para garantizar un efecto eficiente duradero. Se amplificó un fragmento de aproximadamente 0,5 kb que contenía el gen U7 humano a partir de ADN genómico humano. El transcrito de ARNnp-U7_h se optimizó tal como se ha descrito anteriormente (Goyenvalle *et al.*, Science 306:1796-1799, 2004). En primer lugar, se sustituyó su dominio de unión de Sm por una secuencia de Sm canónica derivada del ARNnp-U2 (Sm-Opt) para la unión a las proteínas Sm apropiadas que permiten el ensamblaje eficiente de la RNPnp e incrementan su acumulación nuclear (Stefanovic *et al.*, Nucleic Acids Res. 23:3141-3151, 1995). Posteriormente, se sustituyó la secuencia complementaria de pre-ARNM de histonas natural por un poli-CAG (fig. 1a). La ARNnp-U7_h-CAGn manipulada (U7_h-CAGn) se mantuvo bajo el control de su promotor natural y elementos hacia 3' de 3' (fig. 3). A continuación, este constructo se clonó en un esqueleto lentivírico para una transferencia génica de alta eficiencia en las células de músculo esquelético humano.

Las células musculares aisladas a partir de pacientes de DM1 con una elección de expansiones de CTG se transdujeron con vectores lentivíricos que expresaban un U7_h-CAG15 optimizado (15 repeticiones de CAG). En estas células el alelo normal mostraba menos de 37 repeticiones, mientras que los alelos mutantes mostraban expansiones de CTG comprendidas entre 200 y 2.000 repeticiones. Las células transducidas se mantuvieron en crecimiento durante por lo menos una semana antes de la evaluación de la estabilidad de los ARNm de DMPK. El análisis de transferencia northern demostró que los niveles de estado estable de los transcritos de DMPK expandidos se habían reducido significativamente ($P < 0,001$) en 71% a 82% en las células DM1 que expresaban U7_h-CAG₁₅ (fig. 1b). La desaparición de los ARNm de DMPK expandidos se produjeron de una manera dependiente de la dosis de vector (fig. 4a). Resulta importante que se conservó el ARNm de DMPK normal. Este fenómeno también se confirmó en mioblastos de tipo salvaje que portaban 13/18 repeticiones de CTG (fig. 5). Además, el empalme alternativo de la isoforma E14/16 de la DMPK normal (Tiscornia *et al.*, Mol. Cell 5:959-967, 2000) que no presentaba exón 15 ni segmento de CUG, no resultó afectada por U7_h-CAG₁₅ (fig. 6a) y no se observó ningún cambio en los niveles de proteína DMPK en las células DM1 tratadas (fig. 6b). También cabe indicar que la utilización del sistema U7_h-CAG_n permitió mantener una destrucción dirigida continua y permanente de los transcritos perjudiciales durante los pases celulares.

Con el fin de evaluar adicionalmente la desaparición de los ARNm de DMPK mutados, los presentes inventores examinaron los complejos ribonucleoproteicos CUG^{exp}, que habitualmente se acumulan en forma de numerosos focos en los núcleos de las células DM1. Tal como se esperaba, el análisis de hibridación in situ fluorescente (FISH) demostró una pérdida drástica dependiente de la dosis de dichas estructuras nucleares en mioblastos DM1 tratados (fig. 1c y fig. 24b). Hasta 60% de los mioblastos DM1 tratados con U7_h-CAG₁₅ no mostraban focos ($P < 0,001$). Un 25% adicional de dicha población celular sólo mostraba un único foco pálido. Además, no se observaron focos remanentes en el compartimiento citoplasmático. El fraccionamiento del ARN nuclear y citoplasmático de las células DM1 que contenían un sitio de restricción polimórfico en el alelo expandido (Hamshere *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7394-7399, 1997) confirmó que se conservaban los transcritos mutados en el núcleo y que no eran exportados al citoplasma (fig. 1d). En presencia de U7_h-CAG₁₅ no se detectaron transcritos del alelo CTG^{exp} en la fracción citoplasmática, demostrando la presencia de un mecanismo de degradación selectiva de los ARNm-CUG^{exp} en el núcleo. Inesperadamente, este mecanismo no afectaba a los ARNm de DMPK, sugiriendo que U7_h-CAG₁₅ operaba sobre los focos y no sobre la génesis del ARNm.

Con el fin de evaluar el efecto de la longitud de la secuencia antisentido de CAG, los presentes inventores diseñaron constructos adicionales de ARNnp-U7_h que alojaban secuencias de CAG acortadas (7 y 11 repeticiones). La totalidad de ellos presentaba como diana y silenciaban eficientemente los ARNm CUG^{exp}-DMPK ($P < 0,001$) en las células DM1. Sin embargo, estos constructos acortados también afectaron al producto del alelo DMPK normal ($P < 0,01$), que contenía 13 repeticiones de CUG (fig. 2a). Esta pérdida de especificidad indujo a los presentes inventores a analizar seis transcritos humanos que también portaban segmentos de CUG de entre 7 y 16 repeticiones (fig. 6). Cuatro de estos productos génicos no resultaron afectados en células DM1 que expresaban U7_h-CAG_{7,11 o 15}. Sin embargo, las expresiones alteradas de los transcritos CPA6 (7 CUG) y LRP8 (11 CUG) se correlacionaron con la reducción de la longitud de la secuencia antisentido de CAG. Resulta importante que el CAG₁₅, más largo, no afectó significativamente ni a CPA6 ni a LRP8.

A continuación, los presentes inventores evaluaron si U7_h-CAG₁₅ era capaz de revertir las consecuencias fisiopatológicas de los ARNm-CUG^{exp} tóxicos. Los presentes inventores se centraron en las características distintivas de la DM1, tales como el secuestro de MBNL1 y la regulación anormal del empalme alternativo. El análisis combinado FISH-inmunofluorescencia demostró que los ARNm-CUG^{exp} silenciadores conducían a la liberación del MBNL1 secuestrado de los agregados nucleares de CUG^{exp} y a una relocalización normal de MBNL1 en las células DM1 tratadas (fig. 2b).

El resultado de la regulación incorrecta del empalme de DM1 se examinó en varios genes, tales como BIN1, DMD y LDB3, que resultan anormalmente procesados en las células musculares de DM1 diferenciadas. Los perfiles de empalmes de estos genes resultaron significativamente normalizados ($P < 0,01$) en la presencia de U7-CAG₁₅, mientras que U7_h-CAG₁₅ no afectó al empalme de estos genes en las células de tipo salvaje (fig. 2c). También es

conocido que las células musculares DM1 con grandes expansiones de CTG muestran una diferenciación defectuosa (Furling *et al.*, Hum. Mol. Genet. 10:2079-2087, 2001) ($P < 0,001$). En este caso, en presencia de U7_h-CAG₁₅, el índice de fusión de los mioblastos DM1 tratados se restauró apreciablemente ($P < 0,01$) hasta un nivel similar al de los mioblastos de tipo salvaje (fig. 2e).

En conclusión, los datos de los presentes inventores demuestran que el sistema U7-CAG permite una destrucción selectiva duradera de los ARNm-CUG^{exp} perjudiciales. MBNL1 y probablemente otros factores de unión a ARNm fueron consecuentemente liberados de los focos, conduciendo a un empalme y diferenciación mejorados en las células DM1 tratadas. La longitud de la secuencia antisentido CAG aparentemente resulta crítica. Con menos de 15 repeticiones de CAG, la incidencia de efectos inespecíficos podría contrarrestar el beneficio proporcionado por la destrucción de los ARNm mutados. El mecanismo mismo por el que U7-CAG₁₅ indujo la destrucción selectiva de los ARNm-CUG^{exp} no se ha determinado por completo. Los ARNnp-U7 manipulados, así como los morfolidos y los 2'-O-metil-fosforotioatos, los cuales han sido utilizados con éxito en la DM1 (Wheeler *et al.*, Science 325:336-339, 2009; Mulders *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:13915-13920, 2009), no se cree que induzcan actividades de ARNasa. Por el contrario, dichos compuestos se utilizan comúnmente para forzar el empalme alternativo en las estrategias de salto de exón y de inclusión de exón (Du y Gatti, Curr. Opin. Mol. Ther. 11(2):116-23, 2009). Es probable que la destrucción selectiva de los ARNm CUG^{exp}-DMPK en presencia de moléculas antisentido de CAG no se basa en mecanismos de interferencia de ARN canónico. Por el contrario, la desaparición o degradación nuclear acelerada de los heterodúplex CUG^{exp}-DMPK/CAG_n se deberían a una inestabilidad innata de los ARNm de DMPK mutantes, un fenómeno desafortunadamente contrarrestado por MBNL1 en las células DM1 no tratadas.

Delimitación del dominio kiss

Materiales y métodos

Ratones e inyecciones de VAA

Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo siguiendo un protocolo aprobado por la institución y bajo contención biológica apropiada. En ratones mdx de ocho semanas de edad se inyectaron 50 µl de solución salina tamponada con fosfato que contenía vectores VAA en el TA (ver la Tabla 1). Tras un mes, se sacrificaron los ratones y se recolectaron los músculos, se congelaron instantáneamente en isopentano enfriado en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Constructos y vectores VAA recombinantes

El constructo de referencia, VAA_U7_SD23/BP22 ha sido descrito previamente en el documento nº WO 2006/021724. Para los constructos modificados se modificaron 1 a 4 pares de bases mediante PCR por mutagénesis (Stratagene) en el bucle de U7 o en la secuencia antisentido correspondiente a la unión hipotética del bucle (ver la Tabla 2 para información sobre las secuencias). Se prepararon vectores pseudotipados VAA2/1 mediante transfección de células 293 tal como se ha descrito y se purificaron partículas vectores en gradientes de cloruro de cesio a partir de lisados celulares obtenidos 48 horas después de la transfección y se titularon mediante hibridación cuantitativa por transferencia de puntos. Se proporcionan los títulos en la Tabla 1.

Histología

Se examinó para distrofina una serie de secciones transversales de 8 µm cortadas a intervalos de 200 µm a lo largo del músculo (anticuerpo monoclonal de NCL-DYS2 del dominio C-terminal, NovoCastra) mediante inmunohistoquímica. Las secciones montadas se analizaron mediante microscopía láser confocal (Leica). Se recogió el tejido intermedio para el análisis del ARNm.

Análisis del ARN

Se aisló el ARN total a partir de secciones intermedias agrupadas utilizando el reactivo TRIzol (Life Technologies). Para detectar el ARNm de la distrofina, en primer lugar se llevó a cabo la transcripción inversa del ARN total con transcriptasa inversa Superscript II en presencia de hexámeros aleatorios (Invitrogen). A continuación, se llevó a cabo una PCR anidada en el ADNc mediante la utilización de la mezcla maestra de PCXR (Promega). La primera reacción se llevó a cabo con los cebadores Ex20ext (SEC ID nº 33: 5'-CAGAATTCTGCCAATTGCTGAG-3') y Ex26ext (SEC ID nº 34: 5'-TTCTTCAGCTTGTGTCATCC-3') durante 30 ciclos (94°C/30 s; 55°C/1 min.; 72°C/2 min.). A continuación, se amplificaron 2 µl de la primera reacción durante 25 ciclos con Ex20int (SEC ID nº 35: 5'-CCCAGTCTACCACCCTATCAGAGC-3') y Ex26int (SEC ID nº 36: 5'-CCTGCCTTTAAGGCTTCCTT-3'). Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2%.

Resultados

La sección siguiente describe experimentos que muestran la necesidad de un dominio kiss para conseguir el rescate de la distrofina mediante la utilización del salto de exón U7npOPT en el modelo de ratón mdx.

El ratón mdx (Bulfield *et al.*, 1984; Ryder-Cok *et al.*, 1988) presenta una sustitución de una base dentro del exón 23 del gen de la distrofina, que provoca la terminación prematura de la cadena polipeptídica (Sicinski *et al.*, 1989) de manera que no se produce la isoforma muscular de 427 kDa de longitud completa de la distrofina. De acuerdo con las etapas de los exones en el gen de la distrofina, resultaría posible traducir una distrofina acortada (quasi-distrofina) saltando el exón 23 durante el curso del empalme del ARNm.

Se diseñaron varias secuencias antisentido para saltar la mutación sin sentido que contenía el exón 23 en el ARNm de la distrofina de mdx. Estas secuencias estaban asociadas a U7smOPT y se introdujeron en vectores basados en VAA2 que se empaquetaron en la cápside de VAA1 para una transferencia génica de alta eficiencia al músculo esquelético. En ratones mdx adultos se inyectaron en el músculo tibial anterior (TA) dosis únicas de vector de aproximadamente 10^{12} genomas víricos y se sometió a ensayo el rescate de la distrofina un mes después (fig. 10). Sólo los constructos que permitían una interacción entre el dominio kiss y el bucle resultaban eficientes en el rescate de la distrofina.

Tabla 1

Ratones	Constructos de VAA		Dosis de VAA (vg/ml)		Figuras
	TAD	TAG			
3	VAA_U7_BP22/SD23	VAA_U7_BP22/SD23 modif.	2×10^{12}	$1,4 \times 10^{13}$	A/A'
3	VAA_U7_BP22/SD23modif	VAA_U7_BP22/SD23 - 2Xmodif.	$1,4 \times 10^{13}$	$1,4 \times 10^{12}$	B/B'
3	VAA_U7_SD23	VAA_U7_SD23	$2,8 \times 10^{12}$	$8,2 \times 10^{11}$	C/C'
3	VAA_U7_SD23/BP22 (ref.)	VAA_U7_SD23/BP22_bucle modif.	$4,5 \times 10^{12}$	$5,2 \times 10^{12}$	D/D'
4	VAA_U7_SD23/BP22 (ref.)	VAA_U7_SD23/BP22_nuevo bucle	$4,5 \times 10^{12}$	$2,3 \times 10^{12}$	
4	VAA_U7_BP22/SD23_bucle modif.	VAA_U7_BP22/SD23 modif.	3×10^{12}	$1,4 \times 10^{13}$	

Tabla 2

Nombre de los constructos	Secuencias
VAA_U7_BP22/SD23	BP22: 5'-AAATAGAAGTTCATTTACTACTAAC-3' (SEC ID nº 37) SD23: 5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCT-3' (SEC ID nº 38)
VAA_U7_BP22/SD23modif.	BP22: 5'-AAATAGAAGTTCATTTACTACTAAC-3' (SEC ID nº 37) SD23 modif.: 5'-GGCGAAACCTCGGCTTACCT-3' (SEC ID nº 39)
VAA_U7_BP22/SD23_bucle modif.	Bucle-Smopt: 5'-AATTTTTGGAGCAGGTTTTCTGACTTGGGTCGGAAAACC-3' (SEC ID nº 40)
VAA_U7_BP22/SD23-2Xmodif.	BP22: 5'-AAATAGAAGTTCATTTACTACTAAC-3' (SEC ID nº 37) SD23: 5'-GGCGAAACCTCGGCTTACCT-3' (SEC ID nº 38) Bucle Smopt: 5'-AATTTTTGGAGCAGGTTTTCTGACTTGGGTCGGAAAACC-3' (SEC ID nº 40)
VAA_U7_SD23modif.	SD23: 5'-GGCGAAACCTCGGCTTACCT-3' (SEC ID nº 38)
VAA_U7_SD23/BP22_bucle modif.	Bucle Smopt modif.: 5'-AATTTTTGGAGCAGGTTTTCTGACGGCGTCGGAAAACC-3' (SEC ID nº 41)
VAA_U7_SD23/BP22_nuevo bucle	Bucle Smopt modif2: 5'-AATTTTTGGAGCAGGTTTTCTGCAGGCGTCGGAAAACC-3' (SEC ID nº 42)

Listado de secuencias

<110> ASSOCIATION INSTITUT DE MYOLOGIE

<120> NUEVOS ARNnp U7 MODIFICADOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES

<130> D26819

<150> US 61/314.830

<151> 2010-03-17

ES 2 566 553 T3

<160> 42

<170> PatentIn versión 3.3

5 <210> 1
<211> 32
<212> ARN
<213> Homo sapiens

10 <220>
<221> misc_features
<223> bucle en horquilla ARNnp huU7

<400> 1

15 uaggcuuucu ggcuuuuuac cggaaagccc cu 32

<210> 2
<211> 11
<212> ARN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> smOPT

25 <400> 2

30 aauuuuugga g 11

<210> 3
<211> 363
<212> ADN
<213> Homo sapiens

35 <220>
<221> misc_feature
<223> promotor de huU7

40 <400> 3

gggcattagg ctccatcgct catcaataga caaggccttt aggaaactgc gacaacggct 60

tttgctctgg gcctttactg ccgaatccag gtctccgggc ttaacaacaa cgaaggggct 120

gtgactggct gctttctcaa ccaatcagca ccgaactcat ttgcatgggc tgagaacaaa 180

tgttcgcgaa ctctagaaat gaatgactta agtaagtcc ttagaatatt atttttccta 240

ctgaaagtta ccacatgcgt cgttgtttat acagtaatag gaacaagaaa aaagtcacct 300

aaagctcacc tcatcaattg tggagttcct ttatatccca tcttctctcc aaacacatac 360

gca 363

45 <210> 4
<211> 233
<212> ADN
<213> Homo sapiens

50 <220>
<221> misc_feature
<223> elementos hacia 3' de huU7

<400> 4

55

ES 2 566 553 T3

```

cttatgatgt ttgttgccaa tgatagattg ttttcactgt gcaaaaatta tgggtagttt      60
tggtggtcctt gatgcagttg taagccttggg gtatgaaggt ttgggccacg cctgggcgct      120
tccggctgcg ccggatgctg tttcctttcc gctcccaggg gcgttgggaa cggtttagg      180
acgtggctct ttattcgtga gttttccatt tacctccgct gaacctagag ctt      233

<210> 5
<211> 26
5 <212> ADN
   <213> artificial

<220>
<223> oligo GAPDH-F
10
<400> 5

tgaagtcgg agtcaacgga tttgt      26

15 <210> 6
   <211> 25
   <212> ADN
   <213> artificial

20 <220>
   <223> oligo GAPDH-R

   <400> 6

25 gatgacaagc ttccgttct cagcc      25

   <210> 7
   <211> 17
   <212> ADN
30 <213> artificial

   <220>
   <223> oligo U6npARN-F

35 <400> 7

ctcgcttcgg cagcaca      17

40 <210> 8
   <211> 20
   <212> ADN
   <213> artificial

   <220>
45 <223> oligo U6npARN-R

   <400> 8

50 aacgcttcac gaattgcgt      20

   <210> 9
   <211> 25
   <212> ADN
   <213> artificial

55 <220>
   <223> DMPK exón 9-exón 10-oligo F

   <400> 9

```

ES 2 566 553 T3

cactgtcgga cattcgggaa ggtgc 25
 5 <210> 10
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 10 <223> DMPK exón 9-exón 10-oligo R
 <400> 10
 gcttgcacgt gtggctcaag cagctg 26
 15 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> DMPK intrón 9-intrón 10-oligo F
 <400> 11
 25 ctaccacag gccagaagt 20
 <210> 12
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 35 <223> DMPK intrón 9-intrón 10-oligo R
 <400> 12
 ggaagccctc acctttctc 20
 40 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 45 <220>
 <223> DMPK unión de empalme exón 14/16-exón 16-oligo F
 <400> 13
 50 ctgctccctg ccagggctga 20
 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 55 <213> artificial
 <220>
 <223> DMPK unión de empalme exón 14/16-exón 16-oligo R
 60 <400> 14
 tgcggggctc tcagtcac ca 22
 65 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 566 553 T3

<213> artificial
 <220>
 <223> CPA6-oligo F
 5 <400> 15
 actgatgtcc atatcccca 20
 10 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> CAP6-oligo R
 <400> 16
 20 ttgagtcgt gatcgtctgc 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> artificial
 <220>
 <223> LTBP3-oligo F
 30 <400> 17
 gagaagagcc tgtgttccg 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> LTBP3-oligo R
 <400> 18
 45 gaaaagtcac tctgccctg 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> LRP8-oligo F
 <400> 19
 55 ctccactgac ttctgagcc 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 60 <220>
 <223> LRP8-oligo R
 65 <400> 20

ES 2 566 553 T3

	gtgctcggta gcaccttc	20
5	<210> 21 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> TMCC1-oligo F <400> 21	
15	gagcaaaggt gactggctc	20
20	<210> 22 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
25	<220> <223> TMCC1-oligo R <400> 22	
30	cgctcctct gtaaggtcg	20
35	<210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
40	<220> <223> CASK-oligo F <400> 23	
45	cagagttcgg ctgtacagt	20
50	<210> 24 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
55	<220> <223> CASK-oligo R <400> 24	
60	acaggacgaa gactgagtgc	20
65	<210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
70	<220> <223> MAP3K4-oligo F <400> 25	
75	aagggcacgt atagcattgg	20
80	<210> 26 <211> 20 <212> ADN	

<213> artificial
 <220>
 <223> MAP3K4-oligo R
 5 <400> 26
 tggttctcca gcaggctct 20
 10 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> BIN1-exón 11-oligo F
 <400> 27
 20 agaacctcaa tgatgtgctg g 21
 <210> 28
 <211> 22
 <212> ADN
 25 <213> artificial
 <220>
 <223> BIN1-exón 11-oligo R
 30 <400> 28
 tcgtggttga ctctgatctc gg 22
 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> artificial
 <220>
 40 <223> DMD-exón 78-oligo F
 <400> 29
 ttagaggagg tgatggagca 20
 45 <210> 30
 <211> 20
 <212> DN
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> DMD-exón 78-oligo R
 <400> 30
 55 gatactaagg actccatcgc 20
 <210> 31
 <211> 23
 60 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> LDB3-exón 7-oligo F
 65 <400> 31

ES 2 566 553 T3

	gcaagaccct gatgaagaag ctc	23
5	<210> 32 <211> 19 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> LDB3-exón 7-oligo R	
	<400> 32	
15	gacagaaggc cggatgctg	19
	<210> 33 <211> 22 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> oligo Ex20ext	
	<400> 33	
25	cagaattctg ccaattgctg ag	22
	<210> 34 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> oligo Ex26ext	
35	<400> 34	
	ttcttcagct tgtgtcatcc	20
40	<210> 35 <211> 24 <212> ADN <213> artificial	
45	<220> <223> oligo Ex20int	
	<400> 35	
50	cccagtctac caccctatca gagc	24
	<210> 36 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
55	<220> <223> oligo Ex16int	
60	<400> 36	
	cctgccttta aggcttcct	20
65	<210> 37 <211> 24 <212> ADN	

ES 2 566 553 T3

<213> artificial
 <220>
 <223> oligo BP22
 5 <400> 37
 aaatagaagt tcatttacac taac 24
 10 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> oligo SD23
 <400> 38
 20 ggccaaacct cggcttacct 20
 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> artificial
 <220>
 <223> oligo modif. SD23
 30 <400> 39
 ggcgaaacct cggcttacct 20
 <210> 40
 <211> 39
 <212> ADN
 35 <213> artificial
 <220>
 40 <223> oligo bucle Smopt
 <400> 40
 aatthttgga gcaggthttc tgacttggt cggaaaacc 39
 45 <210> 41
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> oligo modif. bucle Smopt
 <400> 41
 55 aatthttgga gcaggthttc tgacggcgtc ggaaaacc 38
 <210> 42
 <211> 38
 60 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> oligo modif.2 bucle Smopt
 65 <400> 42

aattttgga gcaggtttc tgcaggcgtc ggaaaacc 38

REIVINDICACIONES

- 5
1. ARNnp huU7 modificado, que comprende los elementos siguientes unidos covalentemente del extremo 3' al extremo 5':
- un polinucleótido que presenta la secuencia SEC ID nº 1
 - un polinucleótido que presenta la secuencia SEC ID nº 2, y
 - uno o más polinucleótidos en los que:
- 10
- por lo menos uno de dichos polinucleótidos es un antisentido de por lo menos parte de un pre-ARNm diana, en el que dicha por lo menos parte de un pre-ARNm diana es por lo menos:
 - un sitio de empalme de un exón, pudiendo dicho antisentido interferir con el empalme de dicho exón, o
- 15
- una expansión de repetición de trinucleótido, pudiendo dicho antisentido de dicha expansión desencadenar la destrucción selectiva de dicho pre-ARNm diana, y
- 20
- por lo menos uno de dichos polinucleótidos (el dominio kiss) puede hibridarse con por lo menos 4 nucleótidos comprendidos dentro de los nucleótidos comprendidos entre los nucleótidos 12 y los nucleótidos 20 de SEC ID nº 1.
2. ARNnp huU7 modificado según la reivindicación 1, en el que el sitio de empalme se selecciona de entre el grupo que consiste en el sitio donante de 5', el sitio aceptor de 3', la secuencia de punto de ramificación (BP), la secuencia de aumentador de empalme exónico (ESE), la secuencia de aumentador de empalme intrónico (ISE) y las secuencias silenciadoras intrónicas (ISS) y el bucle en horquilla terminal (TSL).
- 25
3. ARNnp huU7 modificado según la reivindicación 1, en el que el trinucleótido es CUG.
- 30
4. ARNnp huU7 modificado según la reivindicación 3, en el que el antisentido comprende por lo menos 15 repeticiones del trinucleótido CAG.
- 35
5. ARNnp huU7 modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho dominio kiss presenta una secuencia seleccionada de entre AAGU, GAGU, GGGU y AGGU o dicho dominio kiss presenta una secuencia seleccionada de entre GCAGU, GAAGU, GCGGU, GGAGU, GAGGU y GGGGU.
6. Polinucleótido que comprende un gen que codifica el ARNnp huU7 modificado según las reivindicaciones 1 a 5.
7. Polinucleótido según la reivindicación 6, en el que dicho gen está fusionado con las secuencias reguladoras.
- 40
8. Polinucleótido según la reivindicación 7, en el que dichas secuencias reguladoras comprenden el promotor de U7 humano.
9. Polinucleótido según la reivindicación 8, en el que dicho promotor presenta la secuencia de SEC ID nº 3.
- 45
10. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que dichas secuencias reguladoras comprenden la secuencia hacia 3' del gen de ARNnp huU7.
- 50
11. Polinucleótido según la reivindicación 10, en el que dicha secuencia hacia 3' presenta la secuencia de SEC ID nº 4.
12. Vector que comprende el polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11.
- 55
13. Vector según la reivindicación 12, en el que dicho vector es seleccionado de entre el grupo que consiste en plásmidos, vectores adenovíricos, vectores adenovíricos asociados y vectores lentivíricos.
- 60
14. Célula eucariótica aislada transfectada por el vector según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13.
15. Célula según la reivindicación 14, en la que dicha célula es una célula de músculo esquelético, un mioblasto o una célula capaz de diferenciación muscular.
- 65
16. Célula según la reivindicación 14, en la que dicha célula es una célula troncal pluripotente inducida.
17. Composición farmacéutica que comprende el vector según cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15 o célula según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16.

18. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13 o célula según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 como un medicamento.
- 5 19. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13 o célula según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 para el tratamiento o la prevención de una enfermedad neuromuscular.
20. Vector o célula según la reivindicación 19, en el/la que la enfermedad neuromuscular es una distrofia neuromuscular.
- 10 21. Vector o célula según la reivindicación 20, en el/la que la distrofia neuromuscular es la distrofia muscular de Duchenne o la distrofia miotónica 1.
22. Vector o célula según la reivindicación 19, en el/la que la enfermedad neuromuscular es la atrofia muscular espinal.
- 15 23. Método *in vitro* para restaurar la función de una proteína celular mediante salto de exón, inclusión de exón, o erradicación de ARNm perjudiciales, que comprende la etapa de poner en contacto una célula con el vector según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13.

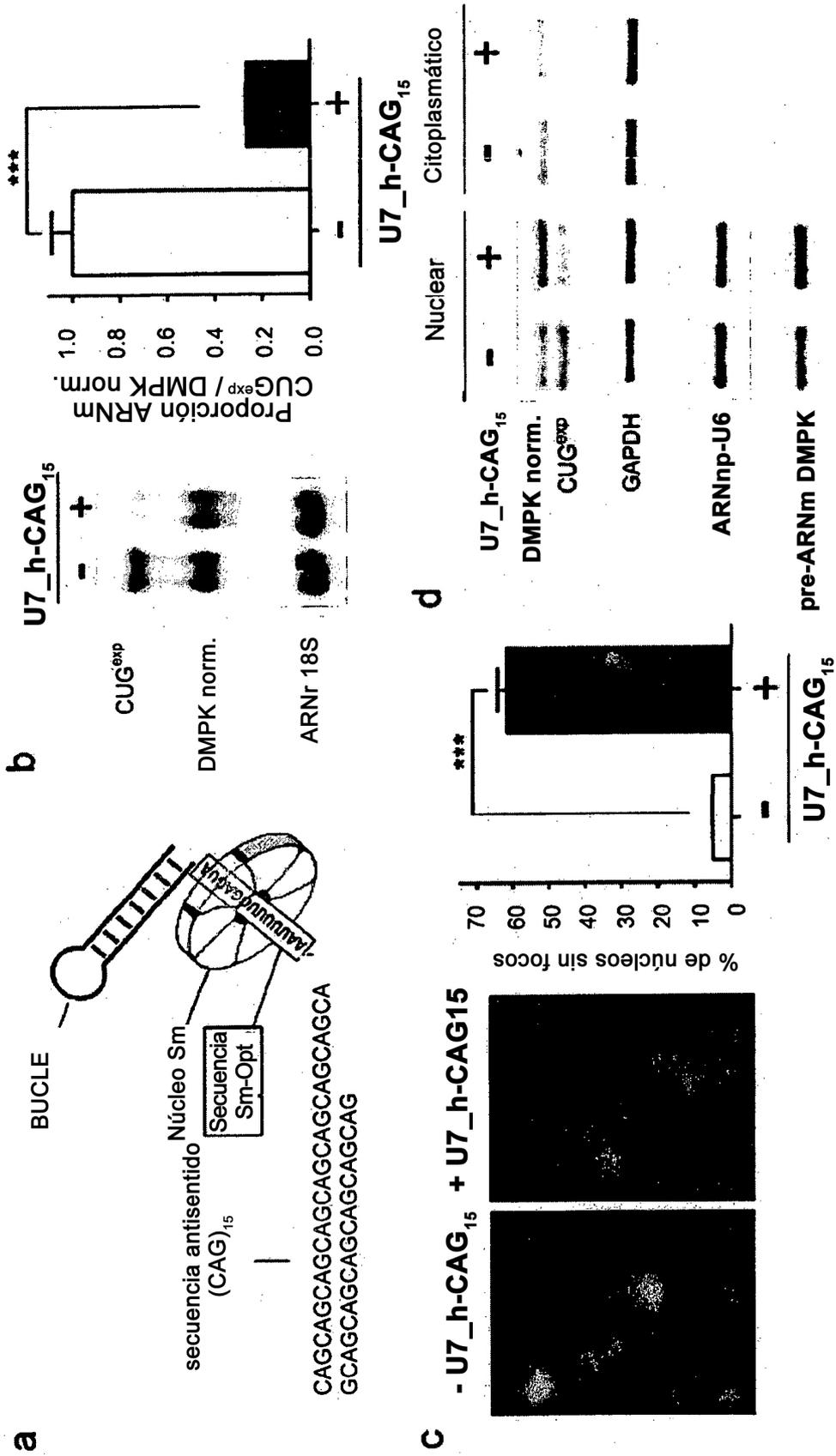


Fig. 1

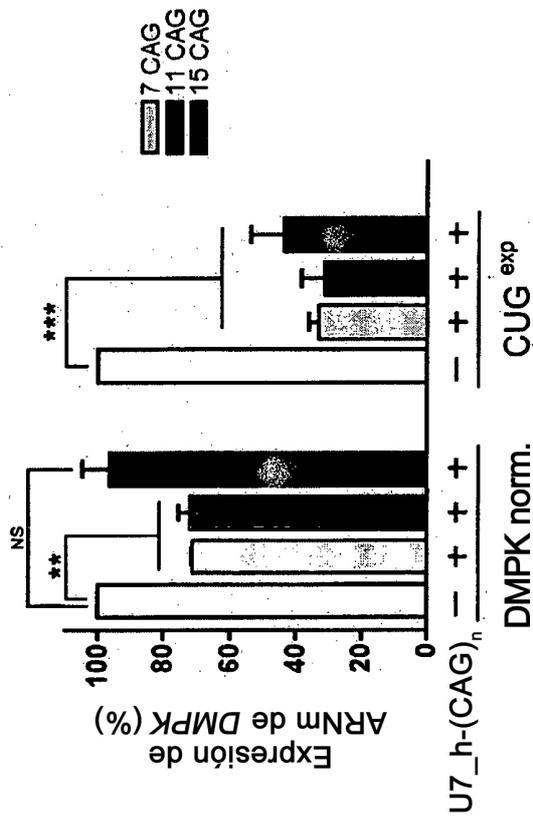


Fig. 2a

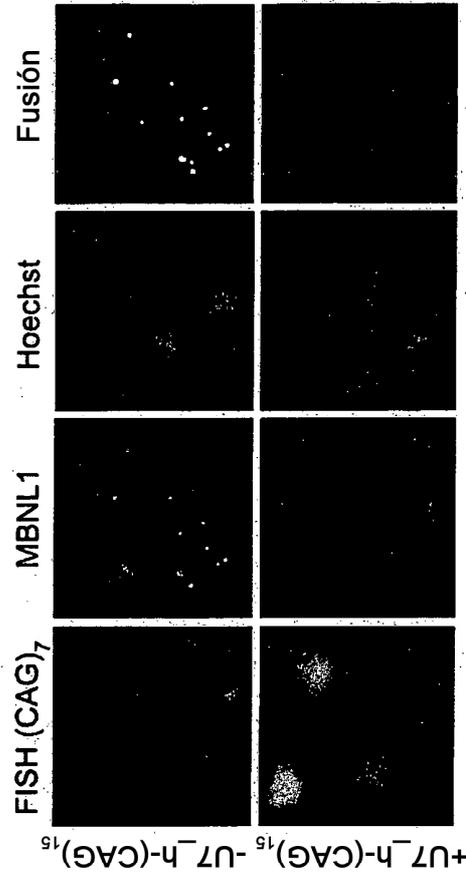


Fig. 2b

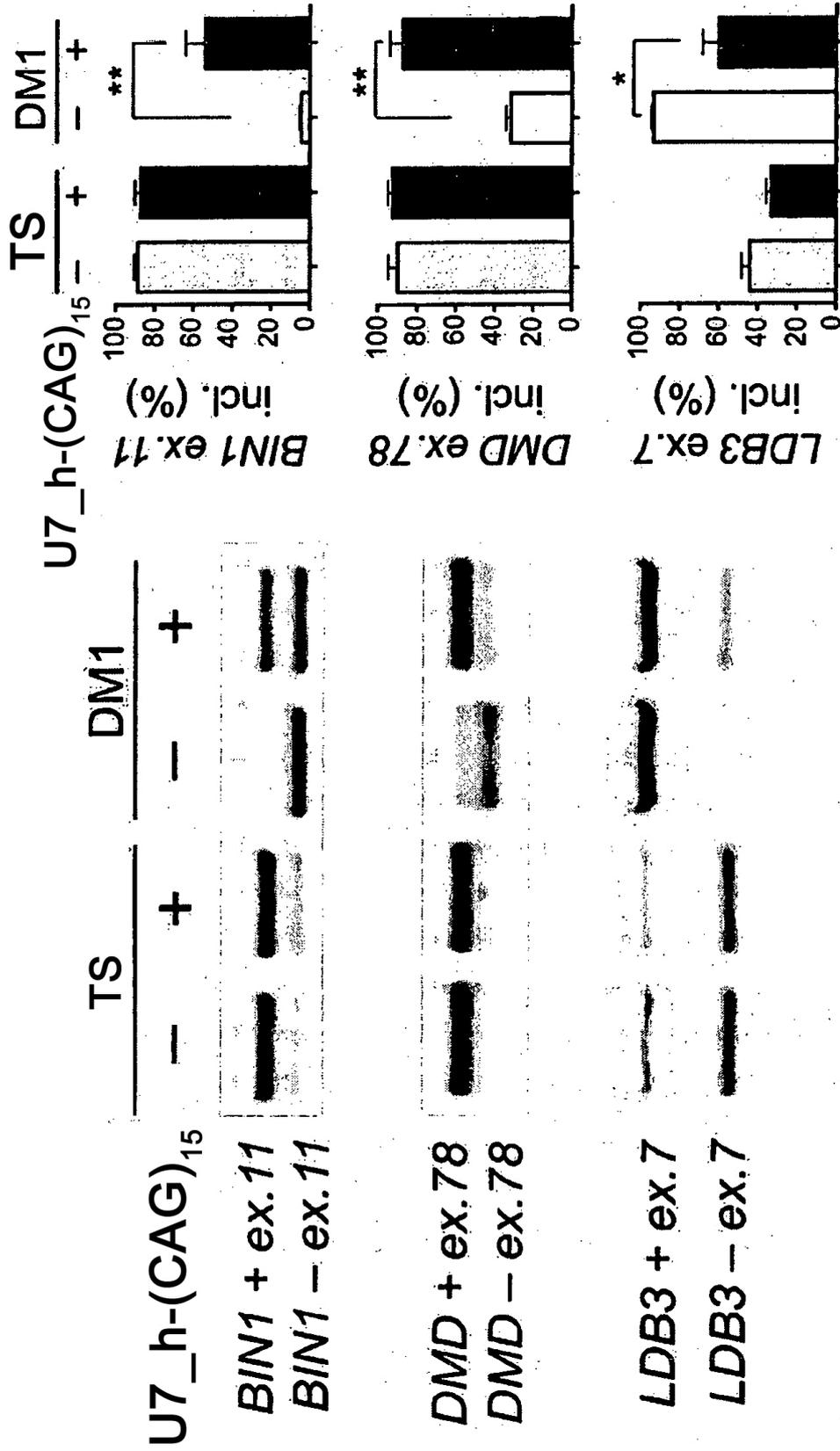


Fig. 2c

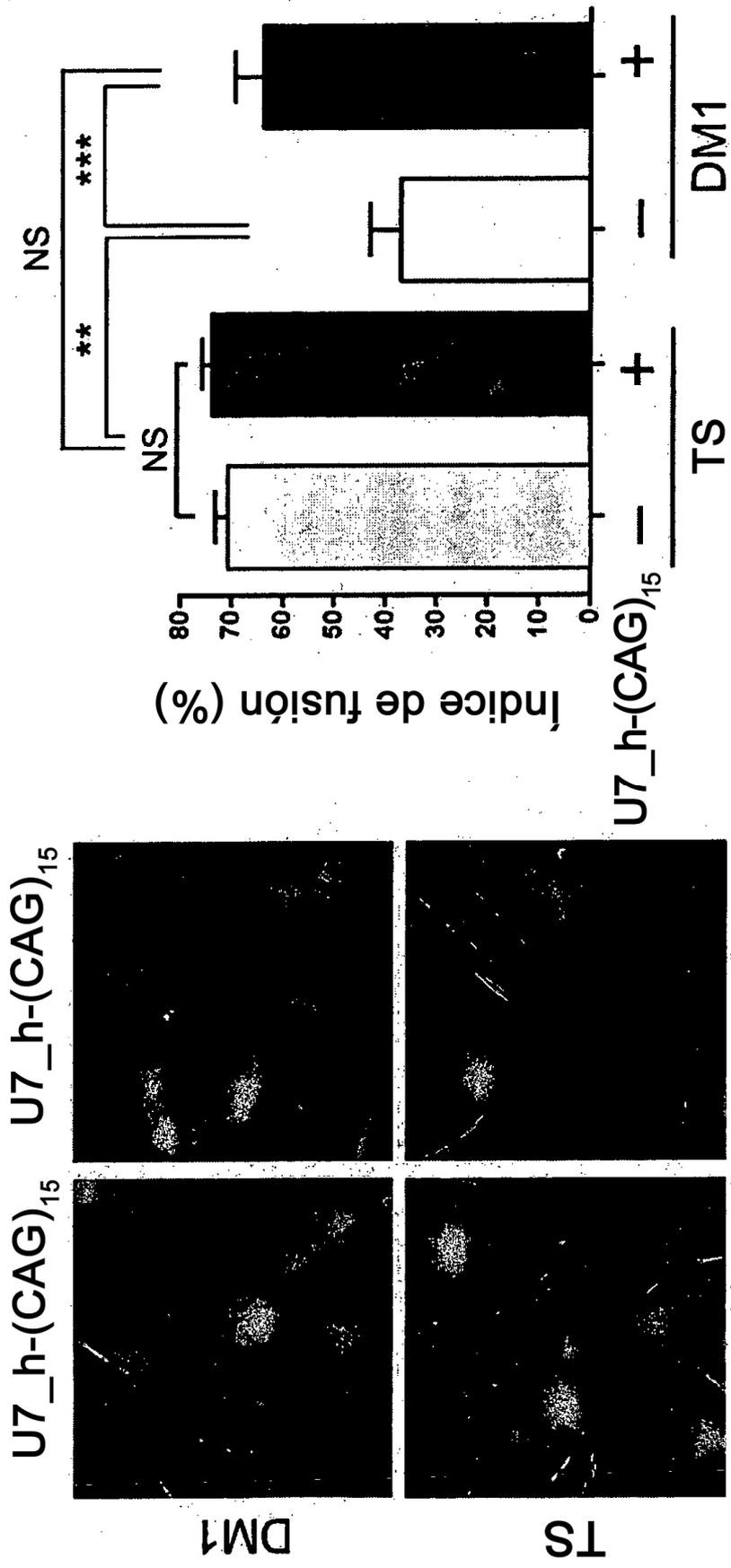


Fig. 2d

TACTGCCGAATCCAGGTCCTCCGGGCT
TAACAACAACGAAGGGGCTGTGACTG
GCTGCTTTCTCAACCAATCAGCACCGA
ACTCATTTGCATGGGCTGAGAACAAAT
GTTCCGGAACCTAGAAATGAATGACT
TAAGTAAGTTCCTTAGAATAATTTTTC
CTACTGAAAGTTACCACATGCGTCGTT
GTTTATACAGTAATAGGACAAAGAAAA
AGTCACCTAAGCTCACCCCTCATCAATT
GTGGAGTTCCTTATATCCCATCTTCTC
TCCAAACACATACGCACAGCAGCAGC
AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA
GCAGCAGCAGCAATTTTGGAGTAGGC
TTTCTGGCTTTTACC GGAAAGCCCT
CTTATGATGTTTGTGGCCAATGATAGAT
TGTTTTCACTGTGC AAAAATTATGGGTA
GTTTTGGTGGTCTTGATGCAGTTGTAA
GCTTGGAG

Fig. 3

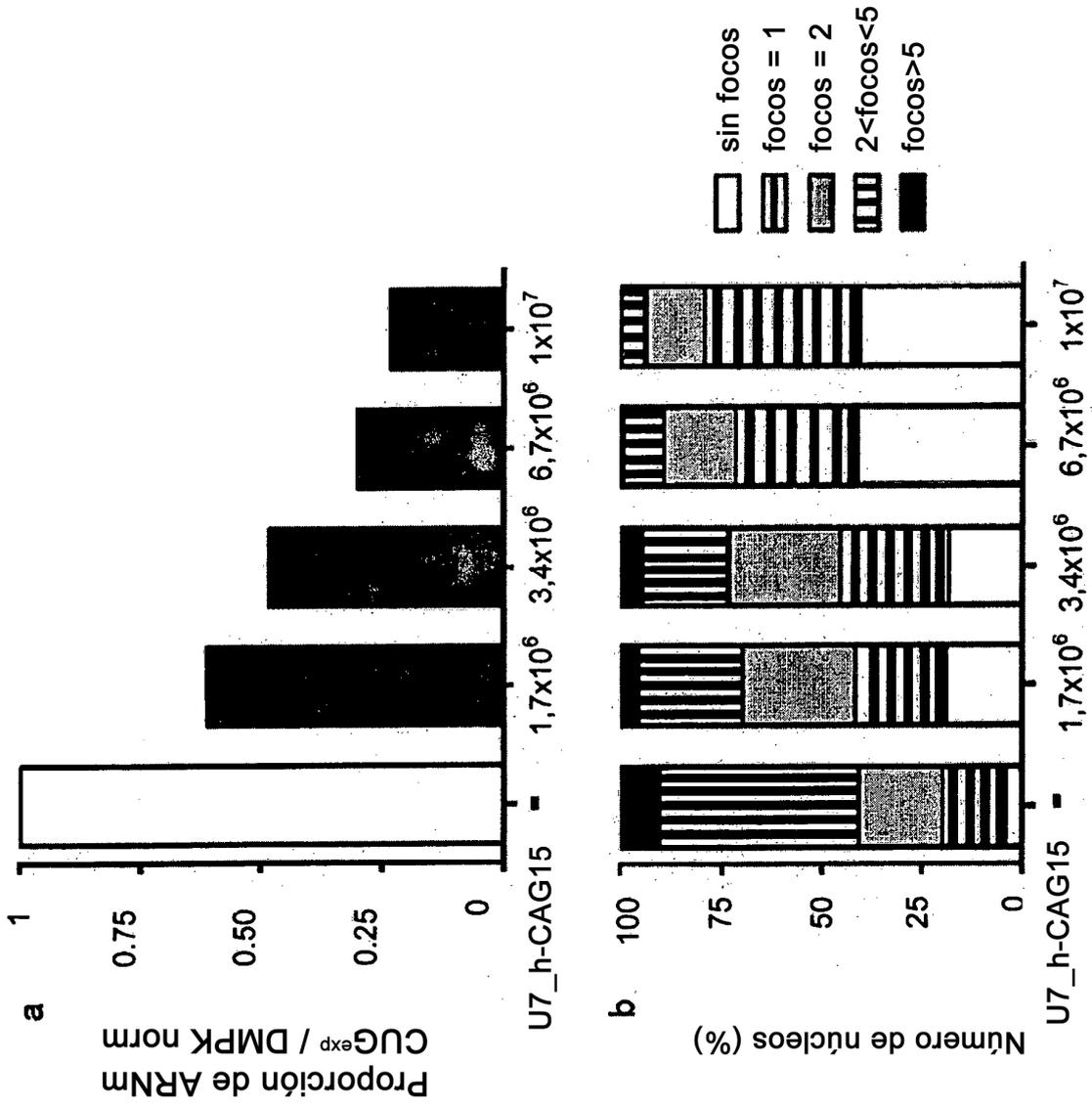


Fig. 4

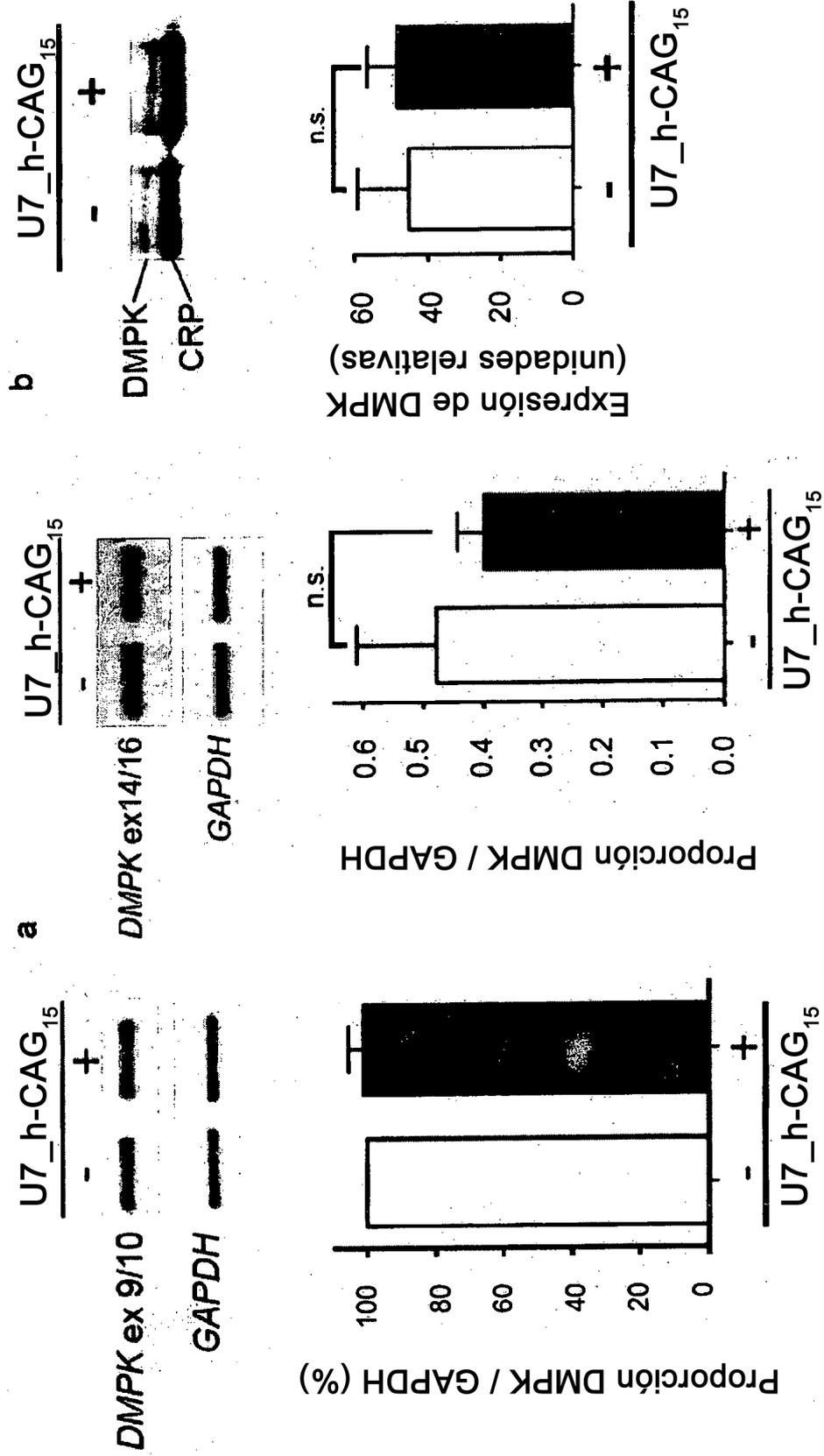


Fig. 6

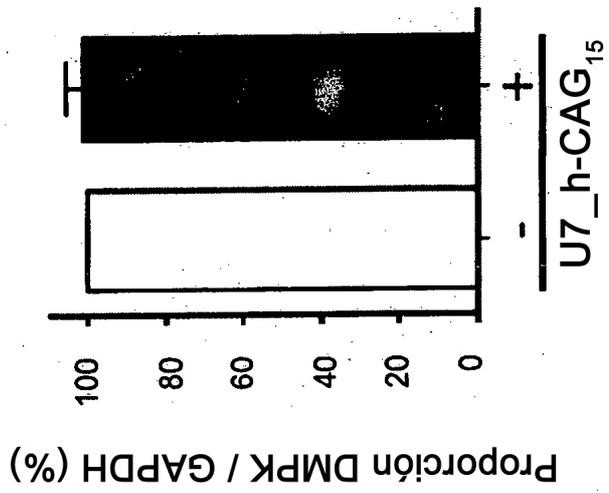


Fig. 5

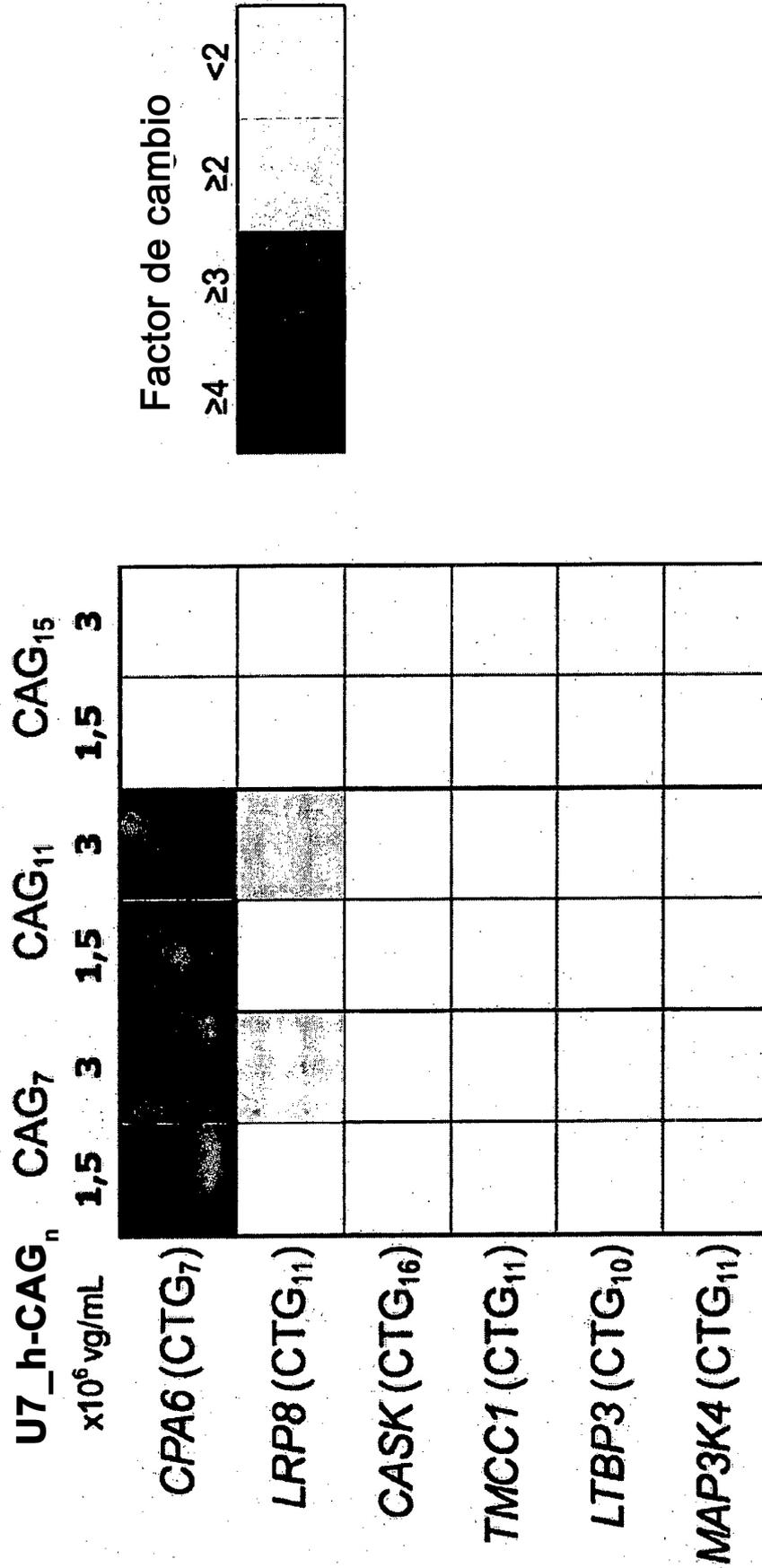


Fig. 7

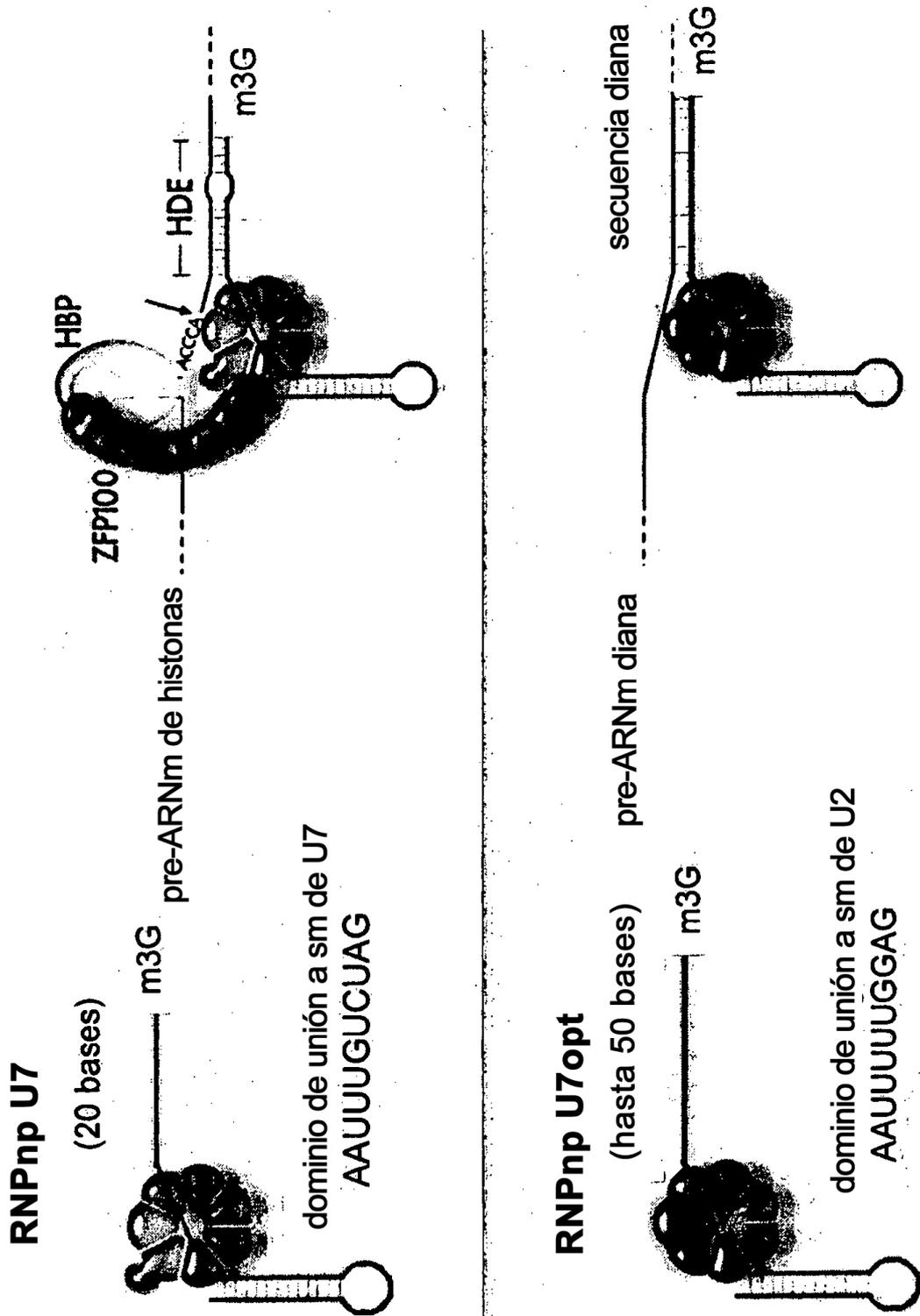


Fig. 8

Construtto	Rescate de distrofina	Dominio kissing	Construtto	Kissing tras la mutagénesis	Rescate de distrofina
AAV[SD23]	X	X	AAV[SD23] Antes de mutación: X	✓ ...GAAAC...	✓
AAV[BP22-SD23]	✓	✓	AAV[BP22-SD23] Antes de mutación: ✓	X ...AAGUUC...	X
AAV[SD23-BP22]	X	X	AAV[SD23-BP22] Antes de mutación: X	✓ ...GAAAC...	✓
			AAV[SD23-BP22] ^{Res} Antes de mutación: ✓	X ...GAAAC...	X

Fig. 10