

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 477**

51 Int. Cl.:

C07K 14/78 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2009 E 09802455 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2320952**

54 Título: **Moléculas de corte y empalme en trans de pre-ARNm (RTM) mejoradas y sus usos**

30 Prioridad:

30.07.2008 EP 08013671

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

11.08.2016

73 Titular/es:

**BAUER, JOHANN (100.0%)
Reisenbergerstrasse 18
5020 Salzburg, AT**

72 Inventor/es:

MITCHELL, LLOYD, G.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 579 477 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

Moléculas de corte y empalme en *trans* de pre-ARNm (RTM) mejoradas y sus usos

La presente invención se refiere a moléculas de molécula de corte y empalme en *trans* de pre-ARNm (RTM, del inglés *pre-mRNA trans-splicing molecule*) mejoradas notablemente que están diseñadas para corregir genes defectuosos específicos expresados en las células diana y que están asociadas con la epidermólisis ampollosa, la fibrosis quística, la paquioniquia congénita y enfermedades autoinmunitarias, tales como psoriasis y neurodermitis, así como cánceres de la piel. En particular, las RTM de la presente invención están modificadas genéticamente para interactuar con un pre-ARNm diana específico expresado en las células objetivo con el fin de dar lugar a un tratamiento diversos trastornos de la piel diferentes y trastornos de otros epitelios.

Las composiciones de la invención incluyen además ácidos nucleicos recombinantes y sistemas de vectores capaces de expresar las RTM de la invención y las células que expresan dichas RTM. Los procedimientos tal como se han divulgado abarcan poner en contacto las RTM de la invención con pre-ARNm diana específico expresado en las células objetivo en condiciones en las que una parte de la RTM se somete a corte y empalme en *trans* respecto a una porción del pre-ARNm diana para formar una molécula de ARN quimérico en la que el defecto genético en el gen específico se ha corregido. La presente invención se basa en el éxito *del corte y empalme* en *trans* del pre-ARNm de un gen de mamífero seleccionado del grupo de CFTR, integrinas, TNF-alfa, interleucinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas, calicreínas, metaloproteinasas de la matriz, queratinas, colágenos, y lamininas, estableciendo de ese modo la utilidad *del corte y empalme* en *trans* para la corrección de enfermedades de la piel. Las composiciones de la presente invención se pueden utilizar en la terapia génica para el tratamiento de trastornos específicos de la piel y otros epitelios del cuerpo humano, tales como la epidermólisis ampollosa, la fibrosis quística, la paquioniquia congénita, y enfermedades autoinmunitarias, tales como psoriasis o neurodermitis, como así como cánceres de la piel.

Antecedentes de la invención

El uso del ARN como objetivo está emergiendo como una poderosa alternativa a las terapias de reemplazo de genes convencionales para el tratamiento de trastornos genéticos. Aunque se trata de un campo emergente, la modificación del ARN tiene la posibilidad de evitar algunos de los inconvenientes de los procedimientos de terapia génica convencionales, incluyendo: (i) baja eficiencia de la transferencia de genes; (ii) limitaciones de tamaño del transgén, específicamente la incapacidad para liberar loci de tamaño genómico; (iii) mutagénesis por inserción y acontecimientos asociados con la integración; y (iv) respuestas inmunitarias y toxicidad debida a los vectores. Por otra parte, algunas situaciones de enfermedad podrían ser más susceptibles de corrección mediante ARN como diana, tales como enfermedades autosómicas dominantes, en las que la introducción de un gen funcional no aborda la expresión del transcrito mutante dominante.

Del mismo modo, en los trastornos de procesamiento del ARN, tales como corte y empalme aberrante, puede ser preferible reparar el patrón de corte y empalme endógeno, que también podría corregir múltiples isoformas alternativas.

Más importante aún, el ARN como objetivo tiene un potencial único para la modificación terapéutica de los transcritos de ARNm nativos en un entorno regulatorio normal. El potencial de tales enfoques varía desde la eliminación del ARNm en cuestión a la modificación del producto de ARNm maduro mediante la eliminación o adición de elementos naturales o exones y para la reparación del transcrito de ARNm mediante la adición de elementos de ARNm extraños para crear un producto génico quimérico.

La aparición de corte y empalme en *trans* del ARN ha permitido el desarrollo de procedimientos para la reparación de defectos genéticos en el transcrito de ARNm maduro. *El corte y empalme* en *trans* es un proceso natural, aunque es raro en mamíferos, que implica el corte y empalme entre dos ARNm transcritos por separado de tal manera que se produce un transcrito compuesto. La manipulación de este proceso ofrece el potencial de inducción de desplazamiento de isoforma o la corrección de mutaciones dominantes mediante la conversión en un producto génico de tipo silvestre.

Las metodologías más habituales en uso actualmente son el corte y empalme en *trans* del ARN mediado por espliceosomas (SmaRT) y el corte y empalme en *trans* mediado por ribozimas.

En el enfoque SmaRT, una molécula de corte y empalme en *trans* de pre-ARNm modificada se une específicamente a pre-ARNm diana en el núcleo de tal manera que desencadena un corte y empalme en *trans* en un proceso mediado por el espliceosoma (Puttaraju M, Jamison SF, Mansfield SG, García-Blanco MA, Mitchell LG. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. Nat Biotechnol. 1999;17:246-252). Los componentes principales de las RTM son un dominio de unión, un dominio de corte y empalme, y un dominio codificante. El dominio de unión confiere especificidad de diana, mientras que el dominio de corte y empalme contiene motivos necesarios para que se produzca la reacción de corte y empalme en *trans*. El dominio codificante es portador de parte del ADNc de tipo silvestre, por lo general uno o más exones, que son necesarios para reparar la mutación diana. Esta reparación se consigue típicamente mediante corte y empalme del exón y la posterior retirada de la porción defectuosa del pre-ARNm diana, de manera que se pueda transcribir un producto génico funcional. La

corrección funcional utilizando corte y empalme en *trans* mediado por el espliceosoma se ha notificado en varios modelos de enfermedad preclínicos, incluida la fibrosis quística (FQ) (Liu X, Jiang Q, Mansfield SG, Puttaraju M, Zhang Y, et al. Partial correction of endogenous DeltaF508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. Nat Biotechnol. 2002; 20: 47–52), hemofilia A (Chao H, Mansfield SG, Bartel RC, Hirianna S, Mitchell LG, et al. Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. Nat Med. 2003; 9: 1015–1019), e inmunodeficiencia ligada al cromosoma X (Tahara M, Pergolizzi RG, Kobayashi H, Krause A, Luettich K, et al. Trans-splicing repair of CD40 ligand deficiency results in naturally regulated correction of a mouse model of hyper-IgM X-linked immunodeficiency. Nat Med. 2004; 10: 835–841).

La mayoría de los estudios de corte y empalme en *trans* realizados hasta la fecha se han centrado en la restauración de la sustitución de la parte del transcrito de ARNm que contiene la mutación causante de la enfermedad. No obstante, el corte y empalme en *trans* también tiene la potencial aplicación en el tratamiento de trastornos relacionados con un corte y empalme aberrante. Los resultados en el caso de la SNM humana (*supervivencia de las neuronas motoras*) (Molecular Therapy (2006) 13, S97 253. AAV Delivery of a Trans-Splicing RNA Re-Directs SMN2 Splicing and Results in Increased Full-Length SMN. Tristan H. Coady, Monir Shabab y Christian L. Lorson) y *MAPT* demuestran que SMaRT se puede usar para manipular el corte y empalme alternativo y podría tener una aplicación terapéutica en los trastornos que son una consecuencia del corte y empalme aberrante (Rodríguez-Martin T, Garcia-Blanco MA, Mansfield SG, Grover AC, Hutton M, et al. Reprogramming of tau alternative splicing by spliceosome-mediated RNA trans-splicing: Implications for tauopathies. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102: 15659–15664).

SMaRT tiene varias ventajas sobre la terapia génica convencional. A medida que el gen se repara en lugar de introducirse, la expresión espacial y temporal del gen debería controlarse mediante regulación endógena, de forma tal que la expresión proteica se asemeja a la de los individuos normales. Dado que la reparación solo se producirá cuando se expresa el transcrito diana, no se prevenirían efectos adversos en las células que no eran objetivo específico durante la liberación. El corte y empalme en *trans* también se puede abordar trastornos autosómicos dominantes. A medida que el nivel de transcritos reparados aumenta, cabría esperar que el nivel del transcrito mutante disminuyera, lo que la sustitución génica no aborda.

Otra ventaja es que dado que solo un fragmento del gen tiene que reemplazarse, las construcciones de RTM se acomodan fácilmente en los sistemas de vectores actuales.

Epidermólisis ampollosa (EA) es el término aplicado a un grupo heterogéneo de trastornos hereditarios de la piel en los que un traumatismo menor conduce a la formación de ampollas en la piel y las membranas mucosas. Dependiendo del nivel de escisión tisular, la EA se puede dividir en tres grupos principales: (i) EA simple con formación de ampollas que se producen en los queratinocitos basales, (ii) EA de la unión (EAU) con formación de ampollas en la lámina lúcida y (iii) EA distrófica con formación de ampollas por debajo de la lámina densa.

Los pacientes de EAU se dividen en dos grupos principales, EAU de Herlitz y EAU generalizada atrófica benigna (EAGAB). Los pacientes diagnosticados con la primera enfermedad normalmente mueren en el primer año de vida, mientras que el último diagnóstico se asocia con un mejor pronóstico y una tendencia a mejorar durante la vida. A las observaciones iniciales que describen una expresión reducida del antígeno penfigoide ampolloso 2 (BPAG2), identificado como colágeno de tipo XVII, en pacientes que sufren EAGAB les siguió la identificación de mutaciones en el gen que codifica BPAG2 (Col17A1). Hasta la fecha, se han identificado una serie de mutaciones diferentes en el Col17A1 que conducen a la creación de una base de datos de mutaciones, lo que ha facilitado el análisis de los efectos de mutaciones específicas en la presentación clínica de la EAU-nH. Por ejemplo, se ha determinado que las mutaciones en el codón de terminación o las mutaciones que conducen a codones de terminación aguas abajo en ambos alelos están asociadas con el fenotipo original de la "EAGAB".

Además, los pacientes con EA simple con distrofia muscular de inicio tardío (EAS-DM) se han caracterizado por mutaciones en el gen de la plectina. Algunos de estos pacientes presentan heterocigosidad de compuesto para una inserción de tres pares de bases en la posición 1287 (1287ins3) que conduce a la inserción de leucina, así como una mutación de sentido erróneo, Q1518X, que produce la inserción de un codón de terminación en la región de codificación de la plectina (Bauer, JW et al., 2001 Am JPathol 158: 617–625).

Existen diversos procedimientos diferentes para reemplazar o reparar los genes diana en la terapia génica, en función de las anomalías genéticas subyacentes. Los enfoques actuales incluyen la sustitución de genes, la corrección de genes, el silenciamiento de genes, y la selección de genes como diana (Zahid y Brownell 2007). En el caso de la sustitución génica de mutaciones recesivas de pérdida de función mediante la simple reintroducción de una copia silvestre funcional de este gen mediante inserción viral o no viral puede ser suficiente para la corrección (Khavari P.A., Rollman O., & Vahlquist A. (2002) Cutaneous gene transfer for skin and systemic diseases. Journal of Internal Medicine 252, 1–10.). Recientemente, con terapia génica *ex vivo* se trató con éxito a un paciente con EA de la unión mediante la transducción del ADNc respectivo portado por un vector viral (Mavilio F. et al. (2006) Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. Nature Medicine 12, 1397–1402). Este estudio demuestra la viabilidad de los enfoques de complementación del ADNc en los casos de las mutaciones defectivas. Sin embargo, la suplementación con un gen altamente expresado y funcional es inadecuada para neutralizar las mutaciones dominantes negativas de ganancia de función. Se han desarrollado

estrategias prometedoras para superar este problema (Laimer M. et al. (2006) Current approaches to cutaneous gene therapy. *Expert Rev. Dermatol.* 1, 833–853. 2006).

En la terapia génica de la piel, la mayoría de los esfuerzos realizados hasta la fecha han intentado liberar copias de ADNc de longitud completa del gen afectado usando vectores retrovirales. Sin embargo, la liberación del ADNc de longitud completa en la terapia de la piel a menudo está limitada por el tamaño del ARNm (o del ADNc), por ejemplo, el ARNm de la plectina tiene 14,8 kb, el ARNm del colágeno de tipo VII tiene 9,2 kb y el ARNm del colágeno de tipo XVII tiene 6,5 kb. El tamaño de estos genes, mutados en pacientes con diversas formas de EA, y de sus elementos reguladores está más allá de la capacidad de los sistemas de liberación adecuados para la terapia génica de la piel utilizando vectores virales o adenoasociados o retrovirales. Por lo tanto, sería ventajoso reducir el tamaño de la secuencia terapéutica que tiene que liberarse.

También es fundamental que los genes implicados en los trastornos cutáneos con formación de ampollas y seleccionados como diana para la terapia génica solo se expresen en los queratinocitos de una capa epidérmica específica. Por ejemplo, la expresión ectópica de tales genes puede conducir a alteraciones en la polaridad epitelial. Una posible forma de abordar el problema de la expresión específica de los queratinocitos es el uso de elementos reguladores específicos para dirigir la expresión del transgén. Sin embargo, el uso de tales promotores aumenta aún más el tamaño del inserto en un vector terapéutico.

Para el gen Col17A1, se han descrito enfoques alternativos para la corrección de genes. En particular, existen mecanismos naturales por los que se han corregido las mutaciones en el gen Col17A1, lo que valida el concepto de terapia génica. Por ejemplo, Jonkman et al., (1997, *Cell* 88:543–551) informaron sobre un paciente que tenía manchas en la piel de aspecto normal en un patrón simétrico similar a una hoja en las extremidades superiores. Las mutaciones que subyacen en el gen Col17A1 se habían identificado como R1226X por vía paterna y como 1706delA, por vía materna. En las zonas clínicas no afectadas de la piel, aproximadamente el 50% de las células basales estaban expresando colágeno de tipo XVII a un nivel reducido debido a una conversión génica mitótica que rodea a la mutación materna, lo que conduce a la pérdida de heterocigosidad en esta área. Estas observaciones sugieren que la expresión de menos del 50 % del colágeno de tipo XVII de longitud completa es suficiente para corregir la expresión fenotípica de la EA-nH. Además, una corrección génica parcialmente satisfactoria mediante la maquinaria de corte y empalme de los queratinocitos se ha descrito en pacientes con la mutación homocigota R785X en el gen Col17A1 (Ruzzi L et al., 2001 *J. Invest Dermatol* 116: 182–187). En estos pacientes, la exclusión del exón 33, que alberga la mutación, conduce a un fenotipo leve inusual, aunque solo hay un 3-4 % de proteína de colágeno de tipo XVII detectable. Similar en la omisión de exones en el marco se ha notificado también en pacientes con mutaciones en los genes Col17A1 y LAMB3.

Se ha notificado reparación de ARN funcional mediante SMaRT en diversos estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. En cada uno de estos estudios, una RTM portadora de una porción del ADNc de longitud completa y un dominio de unión diseñado para apuntar a un intrón específico en el pre-ARNm endógeno se utilizó para la corrección de un trastorno genético. La prueba del principio para la reparación del ARNm mediante corte y empalme en *trans* la ha presentado Liu et al., y muestra corrección funcional de la mutación del regulador predominante de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) $\Delta F508$ en un modelo *in vitro* (Liu, X, M. Luo, L.N. Zhang, Z. Yan, R. Zak, W. Ding, G.S. Mansfield, L.G. Mitchell, y J.F. Engelhardt. Spliceosome-Mediated RNA Trans-splicing with rAAV Partially Restores CFTR Function to Polarized Human CF Airway Epithelial Cells. *Human Gene Therapy* 16(9):1116–23, 2005). La viabilidad de SMaRT para su uso en la terapia génica de la piel se ha establecido en el laboratorio de los presentes inventores en un sistema e transfección doble para la mutación 4003delTC bien caracterizada en el gen del colágeno de tipo XVII en los queratinocitos humanos normales y una línea celular de EAGAB inmortalizada (Dallinger G. et al. (2003) Development of spliceosome-mediated RNA trans-splicing (SMaRT) for the correction of inherited skin diseases. *Experimental Dermatology* 12, 37–46). Con este enfoque, los inventores han demostrado que los queratinocitos son capaces de producir corte y empalme en *trans*. Adicionalmente, Wally et al. han demostrado recientemente que el corte y empalme en *trans* en el gen de la plectina en fibroblastos de pacientes aumentó el nivel de la proteína plectina funcional en un 58 % *in vitro* (Wally V. et al. (2008) 5' trans-splicing repair of the PLEC1 gene. *J. Invest Dermatol.* 128, 568–574). Además de los informes de éxito de la utilidad de SMaRT como tecnología de reparación del ARN *in vitro*, la corrección funcional usando corte y empalme en *trans* se ha demostrado en varios modelos preclínicos de enfermedades humanas, tal como fibrosis quística (Puttaraju M. et al. (2001) Messenger RNA repair and restoration of protein function by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Molecular Therapy* 4, 105–114), hemofilia A (Chao H. et al. (2003) Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat. Med.* 9, 1015–1019), e inmunodeficiencia ligada al cromosoma X (Tahara M. et al. (2004) Trans-splicing repair of CD40 ligand deficiency results in naturally regulated correction of a mouse model of hyper-IgM X-linked immunodeficiency. *Nat. Med.* 10, 835–841).

Las patentes de EE.UU. números 6.083.702, 6.013.487, 6.280.978, 7.399.753 y EP 0 883 344 describen el uso de RTM para mediar en una reacción de corte y empalme en *trans* poniendo en contacto un precursor de ARNm diana para generar nuevos ARN quiméricos.

El documento WO 2004/006678 describe moléculas de RTM específicas diseñadas para corregir genes defectuosos específicos expresados dentro de las células de la piel y asociados con trastornos de la piel. Las RTM específicas se pueden usar para tratar diversos trastornos de la piel diferentes, tales como genodermatosis, incluyendo trastornos

de la fragilidad epidérmica, trastornos de queratinización, trastornos del cabello, trastornos de la pigmentación y cánceres.

El documento US2003/0027250 describe moléculas pre-corte y empalme en *trans*. La reacción de corte y empalme en *trans* in vivo proporciona un nuevo ARNm que es funcional como ARNm o codifica una proteína que se va a expresar en las células diana. El producto de expresión del ARNm es una proteína de valor terapéutico para la célula u organismo huésped o una toxina que provoca la muerte de las células específicas o una proteína nueva que normalmente no está presente en dichas células. Se divulgan PTM que se han modificado genéticamente para la identificación de límites exón/intrón de moléculas de pre-ARNm utilizando un procedimiento de marcaje del exón.

A pesar de los avances en el campo de las moléculas RTM y aunque la cotransfección de minigenes como diana y RTM ha obtenido niveles razonables de *corte y empalme en trans in vitro*, para el pre-ARNm endógeno o el pre-ARN expresado de forma estable *in vivo*, la eficiencia del corte y empalme es menor.

Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar nuevas moléculas de RTM específicas mejoradas marcadamente que están diseñadas para corregir genes defectuosos específicos expresados en las células diana y que están asociadas con la epidermólisis ampollosa, la fibrosis quística, la paquioniquia congénita y enfermedades autoinmunitarias, tales como psoriasis y neurodermitis, así como cánceres de la piel. Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar procedimientos más mejorados para el tratamiento de trastornos de la piel, tales como epidermólisis ampollosa, fibrosis quística, paquioniquia congénita, y enfermedades autoinmunitarias, tales como psoriasis o neurodermitis, así como cánceres de la piel, basados en RTM.

En un primer aspecto de la presente invención, este objeto se resuelve proporcionando una molécula de corte y empalme en *trans* (RTM) de pre-ARNm que comprende a) al menos un dominio de unión dirigido a la unión de la molécula de ácido nucleico a un pre-ARNm expresado dentro de una célula, en el que dicho o dichos dominios de unión consisten en una o más secuencias que son complementarias a una secuencia de exón de un gen de mamífero; b) al menos un dominio de corte y empalme que contiene motivos necesarios para que se produzca la reacción de corte y empalme en *trans* y c) al menos un dominio codificante, en el que dicho dominio codificante codifica al menos un exón de un gen de mamífero seleccionado del grupo de CFTR, integrinas, TNF-alfa, interleucinas, la supefamilia de las inmunoglobulinas, calicreínas, metaloproteinasas de la matriz, queratinas, colágenos y lamininas.

El diseño general, la construcción y modificación genética de las RTM y la demostración de su capacidad para mediar con éxito en las reacciones de corte y empalme en *trans* mediadas por espliceosoma dentro de la célula se describen con detalle en las patentes de Estados Unidos n.º 6.083.702, 6.013.487, 7.399.753 y 6.280.978, así como solicitudes de patente con los números de serie de Estados Unidos 09/756.095, 09/756.096, 09/756.097 y 09/941.492.

En resumen, se diseña una molécula de RTM para portar un dominio de unión (DU) complementario a una secuencia de exón de mamífero, y en orientación antisentido con la misma, del pre-ARNm diana, para suprimir el corte y empalme en *cis* diana al tiempo que potencia el corte y empalme en *trans* entre la RTM y la diana (Mansfield et al. 2000). Una molécula de RTM además consiste en un dominio de corte y empalme que comprende una secuencia del punto de ramificación (PR) conservado fuerte, un tracto de polipirimidina (TPP) y un sitio de corte y empalme aceptor en 3' (ss). Una secuencia espaciadora separa el dominio de corte y empalme del dominio de unión diana. Y, por último, una RTM comprende un dominio codificante con la parte de la secuencia de codificación silvestre que se va a someter a corte y empalme en *trans* al pre-ARNm diana (Figura 2). El dominio codificante puede ser un único exón, varios exones o una secuencia de codificación completa.

El DU aporta especificidad al corte y empalme en *trans* a través de la unión específica al pre-ARNm diana endógeno, mientras que los dominios de corte y empalme y de codificación proporcionan motivos consenso esenciales reconocidos por el espliceosoma y hacen que realmente se produzca la reacción de corte y empalme en *trans*. El uso de DU y de TPP sigue las secuencias consenso que son necesarias para la realización de la reacción de transferencia de dos fosforilos implicada en el corte y empalme en *cis* y, posiblemente, también en el corte y empalme en *trans* (Kramer 1996). Estas reacciones, catalizadas por el espliceosoma, deben escindir los intrones con precisión con el fin de producir ARNm funcionales. De una manera similar a los procesos de corte y empalme en *cis* del ARN, las secuencias del dominio de unión y del dominio de corte y empalme del ARN de la RTM se escinden después del corte y empalme en *trans* y no quedan retenidas en los productos de ARNm final reprogramados.

Los procedimientos de la invención abarcan poner en contacto las RTM de la invención con un pre-ARNm diana en condiciones en las que una porción de la RTM se somete a corte y empalme en *trans* a una porción del pre-ARNm diana para formar una nueva molécula de ARN que después se procesa para formar ARNm que funciona para expresar dicho ARNm diana.

El dominio de unión diana de la RTM aporta a la RTM una afinidad de unión por el pre-ARNm diana. Como se usa en el presente documento, un dominio de unión diana se define como cualquier molécula, es decir, nucleótido, proteína, compuesto químico etc., que confiere especificidad de unión y ancla el pre-ARNm cerca en el espacio a la RTM sintética de modo que la maquinaria de procesamiento del espliceosoma del núcleo puede producir corte y

empalme en *trans* de una porción de la RTM sintética a una porción del pre-ARNm.

La RTM puede contener varios dominios de unión que son complementarios a la región diana del pre-ARNm diana seleccionado y están en orientación antisentido de la misma. Los dominios de unión a la diana pueden comprender hasta varios miles de nucleótidos. En realizaciones preferidas de la invención, los dominios de unión pueden comprender al menos de 10 a 30 y hasta varios cientos o más de nucleótidos. La especificidad de la RTM puede aumentarse significativamente aumentando la longitud del dominio de unión a la diana. Por ejemplo, el dominio de unión a la diana puede comprender varios cientos de nucleótidos o más. La complementariedad absoluta, aunque se prefiere, no es necesaria. Una secuencia "complementaria" a una porción de un ARN, como se hace referencia en el presente documento, significa una secuencia que tiene suficiente complementariedad como para ser capaz de hibridar con el pre-ARNm diana y formar un dúplex estable. La capacidad para hibridar dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). En general, cuanto más largo es el ácido nucleico que hibrida, más apareamientos erróneos de bases con un ARN puede contener y aún formar un dúplex estable. Un experto en la técnica puede determinar un grado tolerable de apareamiento erróneo o la longitud del dúplex mediante el uso de procedimientos estándar para determinar la estabilidad del complejo hibridado.

En la RTM de acuerdo con la presente invención, dicho dominio de unión es complementario a una secuencia de exón de un gen de mamífero.

Se ha demostrado, en el contexto de la presente invención y en contraste con el conocimiento actual y como se destaca en el estado de la técnica, tal como en el documento WO 00/009734, que la unión a las regiones exónicas de un gen, es decir, un dominio de unión dirigido a una secuencia exónica de un gen (como se muestra para los genes PLEC1 y COL17A1, ejemplo 3) se puede lograr con una eficiencia superior a la unión a regiones intrónicas. De este modo, los experimentos en los que usan los genes PLEC1 y COL17A1 proporcionan una prueba de concepto de que las secuencias exónicas proporcionan puntos de partida potentes y eficaces para un diseño y el uso de PTM de acuerdo con la presente invención.

Las RTM de la invención pueden comprender además una o más regiones espaciadoras para separar el sitio de corte y empalme del ARN desde el dominio de unión a la diana.

La unión también se puede conseguir a través de otros mecanismos, por ejemplo, a través de la formación de una triple hélice, interacciones de los aptámeros, interacciones de los anticuerpos o interacciones de las proteínas/ácidos nucleicos tales como aquellas en las que la RTM se ha modificado para reconocer una proteína de unión al ARN específica, es decir, una proteína unida a un pre-ARNm diana específico.

Las moléculas RTM en 3' también contienen una región de corte y empalme en 2' que incluye una secuencia del punto de ramificación y un "sitio AG aceptor de corte y empalme en 3' y/o un sitio donante de corte y empalme en 5'. La región de corte y empalme en 3' puede comprender además un tracto de polipirimidina. Las RTM en 5' contienen una región del sitio de corte y empalme en 5', que incluye un sitio donante de corte y empalme GU. Las secuencias consenso para el sitio donante de corte y empalme en 5' y la región de corte y empalme en 3' usadas en el corte y empalme del ARN son bien conocidas en la técnica (véase, Moore, et al., 1993, The RNA World, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 303-358). Además, en la práctica de la invención se pueden usar secuencias consenso modificadas que mantienen la capacidad para funcionar como sitios de corte y empalme donantes en 5' y las regiones de corte y empalme en 3'. Brevemente, la secuencia consenso del sitio de corte y empalme en 5' es AG/GURAGU (en la que A = adenosina, U = uracilo, G = guanina, C = citosina, R = purina y/= el sitio de corte y empalme). El sitio de corte y empalme en 3' consiste en tres elementos de secuencia separados: el sitio de punto de ramificación o de ramificación, un tracto de polipirimidina y la secuencia consenso en 3' (YAG). La secuencia consenso del punto de ramificación en los mamíferos es YNYURAC (Y = pirimidina; N = cualquier nucleótido). La A subrayada es el sitio de formación de la rama. Un tracto de polipirimidina se encuentra entre el punto de ramificación y el aceptor del sitio de corte y empalme y es importante para un uso diferente del punto de ramificación y el reconocimiento del sitio de corte y empalme en 3'. Recientemente se han descrito intrones del pre-ARNm conocidos como intrones dependientes de U12, muchos de los que comienzan con el dinucleótido AU y terminan en el dinucleótido AC. Las secuencias intrónicas dependientes de U12, así como todas las secuencias que funcionan como secuencias donantes/ceptoras de corte y empalme, también pueden usarse para generar las RTM de la invención.

Una región espaciadora para separar el sitio de corte y empalme del ARN del dominio de unión a la diana también pueden incluirse en la RTM. La región espaciadora puede diseñarse para incluir características tales como (i) codones de terminación que funcionarían bloqueando la traducción de cualquier RTM sin cortar y empalmar y/o (ii) secuencias que potencian el corte y empalme en *trans* al pre-ARNm diana.

Durante los experimentos realizados por los inventores en el contexto de la presente invención, se encontró que estos genes son adecuados como dianas eficaces para el corte y empalme en *trans* del pre-ARNm, con el fin de tratar las enfermedades como se ha mencionado en el presente documento. En el contexto de la presente invención, "tratamiento" significará cualquiera de prevención, retraso del brote, reducción de la intensidad de los síntomas de la

enfermedad y/o eliminación de los síntomas de la enfermedad (para curar) en un paciente determinado.

Los procedimientos de la invención abarcan poner en contacto las RTM de la invención con un pre-ARNm diana, en condiciones en las que una parte de la RTM se somete a corte y empalme en el pre-ARNm diana para formar un nuevo ARNm del gen diana, con el fin de corregir el ARN. Como alternativa, se puede formar un pre-ARNmi (véase más adelante), que está diseñado para reducir la expresión de un ARNm diana. Por lo tanto, los procedimientos y composiciones de la invención pueden usarse para tratar enfermedades/patologías asociadas con mutaciones específicas y/o la expresión génica. Por ejemplo, los procedimientos y composiciones de la invención se pueden usar para "corregir" mutaciones o para reducir la expresión de genes asociados con enfermedades de células de la piel, tal como se describe en el presente documento, tales como trastornos proliferativos tales como cáncer. En otra realización preferida, los procedimientos y composiciones de la invención también se pueden usar para reprogramar un gen específico en otro. Como un ejemplo, la adición de exones de la interleucina 10 exones al gen ICAM-1 da dos aspectos de la reprogramación de la expresión génica y, por tanto, el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tal como la psoriasis. Por un lado, un gen esencial para la patogenia de la psoriasis en las células endoteliales está regulado por disminución, al mismo tiempo que el mismo gen ICAM-1 produce una interleucina inmunosupresora. El péptido resultante es un híbrido del exón 1 de ICAM-1 y el exón 2-5 de IL-10. Como otro ejemplo, la adición de HSV-timidina quinasa en MMP-9 permite la mejora del tratamiento de los tumores de la piel (basado en la publicación de Siegele et al. eIF4E-targeted suicide gene therapy in a minimal residual mouse model for metastatic soft-tissue head and neck squamous cell carcinoma improves disease-free survival. J Surg Res. 2008 Jul;148(1):83-9).

Como ya se ha tratado anteriormente, la presente invención proporciona una molécula de corte y empalme en *trans* (RTM) de pre-ARNm, que comprende, como una parte, al menos un dominio codificante, en el que dicho dominio codificante codifica al menos un exón de un gen de mamífero seleccionado del grupo de CFTR, integrinas, queratinas, colágenos, y lamininas. La presente invención proporciona además una molécula de corte y empalme en *trans* (RTM) de pre-ARNm, que comprende, como una parte, al menos un dominio codificante, en el que dicho dominio codificante codifica para al menos un exón de un gen de mamífero seleccionado del grupo de CFTR, integrinas, queratinas, colágenos y lamininas, junto con una parte de reprogramación como se ha descrito anteriormente, en la que se pueden usar TNF-alfa, interleucinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas, calicreínas, metaloproteinasas de la matriz como "genes diana", así como fuente de la RTM (por ejemplo, ICAM-1 como diana e interleucina-10 como RTM; MMP-9 como diana y HSV timidina quinasa como RTM).

Se prefiere el uso de una RTM de la presente invención derivada de plectina, colágenos y queratinas para el tratamiento de la epidermolisis ampollosa y enfermedades relacionadas, tales como la distrofia muscular (véase Pfindner, E.; Uitto, J.: Plectin gene mutations can cause epidermolysis bullosa with pyloric atresia. J. Invest. Derm. 124: 111-115, 2005, y las referencias citadas en la misma, Varki, R.; Sadowski, S.; Uitto, J.; Pfindner, E.: Epidermolysis bullosa. II. Type VII collagen mutations and phenotype-genotype correlations in the dystrophic subtypes. J. Med. Genet. 44: 181-192, 2007, 2007y las referencias citadas en la misma; Jonkman, M. F.; Pas, H. H.; Nijenhuis, M.; Kloosterhuis, G.; van der Steege, G.: Deletion of a cytoplasmic domain of integrin beta-4 causes epidermolysis bullosa simplex. J. Invest. Derm. 119: 1275-1281, 2002, y las referencias citadas en la misma).

También se prefiere el uso de una RTM de la presente invención derivada de CFTR, para el tratamiento de la fibrosis quística.

Las RTM de la presente invención derivadas de calicreínas, y metaloproteinasas de la matriz (tal como MMP9) y pueden estar compuestas de manera tal que funcionen como construcciones para seleccionar dichos genes como diana con el fin de tratar los tumores de la piel y otros tipos de cáncer mediante la introducción de genes de suicidio o de apoptosis (o fragmentos funcionales de los mismos), tal como, por ejemplo, HSV-timidina quinasa. Otros ejemplos de estos genes terapéuticos se describen en la literatura (por ejemplo en Revil T, Shkreta L, Chabot B. Pre-mRNA alternative splicing in cancer: functional impact, molecular mechanisms and therapeutic perspectives Bull Cancer. 2006 Sep 1; 93(9): 909-19.).

Otras RTM preferidas de la presente invención pueden derivar de la queratina 6, 16 o 17 para el tratamiento de la paquioniquia congénita y enfermedades relacionadas. Otras RTM preferidas de la presente invención pueden derivar de la interleucina-10 y 12, y se utilizan para el tratamiento de la psoriasis o la neurodermitis y enfermedades autoinmunitarias relacionadas. Aquí, las RTM están dirigidas preferiblemente a ICAM-1, VCAM-1 y/o TNF-a.

Las RTM preferidas de la presente invención pueden comprender dominios de codificación que codifican uno o más exones que pueden derivar de una o más de las siguientes tablas. En las tablas, los nombres y los números de acceso de la base de datos se facilitan para genes preferidos a partir de los que pueden estar compuestos los exones, tal como están incluidos en las RTM de acuerdo con la presente invención. Como ejemplo, una RTM de la presente invención puede comprender entre 1 y 7 exones del gen KRT17 (número de acceso en la base de datos NM_000422). Las mutaciones u otros defectos en dicho gen están relacionados con la enfermedad paquioniquia congénita (Terrinoni, A.; Smith, F. J. D.; Didona, B.; Canzona, F.; Paradisi, M.; Huber, M.; Hohl, D.; David, A.; Verloes, A.; Leigh, I. M.; Munro, C. S.; Melino, G.; McLean, W. H. I.: Novel and recurrent mutations in the genes encoding keratins K6a, K16 and K17 in 13 cases of pachyonychia congenita. J. Invest. Derm. 117: 1391-1396, 2001). Las construcciones derivadas de las tablas siguientes pueden modificarse, preferentemente, como se

describe más adelante.

5 El experto entenderá que los números de acceso en la base de datos tal como se han indicado pueden contener errores de secuencia y/o errores de secuenciación que requieren una corrección posterior de dicha secuencia. La presente invención pretende abarcar también todas estas correcciones putativas y el experto puede tener en cuenta estas correcciones cuando se trabaja la presente invención. Las secuencias, tal como las proporcionan los números de acceso en la base de datos también se pueden utilizar para buscar secuencias homólogas en el mismo u otro organismo mamífero.

Tabla 1: Bases para las construcciones derivadas de queratinas

Gen	Número de acceso en la base de datos	Tamaño del ADN	Tamaño del ARNm	Exones	ID del gen Entre z	Enfermedad relacionada
KRT1	NM_006121	5,73 kb	2507 pb	9	3848	
KRT10	XM_352919	3,67 kb	1542 pb	9	3858	Epidermólisis
KRT12	NM_000223	5,91 kb	1867 pb	8	3859	Hiperqueratosis; queratosis palmar y plantar; distrofia corneal de Meesmann
KRT13	NM_002274	4,63 kb	1689 pb	7	3860	
KRT14	NM_000526	4,61 kb	1634 pb	8	3861	Epidermólisis ampollosa simple; Dowling–Meara, Koebner
KRT15	NM_002275	5,14 kb	1709 pb	8	3866	
KRT16	NM_005557	2,99 kb	1655 pb	8	3868	Queratodermia palmoplantar no epidermolítica focal Epidermólisis ampollosa simple, Dowling–Meara/Kobner/Web
KRT17	NM_000422	5,116 kb	1498 pb	8	3872	Tipos er–Cockayne
KRT18	NM_000224	3,78 kb	1408 pb	7	3875	
KRT19	NM_002276	4,68 kb	1381 pb	6	3880	
KRT2		7,62 kb	2459 pb	9	3849	
KRT20	NM_019010	9,28 kb	1735 pb	8	54474	
KRT23	NM_015515	14,88 kb	2147 pb	9	25984	
KRT24	NM_019016	5,76 kb	1879 pb	8	19266 6	
KRT25		7,29 kb	1684 pb	8		
KRT26		5,92 kb	1748 pb	8		
KRT27		5,72 kb	1635 pb	8		
KRT28		7,7 kb	1692 pb	8		
KRT3	NM_057088	6,34 kb	2232 pb	9	3850	
KRT31		3,87 kb	1616 pb	7		
KRT32		7,58 kb	2005 pb	7		
KRT33A		4,69 kb	1252 pb	7		
KRT33B		6,3 kb	1621 pb	7		
KRT34		4,72 kb	1713 pb	7		
KRT35		4,45 kb	1688 pb	8		
KRT36		3,73 kb	1688 pb	7		
KRT37		4,3 kb	1718 pb	7		
KRT38		4,98 kb	2837 pb	7		
KRT4	NM_002272	7,25 kb	1824 pb	9	3851	
KRT5	NM_002275	5,14 kb	1709 pb	8		

(continuación)

Gen	Número de acceso en la base de datos	Tamaño del ADN	Tamaño del ARNm	Exones	ID del gen Entre z	Enfermedad relacionada
KRT5	NM_000424	5,88 kb	2301 pb	9	3852	
KRT6A	NM_005554	6,04 kb	2270 pb	9	3853	
KRT6B	NM_005555	5,41 kb	2217 pb	9	3854	
KRT6C	NM_058242	6 kb	2223 pb	9	28688 7	
KRT7	NM_005556	15,76 kb	1702 pb		3855	
KRT71		9,2 kb	2255 pb	9		
KRT72		15,9 kb	1985 pb	9		
KRT73		11 kb	2323 pb	9		
KRT74		8 kb	2799 pb	9		
KRT75		10,2 kb	2125 pb	9		
KRT76		9,1 kb	2513 pb	9		
KRT78		10,03 kb	1785 pb	9		
KRT79		12,85 kb	2144 pb	9		
KRT8	NM_002273	7,85 kb	1746 pb	8	3856	
KRT80		16,2 kb	3411 pb	7		
KRT81		5,6 kb	1925 pb	9		
KRT82		12,44 kb	2681 pb	9		
KRT83		7,09 kb	1883 pb	9		
KRT84		7,8 kb	2404 pb	9		
KRT85		7,52 kb	2508 pb	9		
KRT86		6,6 kb	2108 pb	9		
KRT9	NM_000226	6,21 kb	2287 pb	8	3857	Queratodermia palmoplantar epidermolítica

Tabla 2: Bases para las construcciones derivadas de colágenos

Gen	Exones	ID del gen
COL1A1	51	1277
COL2A1	54	1280
COL3A1	51	1281
COL4A1	45	1282
COL5A1	67	1289
COL6A1	35	1291
COL7A1	118	1294
COL8A1	5	1295
COL9A1	38	1297
COL10A1	3	1300
COL11A1	66	1301
COL12A1	66	1303
COL13A1	39	1305
COL14A1	46	7373
COL15A1	42	1306

(continuación)

Gen	Exones	ID del gen
COL16A1	71	1307
COL17A1	56	1308
COL18A1	42	80781
COL19A1	51	1310
COL20A1	37	57642
COL21A1	29	81578
COL22A1	65	169044
COL23A1	29	91522
COL24A1	60	255631
COL25A1	38	84570
COL26A1	14	136227
COL27A1	61	85301
COL28A1	35	340267
COL29A1	10	256076

Tabla 3: Base para las construcciones derivadas del factor de necrosis tumoral alfa

	Exones	ID del gen	ID en GeneBank
TNF- α	4	7124	NM_000594

5

Tabla 4: Bases para las construcciones derivadas de interleucinas

Interleucina	Exones	ID del gen	ID en GeneBank
1-alfa	7	3552	NM_000575
1-beta	7	3553	NM_000576
1F5	5	26525	NM_173170
1F6	3	27179	NM_014440
1F7	5	27178	NM_014439
1F8	6	27177	NM_014438
1F9	5	56300	NM_019618
1F10	5	84639	NM_173161
2	4	3558	NM_000586
3	5	3562	NM_000588
4	4	3565	NM_000589
5	4	3567	NM_000879
6	5	3569	NM_000600
7	6	3574	NM_000880
8	4	3576	NM_000584
9	5	3578	NM_000590
10	5	3586	NM_000572
11	5	3589	NM_000641
12a	7	3592	NM_000882
12b	8	3593	NM_002187

(continuación)

Interleucina	Exones	ID del gen	ID en GeneBank
13	4	3596	NM_002188
15	6	3600	NM_000585
16	21	3603	NM_172217
17a	3	3605	NM_002190
17b	3	27190	NM_014443
17c	3	27189	NM_013278
17d	3	53342	NM_138284
17f	3	112744	NM_052872
18	6	3606	NM_001562
19	6	29949	NM_153758
20	5	50604	NM_018724
21	5	59067	NM_021803
22	6	50616	NM_020525
23A	4	51561	NM_016584
24	7	11009	NM_006850
25	2	64806	NM_022789
26	5	55801	NM_018402
27 (30)	5	246778	NM_145659
28a	6	282616	NM_172138
28b	5	282617	NM_172139
29	5	282618	NM_172140
31	3	386653	NM_001014336
32	6	9235	NM_004221
33	7	90865	NM_033439
34	6	146433	NM_152456

Tabla 5: Bases para las construcciones derivadas de ICAM/VCAM

ICAM	Exones	ID del gen	ID en GeneBank
1	7	3383	NM_000201
2	4	3384	NM_001099786 Variante del transcrito 1 NM_001099787 Variante del transcrito 2 NM_001099788 Variante del transcrito 3 NM_001099789 Variante del transcrito 4 NM_000873 Variante del transcrito 5
3	7	3385	NM_002162
4	3	3386	NM_001544 Variante del transcrito 1 NM_022377 Variante del transcrito 2 NM_001039132 Variante del transcrito 3
5	11	7087	NM_003259

(continuación)

VCAM	Exones	ID del gen	ID en GeneBank	
1	9	7412	NM_001078	Variante del transcrito 1
	8		NM_080682	Variante del transcrito 2

Tabla 6: Bases para las construcciones derivadas de calicreínas

Calicreína	Exones	ID del gen	ID en GeneBank
KLK1	5	3816	NM_002257
KLK2	5	3817	NM_005551,3
KLK3	5	354	NM_145864
KLK4	6	9622	NM_004917
KLK5	6	25818	NM_012427
KLK6	5	5653	NM_002774
KLK7	6	5650	NM_005046
KLK8	6	11202	NM_007196
KLK9	5	284366	NM_012315
KLK10	6	5655	NM_002776
KLK12 (variante del transcrito 1)	7	43849	NM_019598
KLK12 (variante del transcrito 2)	6		NM_145894
KLK12 (variante del transcrito 3)	5		NM_145895
KLK11	6	11012	NM_006853
KLK13	5	26085	NM_015596
KLK14	8	43847	NM_022046
KLK15	5	55554	NM_017509

5

Tabla 7: Bases para las construcciones derivadas de metaloproteinasas de la matriz

Metaloproteinasa de la matriz	Exones	ID del gen	ID en GeneBank
MMP1	10	4312	NM_002421
MMP2	13	4313	NM_004530
MMP3	10	4314	NM_002422
MMP7	6	4316	NM_002423
MMP8	10	4317	NM_002424
MMP9	13	4318	NM_004994
MMP10	10	4319	NM_002425
MMP11	8	4320	NM_005940
MMP12	10	4321	NM_002426
MMP13	10	4322	NM_002427
MMP14	10	4323	NM_004995
MMP15	10	4324	NM_002428
MMP16	10	4325	NM_005941
MMP17	10	4326	NM_016155
MMP19	9	4327	NM_002429

(continuación)

Metaloproteinasa de la matriz	Exones	ID del gen	ID en GeneBank
MMP20	10	9313	NM_004771
MMP21/MMP23A	7	118856	NM_147191
MMP23b (ex MMP22)	7	8510	NM_006983
MMP24	9	10893	NM_006690
MMP25	10	64386	NM_022468
MMP26	7	56547	NM_021801
MMP27	10	64066	NM_022122
MMP28	9	79148	NM_001032278

Tabla 8: Bases para las construcciones derivadas de lamininas

Laminina	Exones	ID del gen	ID en GeneBank
LAMA1	63	284217	NM_005559
LAMA2	64	3908	NM_000426
LAMA3	38	3909	NM_000227 NM_198129
LAMA4	39	3910	NM_001105209
LAMA5	80	3911	NM_005560
LAMB1	34	3912	NM_002291
LAMB2	32	3913	NM_002292
LAMB3	23	3914	NM_000228
LAMB4	34	22798	XM_209857
LAMC1	28	3915	NM_002293
LAMC2	23	3918	NM_005562
LAMC3	28	10319	NM_006059

5

Tabla 9: Bases para las construcciones derivadas de CFTR

	Exones	ID del gen	ID en GeneBank
CFTR	27	1080	NM_000492

Tabla 10: Bases para las construcciones derivadas de integrinas

Integrinas	Exones	ID del gen	ID en GeneBank	
a1	29	3672	NM_181501	
a2	30	3673	NM_002203	
a2b	30	3674	NM_000419	
a3	26	3675	NM_002204	Variante del transcrito a
			NM_005501	Variante del transcrito b
a4	28	3676	NM_000885	
a5	30	3678	NM_002205	
a6	26	3655	NM_001079818	Variante del transcrito 1

ES 2 579 477 T3

(continuación)

Integrinas	Exones	ID del gen	ID en GeneBank	
			NM_000210	Variante del transcrito 2
a7	25	3679	NM_002206	
a8	30	8516	NM_003638	
a9	28	3680	NM_002207	
a10	30	8515	NM_003637	
a11	31	22801	NM_012211	
ad	30	3681	NM_005353	
ae	31	3682	NM_002208	
al	31	3683	NM_002209	

(continuación)

am	30	3684	NM_000632	
av	30	3685	NM_002210	
aw	9	3686	?	
ax	30	3687	NM_000887	
β1	23	3688	NM_002211	Variante del transcrito 1A
			NM_033666	Variante del transcrito 1B
			NM_033667	Variante del transcrito 1C-1
			NM_033669	Variante del transcrito 1C-2
			NM_033668	Variante del transcrito 1D
			NM_133376	Variante del transcrito 1E
β2	16	3689	NM_000211	
β3	15	3690	NM_000212	
β4	42		NM_000213	Variante del transcrito 1
			NM_001005619	Variante del transcrito 2
			NM_001005731	Variante del transcrito 3
β5	17	3693	NM_002213	
β6	15	3694	NM_000888	
β7	16	3695	NM_000889	
β8	14	3696	NM_002214	

Tabla 11: Bases para las construcciones derivadas de plectina

Plectina	Exones	ID del gen	
	33	NM_000445	Isoforma 1
	33	NM_201378	Isoforma 2
	33	NM_201379	Isoforma 3
	33	NM_201380	Isoforma 6
	33	NM_201381	Isoforma 7

(continuación)

Plectina	Exones	ID del gen	
	33	NM_201382	Isoforma 8
	33	NM_201383	Isoforma 10
	33	NM_201384	Isoforma 11

En la presente invención, el término "homólogo" se refiere al grado de identidad entre secuencias de dos secuencias de ácido nucleico. La homología de secuencias homólogas se determina comparando dos secuencias alineadas en condiciones óptimas sobre las secuencias con las que se han de comparar. Las secuencias que se van a comparar en el presente documento pueden tener una adición o delección (por ejemplo, hueco y similares) en la alineación óptima de las dos secuencias. Tal homología de secuencia se puede calcular mediante la creación de una alineación usando, por ejemplo, el algoritmo ClustalW (Nucleic Acid Res., 22(22): 4673 4680 (1994)). Se puede usar el software de análisis de secuencias disponible habitualmente, más específicamente, Vector NTI, GENETYX, BLAST o herramientas de análisis proporcionadas por las bases de datos públicas, tales como las que se encuentran en, por ejemplo, <http://dragon.bio.purdue.edu/bioinfolinks/>.

Por consiguiente, la presente invención abarca generalmente RTM de acuerdo con la presente invención, en la que las RTM comprenden cualquier combinación de dominio codificante que comprende los exones x a y para el gen respectivo, como se indica en las tablas anteriores, en las que x es un número entero seleccionado de 1 o 2 para el número máximo de exones, e y es un número entero seleccionado de 0 y $x + 1$, en el que $x + 1$ está limitado por el número máximo de los exones de dicho gen.

Como ejemplos preferidos, una RTM derivada de MMP9 (NM_004994, véase la tabla 7) puede comprender un dominio codificante que comprende los exones 1 a 13, o entre 2 y 13 exones del gen (estando $x+1$ limitado por los 13 exones de la MMP9); una RTM derivada de la plectina (NM_000445, véase la tabla 11) puede comprender un dominio codificante que comprende uno o más de los exones 1 a 33, o entre 2 y 33 exones del gen (estando $x+1$ limitado por los 10 exones de plectina, isoforma 1); una RTM derivada de la queratina 14 (NM_000526, véase la tabla 1) puede comprender un dominio codificante que comprende uno o más de los exones 1 a 8, o entre 2 y 8 exones del gen (estando $x+1$ limitado por los 8 exones de la queratina 14); una RTM derivada del colágeno de tipo 7 (ID del gen 1294, véase la tabla 2) puede comprender un dominio codificante que comprende uno o más de los exones 1 a 118, o entre 2 y 118 exones del gen (estando $x+1$ limitado por los 118 exones del colágeno de tipo 7); y una RTM derivada de ICAM-1 (NM_000201, véase la tabla 5) puede comprender un dominio codificante que comprende uno o más de los exones 1 a 7, o entre 2 y 7 exones del gen (estando $x+1$ limitado por los 7 exones de ICAM-1). Como ejemplos adicionales, para el corte y empalme en *trans* en 5', la parte frontal del gen se sustituye, por lo que las RTM puede liberar solo el exón 1, los exones 1 y 2, 1 a 3, de 1 a 4, etc. Para la plectina, el exón 1 se deja fuera, por lo que en este caso la construcción es 2, 2 y 3, 2 a 4, etc. En el caso del corte y empalme en *trans* en 3', solo el exón terminal y puede reemplazarse, lo que lleva a $y + (y-1)$, y a $(y-2)$, y a $(y-3)$, etc. Las RTM de corte y empalme en *trans* doble pueden reemplazar cualquier exón interna o combinaciones de exones.

En una realización preferida de las RTM de acuerdo con la presente invención, dicha RTM comprende al menos un exón, derivado de otros genes, con el fin de proporcionar funcionalidades deseadas adicionales. Los ejemplos preferidos son la introducción de un dominio de unión complementario al intrón 1 de ICAM-1 fusionado a la interleucina-10, o una construcción que comprende una RTM para unirse en el gen de la MMP-9, en el que se introduce la HSV-timidina-quinasa. Después de la adición de, por ejemplo, ganciclovir, se fosforilada y se activa. En otras realizaciones preferidas, el exón comprende codones de terminación de origen natural o introducidos de forma artificial con el fin de reducir la expresión génica o contiene otras secuencias que producen un efecto similar al ARNi.

La RTM de acuerdo con la presente invención, en la que dicho gen se selecciona del grupo de plectina, queratina 14, colágeno de tipo 7, queratina 5, queratina 6, colágeno de tipo 17, laminina A3, laminina B3, g2, integrina 134, a6, CFTR e interleucina-10 (IL-10), preferiblemente al menos una de plectina, queratina 14, colágeno 7A1, colágeno 17a1 e IL-10. Las mutaciones en estos genes se han relacionado con enfermedades de células de la piel como se describe en el presente documento y enfermedades relacionadas. La IL-10 es una interleucina inmunosupresora que puede usarse para tratar enfermedades autoinmunitarias.

Se prefiere adicionalmente una RTM de acuerdo con la presente invención, en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende además al menos una secuencia de seguridad en dicho dominio de corte y empalme. Dicha "seguridad" se incorpora en el espaciador, el dominio de unión, o en otro lugar en la RTM para evitar el corte y empalme en *trans* inespecífico. Esta es una región de la RTM que cubre elementos del sitio de corte y empalme en 3' y/o en 5' de la RTM mediante complementariedad relativamente débil, lo que impide el corte y empalme en *trans* inespecífico. La RTM está diseñada de tal manera que tras la hibridación de la o las porciones de unión/direccionamiento de la RTM, el sitio de corte y empalme en 3' y/o 5' se descubre y se vuelve completamente activo. Dichas secuencias de "seguridad" comprenden uno o más tramos complementarios de secuencia cis (o podría ser una segunda hebra distinta de ácido nucleico) que se une a uno o ambos lados del punto de ramificación

de la RTM, el tracto de pirimidina, el sitio de corte y empalme en 3' y/o el sitio de corte y empalme en 5' (elementos de corte y empalme), o podrían unirse a partes de los propios elementos de corte y empalme. Esta unión de "seguridad" evita que los elementos de corte y empalme sean activos (es decir, bloqueo de la unión de U2 u otros factores de corte y empalme a los elementos de reconocimiento del sitio de corte y empalme de la RTM). La unión de la "seguridad" puede estar alterada por la unión de la región de unión a la diana de la RTM al pre-ARNm diana, exponiendo así y activando los elementos de corte y empalme de la RTM (haciendo que estén disponibles al corte y empalme en *trans* en el pre-ARNm diana).

También se prefiere es una RTM de acuerdo con la presente invención, en la que la unión de la molécula de ácido nucleico al pre-ARNm diana está mediada por complementariedad (es decir, según las características de apareamiento de bases de los ácidos nucleicos), formación de triple hélice (como se describe en, por ejemplo, Suzuki T. Targeted gene modification by oligonucleotides and small DNA fragments in eukaryotes. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:737-44. Review. Dang N, Klingberg S, Marr P, Murrell DF. Review of collagen VII sequence variants found in Australasian patients with dystrophic epidermolysis bullosa reveals nine novel COL7A1 variants. *J Dermatol Sci.* 2007 Jun;46(3):169-78. Review), o interacción proteína-ácido nucleico (como se describe en la literatura respectiva).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una RTM de acuerdo con la presente invención, en la que el exón que se va a someter a corte y empalme en *trans* comprende codones de terminación de origen natural o introducidos artificialmente y/o una estructura formadora de tronco con el fin de proporcionar un efecto de tipo ARNi.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una RTM de acuerdo con la presente invención, en la que las RTM tiene secuencias UTR en 3' o secuencias de ribozima añadidas al extremo 5' o 3'.

Las composiciones de la invención en una realización preferida incluyen moléculas de RTM diseñadas para interactuar con una molécula de pre-ARNm diana natural (en lo sucesivo en el presente documento denominada "pre-ARNm") y participan en una reacción de corte y empalme en *trans* que da lugar a la generación de una nueva molécula de ARN quimérico (en lo sucesivo en el presente documento denominada "pre-ARNmi") capaz de reducir la expresión del ARNm diana. Los procedimientos de la invención abarcan poner en contacto las RTM de la invención con un pre-ARNm diana natural en condiciones en las que una parte de la RTM se somete a corte y empalme con el pre-ARNm natural para formar un nuevo pre-ARNmi. Las RTM de la invención están diseñadas genéticamente para que el nuevo pre-ARNmi resultante de la reacción de corte y empalme en *trans* pueda procesarse adicionalmente para formar un ARNmi activo que tiene actividad de interferencia por un ARNm específico. El ARNm diana específico puede ser el ARNm que normalmente es el resultado del corte y empalme en *cis* del pre-ARNm diana, o, como alternativa, puede ser un ARNm no relacionado. En general, el pre-ARNm diana se elige porque se expresa dentro de un tipo celular específico, de modo que proporciona un medio para dirigir la expresión del nuevo ARN a un tipo de célula seleccionado. Dicha expresión selectiva del pre-ARNmi se puede utilizar para reducir la expresión del pre-ARNm diana en las enfermedades/patologías asociadas a la expresión del ARNm diana.

Se prefiere adicionalmente una RTM de acuerdo con la presente invención que es una molécula de ADN, ARN o híbrido de ADN/ARN. Por lo tanto, en un aspecto adicional de la misma, la presente invención se refiere a un ácido nucleico, que comprende al menos un ácido nucleico que codifica una de las RTM de la presente invención. Preferiblemente, el ácido nucleico consiste en moléculas de ADN, ARN o híbridas de ADN/ARN, en las que el ADN o el ARN es, preferentemente, mono o bicatenario. También están comprendido ARN o ADN, que hibridan con uno de los ARN o ADN mencionados anteriormente preferiblemente en condiciones rigurosas como, por ejemplo, hibridación a 60 °C en 2,5 x tampón SSC y varios lavados a 37 °C a una concentración de tampón inferior como, por ejemplo, 0,5 x tampón SSC y que codifican proteínas que presentan actividad de la fosfatasa del fosfato de lípidos y/o asociación con las membranas plasmáticas. En la técnica se conocen bien reactivos adicionales necesarios para llevar a cabo transferencias Northern o Southern en condiciones rigurosas, por ejemplo, ADN de esperma de salmón de cadena sencilla. También están comprendidas son secuencias de ácidos nucleicos, que están relacionadas con los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención y/o los ácidos nucleicos de hibridación como se ha indicado anteriormente por la degeneración del código genético.

En algunos casos podría ser deseable interferir con, por ejemplo, la transcripción o la traducción de los ácidos nucleicos de la presente invención y, por lo tanto, la presente invención también se refiere a un ácido nucleico, que es complementario al ácido nucleico de la presente invención y, por lo tanto, es capaz de inhibir, por ejemplo, la transcripción o la traducción. Una realización preferida de un ácido nucleico complementario de este tipo es un denominado oligonucleótido anti-sentido (R. Q. Zheng y D. M. Kemeny (1995) *Clin. Exp. Immunol.* 100:380-2, W. Nellen y C. Lichtenstein (1993) *Trends. Biochem. Sci.* 18:419-423 y C. A. Stein (1992) *Leukemia* 6:967-74), ribozimas (M. Amarzguioui y H. Prydz (1998) *Cell. Mol. Life Sci.* 54:1175-1202, N. K. Vaish et al (1998) *Nucleic Acids Res.* 96:5237-5242, Persidis (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:921-922 y L. A. Couture y D. T. Stinchcomb (1996) *Trends Genet.* 12:510-515) y/o las denominadas moléculas de ARN pequeño de interferencia (ARNpi) (S. M. Elbashir et al. (2001) *Nature* 411:494-498). Los oligonucleótidos antisentido tienen en una realización preferida una longitud de al menos 20, preferible de al menos aproximadamente 30, más preferiblemente de al menos aproximadamente 40 y lo más preferiblemente una longitud de al menos aproximadamente 50 ácidos nucleicos.

Los oligonucleótidos son generalmente degradados rápidamente por endonucleasas o exonucleasas, que están presentes en la célula, en particular por ADNasas y ARNasas y, por lo tanto, es ventajoso para modificar los ácidos

nucleicos que se utilizan, por ejemplo, en las estrategias anti-sentido, como ribozimas o ARNpi para estabilizarlos frente a la degradación y de esta manera prolongar el tiempo durante el cual se mantiene una cantidad eficaz del ácido nucleico dentro de la célula (L. Beigelmann et al. (1995) *Nucleic acids Res.* 23:3989–94, documentos WO 95/11910, WO 98/37340 y WO 97/29116). Típicamente, dicha estabilización se puede obtener mediante la introducción de uno o más grupos fosfato internucleotídicos y/o mediante la introducción de uno o más internucleótidos sin fósforo.

Los internucleótidos modificados adecuados se resumen en, por ejemplo, Uhlmann y Peimann (1990) *Can. Rev.* 90:544. Los restos de fosfato internucleotídicos modificados y/o los puentes que no son de fosfato que se pueden usar en un ácido nucleico de la invención comprenden, por ejemplo, metilfosfonato, fosforotioato, fosforamidato, fosforoditionato, éster fosfato, análogos internucleotídicos sin fósforo, que pueden usarse en nucleico ácidos de la invención incluyen, por ejemplo, puentes de siloxano, puentes de carbonato, carboximetiléster, puentes acetamida y/o puentes tioéter.

En una realización preferida de la invención, potenciadores de corte y empalme tales como, por ejemplo, las secuencias denominadas potenciadores del corte y empalme exónico también pueden incluirse en la estructura de las RTM sintéticas. Se ha demostrado que los factores de corte y empalme de transacción, a saber, las proteínas ricas en serina/arginina (SR) que interaccionan con tales potenciadores de corte y empalme exónico y modular el corte y empalme (véase, Tacke et al., 1999, *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:358–362; Tian et al., 2001, *J. Biological Chemistry* 276:33833–33839; Fu, 1995, *RNA* 1:663–680). Por tanto, la RTM incluye, preferentemente, una o más secuencias complementarias a las secuencias del intrón y/o el exón en el pre-ARNm diana. Esto une la RTM al pre-ARNm diana endógeno elegido, de modo que es más probable que el sitio de corte y empalme de la RTM complete una reacción de corte y empalme con un sitio de corte y empalme en el pre-ARNm diana.

Se pueden añadir características adicionales a la molécula de RTM, tales como señales de poliadenilación para modificar la expresión/estabilidad del ARN o secuencias de corte y empalme en 5' para potenciar el corte y empalme, regiones de unión adicionales, regiones de autocomplementariedad de "seguridad", sitios de corte y empalme adicionales o grupos protectores para modular la estabilidad de la molécula y prevenir la degradación. Además, se pueden incluir codones de terminación en la estructura de la RTM para evitar la traducción de las RTM no sometidas a corte y empalme. En las RTM se pueden incorporar elementos adicionales, tales como estructura en horquilla en 3', ARN circularizado, modificación de bases nucleotídicas o análogos sintéticos para estimular o facilitar la localización nuclear y la incorporación del espliceosoma y la estabilidad intracelular.

Cuando las RTM específicas se deben sintetizar *in vitro* (RTM sintéticas), dichas RTM se pueden modificar en el resto de base, resto de azúcar, o estructura de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, hibridación con el ARNm diana, transporte a la célula etc. Por ejemplo, la modificación de una RTM para reducir la carga global puede potenciar la captación celular de la molécula. Además se pueden realizar modificaciones para reducir la susceptibilidad a las nucleasas o a la degradación química. Las moléculas de ácido nucleico se pueden sintetizar de una manera tal como que se conjugan a otra molécula, tal como un péptido (por ejemplo, para apuntar a los receptores de las células huésped *in vivo*), o un agente facilitador del transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6553–6556; Lemaitre et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:648–652; publicación de PCT n.º WO 88/09810, publicada el 15 de diciembre de 1988) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la publicación de PCT n.º WO 89/10134, publicada el 25 de abril de 1988), agentes de escisión desencadenada por hibridación (véase, por ejemplo, Krol et al., 1988, *BioTechniques* 6: 958–976) o agentes intercalantes (véase, por ejemplo, Zon, 1988, *Pharm. Res.* 5: 539–549). Para este fin, las moléculas de ácido nucleico se pueden conjugar con otra molécula, por ejemplo, un péptido, agente de reticulación desencadenada por hibridación, agente de transporte, agente de escisión desencadenado por hibridación, etc.

Varias otras modificaciones bien conocidas de las moléculas de ácido nucleico se pueden introducir como medio de aumentar la estabilidad intracelular y la semivida (véase también anteriormente para oligonucleótidos). Las posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula. En algunas circunstancias en las que se desea una mayor estabilidad, pueden ser preferentes los ácidos nucleicos que tienen enlaces internucleosídicos modificados, tales como 2'-O-metilación. Los ácidos nucleicos que contienen enlaces internucleosídicos modificados pueden sintetizarse utilizando reactivos y procedimientos que son bien conocidos en la técnica (véase, Uhlmann et al., 1990, *Chem. Rev.* 90: 543–584; Schneider et al., 1990, *Tetrahedron Lett.* 31:335 y las referencias citadas en el mismo).

Cuando se producen sintéticamente, las RTM sintéticas de la presente invención se modifican preferiblemente de tal manera que aumentan su estabilidad en las células. Dado que las moléculas de ARN son sensibles a la escisión por ribonucleasas celulares, puede ser preferible utilizar como inhibidor competitivo un oligonucleótido (o combinación de oligonucleótidos) modificado químicamente que imita la acción de la secuencia de unión a ARN, pero es menos sensible a la escisión por nucleasas. Además, las RTM sintéticas pueden producirse como moléculas circulares resistentes a nucleasas con estabilidad mejorada para evitar la degradación por las nucleasas (Puttaraju et al., 1995, *Nucleic Acids Symposium Series No.* 33: 49–51; Puttaraju et al., 1993, *Nucleic Acid Research* 21: 4253–4258). Otras modificaciones también pueden ser necesarias, por ejemplo para potenciar la unión, para mejorar la captación celular, para mejorar la farmacología o la farmacocinética o para mejorar otras características farmacéuticamente deseables.

Las modificaciones, que pueden realizarse en la estructura de las RTM sintéticas, incluyen, pero no se limitan a, modificaciones de la estructura principal, tales como el uso de (i) fosforotioatos (X o Y o W o Z = S o cualquier combinación de dos o más con el resto como O). Por ejemplo, Y = S (Stein, C. A., et al., 1988, *Nucleic Acids Res.*, 16:3209–3221), X = S (Cosstick, R., et al., 1989, *Tetrahedron Letters*, 30, 4693–4696), Y y Z = S (Brill, W. K.-D., et al., 1989, *J. Amer. Chem. Soc.*, 111: 2321–2322); (ii) metilfosfonatos (por ejemplo, Z = metilo (Miller, P. S., et al., 1980, *J. Biol. Chem.*, 255: 9659–9665); (iii) fosforamidatos (Z = N-(alquil)₂ por ejemplo, metilo alquilo, etilo, butilo) (Z = morfolina o piperazina) (Agrawal, S., et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7079–7083) (X o W = NH) (Mag, M., et al., 1988, *Nucleic Acids Res.*, 16:3525–3543); (iv) fosfotriésteres (Z = O-alquilo, por ejemplo metilo, etilo, etc) (Miller, P. S., et al., 1982, *Biochemistry*, 21: 5468–5474); y (v) enlaces sin fósforo (por ejemplo, carbamato, acetamidato, acetato) (Gait, M. J., et al., 1974, *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1684–1686; Gait, M. J., et al., 1979, *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1389–1394).

Además, las modificaciones de azúcar se pueden incorporar en las RTM de la invención. Tales modificaciones incluyen el uso de: (i) 2'-ribonucleósidos (R=H); (ii) nucleósidos 2'-O-metilados (R=OMe) (Sproat, B. S., et al., 1989, *Nucleic Acids Res.*, 17:3373–3386); y (iii) 2'-fluoro-2'-riboxinucleósidos (R=F) (Krug, A., et al., 1989, *Nucleosides and Nucleotides*, 8: 1473–1483).

Además, las modificaciones de bases que pueden realizarse en las RTM, incluyendo, pero sin limitaciones, el uso de: (i) derivados de pirimidina sustituidos en la posición 5 (por ejemplo, metilo, bromo, flúor, etc.) o sustitución de un grupo carbonilo mediante un grupo amino (Piccirilli, J. A., et al., 1990, *Nature*, 343:33–37); (ii) derivados de purina que carecen de átomos de nitrógeno específicos (por ejemplo, 7-deaza adenina, hipoxantina) o funcionalizados en la posición 8 (por ejemplo, 8-azido adenina, 8-bromo adenina) (para una revisión véase Jones, A. S., 1979, *Int. J. Biolog. Macromolecules*, 1: 194–207).

Además, las RTM pueden unirse covalentemente a grupos funcionales reactivos, tales como: (i) psoralenos (Miller, P. S., et al., 1988, *Nucleic Acids Res.*, Special Pub. No. 20, 113–114), fenantrolinas (Sun, J.-S., et al., 1988, *Biochemistry*, 27: 6039–6045), mostazas (Vlassov, V. V., et al., 1988, *Gene*, 72:313–322) (agentes de reticulación irreversible con o sin la necesidad de correactivos); (ii) acridina (agentes intercalantes) (Helene, C., et al., 1985, *Biochimie*, 67: 777–783); (iii) derivados de tiol (formación de disulfuro reversible con proteínas) (Connolly, B. A., y Newman, P. C., 1989, *Nucleic Acids Res.*, 17: 4957–4974); (iv) aldehídos (formación de base de Schiff); (v) grupos azido, bromo (reticulación UV); o (vi) elipticinas (reticulación fotolítica) (Perrouault, L., et al., 1990, *Nature*, 344: 358–360).

En una realización de la invención, se pueden usar miméticos de oligonucleótidos en los que el azúcar y el enlace internucleosídico, es decir, la estructura principal de las unidades de nucleótidos, se sustituyen con grupos nuevos. Por ejemplo, uno de tales miméticos de oligonucleótidos que se ha demostrado que se unen con una mayor afinidad al ADN y al ARN que los oligonucleótidos naturales se conoce como ácido nucleico peptídico (PNA) (para una revisión, véase Uhlmann, E. 1998, *Biol. Chem.* 379: 1045–52). Por lo tanto, el PNA se puede incorporar en RTM sintéticas para aumentar su estabilidad y/o la afinidad de unión por el pre-ARNm diana.

En otra realización de la invención, las RTM sintéticas pueden unirse covalentemente a grupos lipófilos u otros reactivos capaces de mejorar la absorción por las células. Por ejemplo, las moléculas de RTM pueden unirse covalentemente a: (i) colesterol (Letsinger, R. L., et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6553–6556); (ii) poliaminas (Lemaitre, M., et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 648–652); otros polímeros solubles (por ejemplo, polietilenglicol) para mejorar la eficiencia con la que las RTM se liberan en una célula. Además, las combinaciones de las modificaciones identificadas anteriormente se pueden utilizar para aumentar la estabilidad y la liberación de las RTM en la célula diana. Las RTM de la invención se pueden utilizar en los procedimientos diseñados para producir un nuevo ARN quimérico en una célula diana.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector de expresión recombinante, que comprende una RTM de acuerdo con la presente invención como anteriormente. Un vector en el sentido de la presente invención es un ácido nucleico que es capaz de ser introducido o de introducir ácido nucleico como está comprendido en una célula. Se prefiere que las RTM codificadas por el ácido nucleico introducido se expresen dentro de la célula después de la introducción del vector. Preferiblemente, dicho vector es un vector de expresión eucariota, preferiblemente un vector que comprende secuencias derivadas de virus. Más preferido es un vector de la presente invención, en el que dicho vector comprende además células de la piel y, preferentemente, elementos reguladores específicos de queratinocitos con el fin de dirigir la expresión del transgén.

Los vectores de expresión adecuados para la expresión *in vitro* o *in vivo* se pueden encontrar en la literatura. El experto en la técnica también puede modificar fácilmente estos vectores con el fin de aplicarlos en los procedimientos de la presente invención. Los vectores de expresión usualmente contienen todos los elementos genéticos que son necesarios para la producción de una molécula de RTM específica. En algunas realizaciones de la presente invención, los vectores de expresión según la presente invención pueden tener la forma de un "transgén", es decir, un elemento de expresión en, por ejemplo, un vector adecuado que está diseñado para una expresión y, particularmente, una expresión inducible y/o controlable *in vivo*. En consecuencia, el transgén comprende ácidos nucleicos de la presente invención junto con ciertos elementos de control genético para la expresión como se trata en el presente documento.

En una realización preferida, el vector de la presente invención comprende plásmidos, fagémidos, fagos, cósmidos, cromosomas artificiales de mamíferos, construcciones desactivadas o activadas, virus, en particular, adenovirus, virus vacunal, lentivirus (Chang, L.J. y Gay, E.E. (2000) *Curr. Gene Therap.* 1: 237–251), virus del herpes simple (HSV-1, Carlezon, W.A. et al. (2000) *Crit. Rev. Neurobiol.*; 14(1): 47–67), baculovirus, retrovirus, virus adenoasociados (AAV, Carter, P.J. y Samulski, R. J. (2000) *J. Mol. Med.* 6: 17–27), rinovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), filovirus y versiones modificadas de los mismos (véase, por ejemplo, Cobinger G. P. et al (2001) *Nat. Biotechnol.* 19: 225–30), virosomas, "liposomas de ADN "desnudo" y partículas recubiertas de ácidos nucleicos, en particular, esferas de oro. Particularmente preferidos son los vectores virales como vectores adenovirales o vectores retrovirales (Lindemann et al. (1997) *Mol. Med.* 3: 466–76 y Springer et al. (1998) *Mol. Cell.* 2: 549–58). Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares normalmente pequeñas formadas por lípidos neutros, catiónicos y/o aniónicos, por ejemplo, mediante tratamiento con ultrasonidos de suspensiones liposómicas. El ADN puede, por ejemplo, estar unido iónicamente a la superficie de los liposomas o estar encerrado dentro del liposoma. En la técnica se conocen mezclas de lípidos adecuadas y comprenden, por ejemplo, colesterol, fosfolípidos como, por ejemplo, fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS) y similares, DOTMA (bromuro de 1,2-dioleiloxpropil-3-trimetilamonio) y DPoE (dioleoilfosfatidiletanolamina) que se han utilizado ambos en diversas líneas celulares. Las partículas recubiertas de ácido nucleico son otro medio para la introducción de ácidos nucleicos en las células utilizando las denominadas "pistolas génicas", que permiten la introducción mecánica de partículas en las células. Preferiblemente, las partículas son en sí mismas inertes, y, por lo tanto, están en una realización preferida hecha de esferas de oro.

Se da a conocer una célula huésped transformada con una construcción de vector polinucleótido de la presente invención. La célula huésped puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas pueden ser células huésped procariotas preferidas en algunas circunstancias y típicamente son una cepa de *E. coli* tal como, por ejemplo, la cepas de *E. coli* DH5 disponible en Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EE.UU., y RR1 disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) de Rockville, MD, EE.UU. (ATCC nº 31343). Las células huésped eucariotas preferidas incluyen levaduras, insectos y células de mamíferos, preferiblemente células de vertebrados tales como las de ratón, rata, mono o líneas celulares fibroblásticas y de células de colon humanas. Las células huésped de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que generalmente están disponibles en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Las células huésped de mamífero preferidas incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles en la ATCC como CCL61, células embrionarias de ratón NIH Swiss NIH/3T3 disponibles en la ATCC como CRL 1658, células COS-1 derivadas de riñón de mono disponibles en la ATCC como CRL 1650 y células 293 que son células de riñón embrionario humano. Las células de insecto preferidas son células Sf9 que pueden *transfectarse* con vectores de expresión de baculovirus. Una visión general sobre la elección de células huésped adecuadas para la expresión se puede encontrar en, por ejemplo, el libro de texto de Paulina Balbás y Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Parte Uno, segunda edición, ISBN 978–1–58829–262–9, y otra literatura conocida por el experto en la técnica.

La transformación de los huéspedes celulares adecuados con una construcción de ADN de la presente invención se lleva a cabo por procedimientos bien conocidos que típicamente dependen del tipo de vector usado. Con respecto a la transformación de las células huésped procarióticas, véase, por ejemplo, Cohen et al (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110, y Sambrook et al (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. La transformación de células de levadura se describe en Sherman et al (1986) *Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY. The method of Beggs ((1978) *Nature* 275, 104–109) también es útil. Con respecto a las células de vertebrados, los reactivos útiles en la transfección de tales células, por ejemplo formulaciones de fosfato de calcio y de DEAE-dextrano o liposomas, están disponibles de Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE.UU. La electroporación también es útil para transformar y/o transfectar células y es bien conocida en la técnica para la transformación de células de levadura, células bacterianas, células de insectos y células de vertebrados.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula de piel recombinante aislada, preferiblemente un queratinocito, un fibroblasto o una célula endotelial recombinante, que comprende una molécula de RTM de acuerdo con la presente invención, y/o un vector de expresión recombinante de acuerdo con la presente invención. Además de la descripción anterior con respecto a vectores de expresión recombinantes, la molécula de ácido nucleico que codifica la RTM puede introducirse en la célula de la piel, preferiblemente un queratinocito, fibroblasto o células endotelial por cualquier medio disponible en la técnica. En una realización actualmente preferida, se usa un vector retroviral para transducir los queratinocitos *in vitro*. Más particularmente, se puede usar el vector retroviral pBabe puro de Morganstern y Land (1990) y se inserta el ADN que codifica la RTM. La transducción de los queratinocitos preferidos utilizando el vector BABE se describe en la literatura. El procedimiento exacto de introducir el ácido nucleico alterado en células de mamífero no está, por supuesto, limitado al uso de vectores retrovirales. Otras técnicas están ampliamente disponibles para este procedimiento, incluido el uso de vectores adenovirales, vectores virales adenoasociados (AAV), vectores lentivirales, vectores retrovirales seudotipados. También se pueden usar técnicas de transducción física, tales como liberación de liposomas y mediada por receptores u otros mecanismos de endocitosis. La presente invención se puede usar junto con cualquier de estos u otros procedimientos de transferencia de genes normalmente usados.

También se pueden usar otros procedimientos conocidos en la técnica para introducir el ácido nucleico que codifica las RTM en las células de la piel, tales como queratinocitos, fibroblastos o células endoteliales, como ya se ha descrito también anteriormente. Un procedimiento es la microinyección, en la que el ADN se inyecta directamente en el citoplasma de las células a través de agujas de cristal finas. Como alternativa, el ADN se puede incubar con un polímero de hidrato de carbono inerte (dextrano) al que se ha acoplado un grupo químico cargado positivamente (DEAE, para dietilaminoetilo). El ADN se pega al DEAE-dextrano a través de sus grupos fosfato cargados negativamente. Estas partículas grandes que contienen ADN se pegan a su vez a las superficies de las células, que se piensa que las captan mediante un proceso conocido como endocitosis. En otro procedimiento, las células captan con eficiencia ADN en forma de un precipitado con fosfato cálcico. En la electroporación, las células se introducen en una solución que contiene ADN y se someten a un breve pulso eléctrico que hace que se abran orificios transitorios en sus membranas. El ADN entra en el citoplasma a través de los agujeros, sortea las vesículas endocitóticas a través de las cuales pasar en los procedimientos de DEAE-dextrano y de fosfato cálcico. El ADN también se puede incorporar en vesículas lipídicas artificiales, liposomas, que se fusionan con la membrana celular y liberan sus contenidos directamente en el citoplasma. En un abordaje incluso más directo, el ADN se absorbe en la superficie de microproyectiles de tungsteno y son disparados en las células con un dispositivo similar a una pistola.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a una preparación farmacéutica, que comprende un vehículo fisiológicamente aceptable y la molécula de RTM de acuerdo con la presente invención, el vector de expresión recombinante de acuerdo con la presente invención o la célula de la piel recombinante de acuerdo con la presente invención. Por tanto, otro aspecto más de la presente invención se refiere a una molécula de RTM de acuerdo con la presente invención, el vector de expresión recombinante de acuerdo con la presente invención, la célula de la piel recombinante de acuerdo con la presente invención o la preparación farmacéutica de acuerdo con la presente invención para su uso como medicamento.

En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o que está en la lista de la farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término "vehículo" refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la sustancia sintética. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin.

En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas se administran: (1) en enfermedades o trastornos que implican una ausencia o disminución (respecto a lo normal o deseado) del nivel de una proteína endógena o función, por ejemplo, en huéspedes en los que falta la proteína, es genéticamente defectuosa, biológicamente inactiva o poco activa, o de expresión baja; o (2) en enfermedades o trastornos en los que, *in vitro* o *in vivo*, los ensayos indican la utilidad de las RTM sintéticas que inhiben la función de una proteína en particular. La actividad de la proteína codificada por el ARNm quimérico resultante de la reacción de corte y empalme en *trans* sintética mediada por RTM sintética se puede detectar fácilmente, por ejemplo, mediante la obtención de una muestra de tejido del huésped (por ejemplo, de tejido de biopsia) y analizándola *in vitro* para determinar los niveles de ARNm o proteicos, la estructura y/o actividad del ARNm quimérico expresado. Por tanto, se pueden usar muchos procedimientos estándar en la técnica, incluyendo, pero sin limitaciones, inmunoensayos para detectar y/o visualizar la proteína codificada por el ARNm quimérico (por ejemplo, transferencia Western, inmunoprecipitación seguida de electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato sódico, inmunocitoquímica, etc.) y/o ensayos de hibridación para detectar la formación de expresión de ARNm quimérico detectando y/o visualizando la presencia de ARNm quimérico (por ejemplo, ensayos Northern, transferencias de puntos, hibridación *in situ* y PCR con transcriptasa inversa, etc.), etc. Como alternativa, se puede llevar a cabo la visualización directa de un gen indicador codificado por la RTM sintética o asociado con una RTM.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de una RTM sintética o un ácido nucleico que codifica una RTM sintética, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en la zona que necesita el tratamiento. Esto se puede conseguir mediante, por ejemplo y sin limitaciones, infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo junto con un vendaje para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, o por medio de un supositorio o por medio de un implante, siendo dicho implante un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluidas membranas, tales como membranas sialásticas o fibras. Otros sistemas de administración de fármacos de liberación de control, tales como nanopartículas, matrices tales como polímeros de liberación controlada, hidrogeles La RTM o la RTM sintética se administrarán en cantidades que son eficaces para producir el efecto deseado en la célula diana. Las dosis eficaces de las RTM sintéticas se pueden determinar mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica que abordan parámetros tales como la semivida biológica, la biodisponibilidad y la toxicidad. La cantidad de la composición de la invención que será efectiva dependerá de la naturaleza de la enfermedad o trastorno que se está tratando y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Además, los ensayos *in vitro* pueden emplearse, opcionalmente, para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimos.

Se divulga un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención, opcionalmente asociados con dicho o dichos recipientes puede haber una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, en el que la nota refleja la aprobación por la agencia de la

fabricación, el uso o la venta para administración humana.

Cualquier molécula de la invención, ácido nucleico, vector de expresión o célula es útil para el tratamiento de los trastornos como se describe en el presente documento. Por tanto, cualquier molécula de la presente invención se puede usar como medicamento. La molécula puede usarse individualmente o combinada con otra u otras moléculas de la invención o una o más moléculas conocidas.

Preferiblemente, el medicamento de la presente invención se puede administrar directamente al paciente, en el órgano afectado o sistémicamente i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v., o aplicarse *ex vivo* a células derivadas del paciente o de una línea celular humana que se administran posteriormente al paciente, o se usan *in vitro* para producir células recombinantes que después se vuelven a administrar al paciente.

El ácido nucleico de la invención puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un sistema de vector o de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, PNA, ARN o una combinación de los mismos. Los procedimientos para el diseño y la introducción de dicho ácido nucleico son bien conocidos en la técnica. Una visión general se proporciona en, por ejemplo, Pascolo S. 2006; Stan R. 2006, o A Mahdavi 2006 (véase Mahdavi A, Monk BJ. Recent advances in human papillomavirus vaccines. *Curr Oncol Rep.* 2006 Nov; 8 (6): 465–72. Stan R, Wolchok JD, Cohen AD. DNA vaccines against cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2006 Jun; 20(3): 613–36. Pascolo S. Vaccination with messenger RNA. *Methods Mol Med.* 2006; 127:23–40). Las vacunas de polinucleótidos son fáciles de preparar, pero el modo de acción de estos vectores en la inducción de una respuesta inmunitaria no se entiende completamente. Los vectores y los sistemas de liberación adecuados incluyen ADN y/o ARN viral, tales como los sistemas basados en adenovirus, virus vacunal, retrovirus, virus del herpes, virus adenoasociados o híbridos que contienen elementos de más de un virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos y son bien conocidos en la técnica de liberación de ADN. También se puede usar la liberación física, tal como a través de una "pistola génica".

Por tanto, la presente invención proporciona un medicamento que es útil en el tratamiento de trastornos de la piel u otros epitelios, tales como epidermólisis ampollosa, fibrosis quística, paquioniquia congénita, enfermedades autoinmunitarias, tales como psoriasis o neurodermitis, y cánceres de la piel.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una molécula de RTM de acuerdo con la presente invención, el vector de expresión recombinante de acuerdo con la presente invención, la célula de la piel recombinante de acuerdo con la presente invención o la preparación farmacéutica de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de trastornos de la piel u otros epitelios, tales como epidermólisis ampollosa, fibrosis quística, paquioniquia congénita, enfermedades autoinmunitarias, tales como psoriasis o neurodermitis, y cánceres de la piel. Se prefiere el uso de acuerdo con la presente invención, en el que dicho medicamento se aplica a la piel. También se describe un procedimiento respectivo de tratamiento de una enfermedad como anteriormente.

La presente formulación es una que es adecuada para la administración del compuesto activo respectivo, en particular una RTM de la presente invención por cualquier vía aceptable, tal como tópica, oral (enteral), nasal, oftálmica, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o transdérmica. Preferiblemente, la administración es por vía subcutánea y, lo más preferiblemente, tópica. La administración puede ser por bomba de infusión.

Se divulga un procedimiento para corregir un defecto genético en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una molécula de RTM de acuerdo con la presente invención, el vector de expresión recombinante de acuerdo con la presente invención, la célula de la piel recombinante de acuerdo con la presente invención o la preparación farmacéutica de acuerdo con la presente invención. Como se ha indicado anteriormente, la aberración genética de la expresión génica de los genes objetivo son la base de diversos trastornos y enfermedades, que se puede corregir usando las composiciones de la presente invención.

Adicionalmente, las composiciones y procedimientos también se pueden utilizar para proporcionar un gen que codifica una molécula biológicamente activa funcional a las células de un individuo con un trastorno genético hereditario en el que la expresión del producto génico que falta o mutante produce un fenotipo normal. Otra aplicación de la invención de estas composiciones y procedimientos es reprogramar genes que desempeñan papeles específicos en diversas enfermedades, como enfermedades autoinmunitarias, como se ha explicado anteriormente.

Las siguientes figuras y ejemplos solo sirven para ilustrar la invención y la presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, varias modificaciones de la invención, además de las descritas en el presente documento, se pondrán de manifiesto para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. También se pretende que dichas modificaciones entren dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

La figura 1 muestra una visión general esquemática de una molécula de RTM que está diseñada para interactuar con un pre-ARNm diana seleccionado. La RTM comprende un dominio de unión a la diana, un dominio de corte y empalme, y un dominio codificante, que contiene la información genética nueva o modificada para reprogramar el pre-ARNm.

La figura 2 muestra una visión general esquemática de los tres tipos posibles de RTM en un ARN con 24 exones, 1) RTM de corte y empalme en *trans* en 5' que incluyen un sitio de corte y empalme en 5'. Después del corte y empalme en *trans*, la RTM en 5' habrá cambiado la región 5' del ARNm diana; 2) las RTM en 3' que incluyen un sitio de corte y empalme en 3' que se utiliza para el corte y empalme en *trans* y sustituir la región 3' del ARNm diana; y 3) las RTM de corte y empalme doble, que llevan uno o 2 dominios de unión junto con un sitio de corte y empalme en 3' y en 5'. Después del corte y empalme en *trans*, esta RTM sustituiría uno o más exones internos en el ARNm diana procesado.

La figura 3 muestra la representación esquemática del corte y empalme en *trans* en 3'. SMART crea un ARNm quimérico a través de una reacción de corte y empalme en *trans* mediada por el espliceosoma entre el sitio de corte y empalme en 5' de un pre-ARNm diana endógeno y el sitio de corte y empalme en 3' de la molécula de pre-ARN de corte y empalme en *trans* liberada exógenamente. La molécula de RTM se une a través de apareamiento de bases específico a un intrón del pre-ARNm diana endógeno y sustituye toda la secuencia en 3' del gen endógeno aguas arriba del intrón diana con la secuencia de tipo silvestre de la RTM.

La figura 4 muestra una molécula de RTM para sistema modelo de corte y empalme doble en *trans* de LacZ tal como se utiliza en los Ejemplos siguientes. Secuencia del dominio de unión:

CCGTCCCCACCCACCTGCACAGCTCTCCCTTCCTCTCCTCCAG (SEQ ID No. 3); secuencia espaciadora: GAGAACATTATTATAGCGTTGCTCGAG (SEQ ID No. 4); secuencia del punto de ramificación: TACTAAC; tracto de polipirimidina: TCTTCTTTTTTTCTG (SEQ ID No. 5); sitio aceptor de corte y empalme en 3': CAG.

La figura 5 muestra la construcción de PTM-6 para el corte y empalme en *trans* endógeno del gen COL7A1 como describe en los ejemplos siguientes. Secuencia del dominio de unión: (secuencia marcada en negrita:

complementaria al exón 65 de COL7A1)

CTTCCTCCCGTCTTCTCCAGGGTCCCCAGGTTCTCCCTGTGGGCAGAGGACTCACA
TCAGCCCAAACATTCACTGGTGTCTGGCTGCAAGACACTACCTTGCTAGATTTCA
GATGACTGTGACTGTATTTCTGTGCCTGTAGCTATGGTTGTGTGTGTCTTGGAGCA
TGGCCTGTGGCCGTCTGAGTGAGCTGCTACATGTCTAGGGGTGTGCCTGCATAGG
 (SEQ ID No. 16),

Secuencia espaciadora: AACGAGAACATTATTATAGCGTTGCTCGAG (SEQ ID No. 17); secuencia del punto de ramificación: TACTAAC; tracto de polipirimidina: TCTTCTTTTTTTCTG (SEQ ID No. 18); sitio aceptor de corte y empalme en 3': CAG

La figura 6 muestra una imagen de microscopia óptica de células HEK 293FT transfectadas teñidas con β -galactosidasa. Aumento: 100x; **A)** La transfección de células HEK 293FT con el vector diana solo no produjo ninguna actividad de β -gal. **B)** El corte y empalme en *trans* preciso entre el pre-ARNm diana y el ARN de RTM produjo β -gal funcional en las células 293FT epiteliales cotransfectadas. El 10 % de las células cotransfectadas mostró restauración de la expresión de β -gal.

La Figura 7 muestra un análisis de microscopia de células HEK 293FT cotransfectadas. Aumento: 200x. A) El corte y empalme en *trans* específico entre GFP-diana y GFP-PTM-1 en las células cotransfectadas conduce a un exón de GFP completo y, por lo tanto, las células producen fluorescencia verde. B) El indicador de fluorescencia roja en la RTM sirve como control de la transfección e indica corte y empalme en *trans* no específico, corte y empalme en *cis* o expresión directa de RTM no sometida a corte y empalme.

La figura 8 muestra la tinción de inmunofluorescencia de equivalentes de piel organotípicos con un anticuerpo anti-colágeno de tipo VII. El análisis se realizó en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioscop. Aumento: 100x, tiempo de exposición: 10 segundos. A) La tinción de inmunofluorescencia de los EP realizada con queratinocitos EADR RO inmortalizados no tratados y fibroblastos EADR muestra que el cultivo organotípico no era casi inmunorreactivo en comparación con el control positivo. B) En los EP hechos con queratinocitos y fibroblastos de tipo silvestre, la unión dermo-epidérmica (UDE) es fuertemente reactiva, lo que indica depósito de colágeno de tipo VII. C) La tinción de colágeno de tipo VII en los EP realizados con células clonogénicas con el n.º 1 de los queratinocitos primarios RO revertidas dio lugar a una señal muy verde, que indica depósito de colágeno de tipo VII en la UDE. La intensidad de la tinción es comparable a la observada en los EP realizados con queratinocitos de tipo silvestre.

La figura 9 muestra el diagrama esquemático de la RTM en 5' y la molécula diana en el sistema modelo fluorescente tal como se utiliza en los ejemplos. Los acontecimientos de corte y empalme en *trans* inducidos por RTM conducen a la expresión de una proteína de fusión dsRED-acGFP en la RTM y las células HEK293 transfectadas con la molécula diana.

La figura 10 muestra las posiciones de clones de RTM específicos para la región 9 del exón/intrón del gen PLEC1.

La figura 11 muestra los resultados de la expresión de GFP para clones de RTM específicos para la región 9 del exón/intrón del gen PLEC1.

5 La figura 12 muestra las posiciones de clones de RTM específicos para la región 52 del exón/intrón del gen COL17A1.

La figura 13 muestra una visión general esquemática de la construcción de RTM como la producida según el ejemplo 4.

10 Las SEQ ID Nos 1 a 26 muestran las secuencias de las regiones, los cebadores y las sondas tal como se usan en los Ejemplos.

La SEQ ID No 27 muestra la secuencia del dominio de unión de la construcción PTM13 específica para el exón 9 de PLEC1 (Ejemplo 3).

La SEQ ID No 28 muestra la secuencia del dominio de unión de la construcción PTMN9 específica para el exón 52 de COL17A1 (Ejemplo 3).

15 La SEQ ID No 29 muestra la secuencia de la construcción RTM-BD6 según la invención para la unión en MMP-9 (Intrón 1).

Ejemplos

Introducción

20 El procedimiento de corte y empalme en *trans* en 3' se usó como ejemplo para demostrar el éxito de la transferencia de las RTM al interior de las células y la sustitución precisa de un exón interno mediante un corte y empalme en *trans* doble entre un pre-ARNm diana y una RTM para la corrección del gen COL7A1 *in vitro*, debido a la sustitución del exón en 3' es el tipo más frecuentemente adoptado en los estudios actuales de corte y empalme en *trans* (Chao H. et al. (2003) Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. Nat. Med. 9, 1015-1019) (Dallinger G. et al. (2003) Development of spliceosome-mediated RNA trans-splicing (SMaRT) for the correction of inherited skin diseases. Experimental Dermatology 12, 37-46) (Liu X.M. et al. (2002) Partial correction of endogenous Delta F508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. Nature Biotechnology 20, 47-52) (Mansfield S.G. et al. (2000) Repair of CFTR mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. Gene Ther. 7, 1885-1895) (Puttaraju M. et al. (1999) Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. Nat. Biotechnol. 17, 246-252) (Sullenger B.A. y Gilboa E. (2002) Emerging clinical applications of RNA. Nature 418, 252-258). En este proceso, la totalidad de la región en 3' del pre-ARNm diana se sustituye por las secuencias de codificación portadas por una RTM en 3'.

30 Los pares de bases de RTM con un intrón del pre-ARNm diana a través del dominio de unión inducen corte y empalme en *trans* entre el sitio de corte y empalme donante en 5' adyacente de este intrón y el sitio de corte y empalme aceptor en 3' de la RTM mediante SMaRT. Esta RTM porta un sitio de poliadenilación (pA) pero no un codón de iniciación ATG, que debe adquirirse del pre-ARNm diana (Mitchell L.G. y McGarrity G.J. (2005) Gene therapy progress and prospects: reprogramming gene expression by trans-splicing. Gene Ther. 12, 1477-1485).

40 La figura 3 muestra la representación esquemática del corte y empalme en *trans* en 3'. SMaRT crea un ARNm quimérico a través de una reacción de corte y empalme en *trans* mediada por el spliceosoma entre el sitio de corte y empalme en 5' de un pre-ARNm diana endógeno y el sitio de corte y empalme en 3' de la molécula de pre-ARN de corte y empalme en *trans* liberada exógenamente. La molécula de RTM se une a través de apareamiento de bases específico a un intrón del pre-ARNm diana endógeno y sustituye toda la secuencia en 3' del gen endógeno aguas arriba del intrón diana con la secuencia de tipo silvestre de la RTM. Este proceso da lugar a un transcrito reprogramado que consiste en la secuencia de tipo silvestre en 3' son la mutación.

45 Los materiales y el procedimiento preferidos para realizar los experimentos cuyos resultados se tratan más adelante se pueden tomar de la correspondiente literatura, tal como, por ejemplo, la sección experimental del documento WO 2003/069311.

Tecnologías de clonación molecular

Reactivos para la clonación molecular

50 Las amplificaciones de ADN para la clonación se realizaron con Pfu Turbo polimerasa (Stratagene, La Jolla, CA) en Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler. Para amplificar fragmentos largos de PCR (1,6 - 4 kb) los inventores utilizaron el Expand Long Range dNTPack de acuerdo con el protocolo del fabricante (Roche, Mannheim, Alemania). Los productos de la PCR y los plásmidos digeridos se eluyeron en un gel de agarosa al 1 %, y se purificaron usando el kit GFX (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). El ADN se eluyó en H₂O o Tris-EDTA, a pH 8,0. Todas

las enzimas de restricción utilizadas para los procedimientos de clonación se adquirieron en New England Biolabs, Beverly, MA. Las uniones se realizaron con la ADN ligasa de T4 de Promega (Madison, WI) o la ADN ligasa de T4 de New England Biolabs (Beverly, MA). Para la desfosforilación de los extremos del vector digerido se usó fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Fermentas, St. Leonrot, Alemania). Todos los plásmidos diana y de RTM usados para los sistemas de modelo de corte y empalme doble en *trans* se clonaron en el vector pcDNA3,1D/V5-His-TOPO (Invitrogen, Calrlsbad, CA). Los plásmidos se amplificaron en cepas de bacterias químicamente competentes TOP10 o DH5 α (Invitrogen, Calrlsbad, CA). Se usaron bacterias XL10-Gold competentes (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos) para la amplificación de vectores grandes (hasta 14 kb). Las preparaciones de plásmidos se realizaron usando el kit GenElute™ Plasmid Miniprep de Sigma-Aldrich (St Louis, MO) y el kit QIAquick (Qiagen, Courtaboeuf, Francia). Los genes indicadores de fluorescencia GFP y DsRed se amplificaron a partir de los vectores pAcGFP1 y pDs-Red Monomer, y el vector pIRES2-AcGFP1 se utilizó como molde para la amplificación de la secuencia IRES de tipo silvestre (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Francia). La enzima de restricción CviJI *, usada para la construcción de una biblioteca de dominio de unión al azar, se adquirió en Roboklon (Berlín, Alemania). El kit DNA Terminator End Repair Kit se adquirió en Lucigen (Middleton, WI). El kit Rneasy Mini para aislamiento de ARN de células adhesivas cultivadas se adquirió en Qiagen (Hilden, Alemania).

Las reacciones de RT-PCR se realizaron con SuperScript One-Step RT-PCR y SuperScript One-Step RT-PCR para moldes largos con Platinum Taq (Invitrogen). Todas las construcciones de vectores y productos de PCR se secuenciaron con un secuenciador automático ABI Prism usando un kit de secuenciación de ciclo con terminador colorante ABI PRISM kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) y 3,2 pmol de cebador por reacción para verificar secuencias. El vector retroviral pLZRS-IRES-Zeo (Nolan y Shatzman 1998 Curr Opin Biotechnol. 1998 Oct; 9 (5): 447-50) fue amablemente facilitado por G. Meneguzzi, Nice, Francia. *trans*-splicing of COL7A1 in a double-transfection model system.

Corte y empalme en *trans* en sistemas de modelo de transfección doble

Construcción de vectores para el sistema modelo de corte y empalme en *trans* de LacZ diana para el sistema modelo de LacZ

Para la clonación del vector Diana LacZ, LacZ-T1 de G. Dallinger (Dallinger G. et al. (2003) Development of spliceosome-mediated RNA trans-splicing (SMaRT) for the correction of inherited skin diseases. Experimental Dermatology 12, 37-46) se digirió con BamHI y BstEII (New England Biolabs). La LacZ-diana incluye un exón en 5' de LacZ (1-1788 pb) seguid de un intrón 43 del gen del colágeno 7 (359 pb) y un exón en 3' de LacZ (1789-3174 pb). El exón en 3' de LacZ contiene dos codones de terminación en el mismo marco en la posición 1.800 pb. El intrón 43 de COL7A1 se amplificó mediante PCR con Pfu Turbo DNA polimerasa (Stratagene) usando ADN genómico humano como mole y los cebadores Int43F (5' - GGATCCGTAAACCCACTGGCTGCAATG - 3'; SEQ ID No. 1) e Int43R (5' - GGTTACCTGGAGGAGAGGAAGGGAAGA - 3'; SEQ ID No. 2). El ADN genómico se aisló con el kit de purificación de ADN Puregene™ (Gentra Systems, Minneapolis, MN). El fragmento se digirió con BamHI y BstEII (New England Biolabs) y se insertó entre los dos exones de LacZ usando la ADN ligasa de T4 (Promega) durante 3 horas a temperatura ambiente en 20 μ l.

RTM para el sistema del modelo de LacZ

El LacZ-PTM se construyó digiriendo el vector pCOL17-PTM, pcDNA3,1D/V5-His-TOPO (Dallinger G. et al. (2003) Development of spliceosome-mediated RNA trans-splicing (SMaRT) for the correction of inherited skin diseases. Experimental Dermatology 12, 37-46.), con EcoRI y KpnI (New England Biolabs) y sustituyendo el dominio de unión de COL7A1 por un oligonucleótido que contiene un dominio de unión (DU) antisentido de 43 pb para el intrón 43 de COL7A1. Además del DU, el LacZ-PTM contiene una secuencia espaciadora de 27 pb, un punto de ramificación (PR), un tracto de polipirimidina (TPP), seguidos del sitio aceptor de corte y empalme en 3' CAG y el exón en 3' de LacZ son codones de TERMINACIÓN (véase la figura 4).

Construcción de vectores para el sistema modelo de corte y empalme en *trans* con fluorescencia

Diana para el sistema modelo de fluorescencia

La diana para el procedimiento de cribado con fluorescencia consiste en la mitad en 5' de un exón GFP y el intrón 64 y el exón 65 de COL7A1 La parte en 5' del GFP (1 - 336 pb) se amplificó del vector pAcGFP1 (Clontech) utilizando Pfu Turbo ADN polimerasa (Stratagene). El cebador inverso se diseñó para insertar un sitio de corte y empalme en 5' (gtaag) en la frontera GFP/intrón que se utilizará para *el corte y empalme en trans* del intrón de destino, así como un sitio de restricción EcoRV. (5'GFP D: 5' - CACCATGGTGAGCAAGGG - 3' SEQ ID No. 6; 5'GFP I: 5 - GATATCTTACCTCGGCGGACTT - 3' SEQ ID No. 7) El fragmento de GFP en 5' se clonó en el sitio de clonación TOPO del vector pcDNA3,1D/V5-His-TOPO (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El intrón 64 y el exón 65 se amplificaron a partir de ADN genómico humano con el siguiente par de cebadores: Int64F que incluye un sitio EcoRV: 5' - GATATCGTGAGTGTGTCCAGGGCA - 3' SEQ ID No. 8, e Int64R que incluye un sitio NotI: 5' - GCGGCCGCCTTCCCTCCGTCCTTCTCC - 3' SEQ ID No. 9. El vector y los fragmentos de la PCR se cortaron con EcoRV y NotI y se ligaron usando la NEB T4 ADN Ligasa durante 1 hora a temperatura ambiente.

RTM para el sistema modelo de fluorescencia

Para la construcción del vector de RTM, 3' GFP (337–720 pb) se amplificó a partir del vector pAcGFP1 (Clontech) usando los cebadores diseñados para insertar una secuencia de TPP y un sitio de restricción KpnI en el extremo 5' y un sitio de restricción HindIII en el extremo 3' del fragmento (#384D: 5' – GGTACCTCTTCTTTTTTCTGCAGGTGAAGTTCGAGGGCGAT – 3' SEQ ID No. 10 y # 385R 5' – AAGCTTACACCAGACAAGTTGGTAATG – 3' SEQ ID No. 11). PTM-5 de G. Dallinger (Dallinger G. et al. (2003) Development of spliceosome-mediated RNA trans-splicing (SMaRT) for the correction of inherited skin diseases. *Experimental Dermatology* 12, 37–46) que contiene un espaciador de 27 pb y una secuencia de DR justo aguas arriba del sitio de restricción KpnI, se digirió con KpnI y HindIII para la unión del producto amplificado. La segunda etapa de clonación fue la ligación de GFP en 3', incluyendo las secuencias espaciadora, del PR y TPP en el sitio TOPO del vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO (Invitrogen). El fragmento de 470 pb se amplificó usando un cebador directo portador de un sitio de restricción para EcoRI y para HpaI (5' – CACCGAATTCATCGATGTTAACGAGAACATTATTATAGCGTTG – 3' SEQ ID No. 12). La secuencia HpaI se insertó para servir como sitio de restricción para las ligaduras romas de los dominios de unión variables. El cebador inverso fue 5' – GCTCACTTGTACAGCT – 3' SEQ ID No. 13. El vector resultante se utilizó como vector diana para las siguientes etapas de clonación. La secuencia IRES de tipo silvestre se amplificó a partir del vector pIRES2-AcGFP1 y se ligó entre los sitios de restricción EcoRV y XmaI. Se usaron los cebadores siguientes: IRES D: 5' – ggatccgatatcatccgccctctcc – 3' SEQ ID No. 14; IRES I: 5' – CCCGGGAGGTTGTGGCCATATTATCATC – 3' SEQ ID No. 15. El gen DsRed de longitud completa se cortó del vector pDs-Red Monomer (Clontech) usando las enzimas de restricción EcoRV y NotI y se clonaron en el vector de RTM entre dichos dos sitios de restricción.

Corte y empalme en *trans* en el gen COL7A1 endógeno

Construcción de vectores para corte y empalme en *trans* endógeno

Clonación de la secuencia del exón de COL7A1 en el vector de RTM

La pre-molécula de corte y empalme en *trans* (RTM) para corte y empalme en *trans* endógeno consiste en un dominio de unión (DU) de 224 pb, complementario al intrón 64 y al exón 65 de COL7A1, un espaciador 31 pb, un punto de ramificación (PR) y un tracto de polipirimidina (TPP) seguido de un sitio aceptor de corte y empalme en 3' (CAG) y la secuencia de codificación de tipo silvestre en 3' (5648 - 8951 pb) del COL7A1 humano. La secuencia de 300 pb que abarca el DU, el espaciador, el PR y el TPP se amplificó a partir de las RTM seleccionadas por FACS y se clonó en pcDNA3.1D/V5-His-TOPO (Invitrogen) en el sitio de clonación TOPO. El cebador directo se diseñó para introducir un sitio de restricción EcoRI, mientras que el cebador inverso introdujo un único sitio NheI para posteriores estrategias de clonación. La secuencia de 3,3 kb en 3' de COL7A1 humano, que consiste en del exón 65 al exón 118 de una persona no afectada, se amplificó mediante una PCR con transcriptasa inversa de una sola etapa (Superscript One-Step RT-PCR para plantillas largos con Platinum Taq; Invitrogen). El producto amplificado se digirió con NheI y EcoRV y se clonó en el vector de RTM. Toda la construcción se analizó mediante secuenciación para confirmar su secuencia correcta.

Subclonación de la RTM en el vector retroviral pLZRS-IRES-Zeo

Para una transducción estable, la RTM se subclonó en el vector retroviral pLZRS-IRES-Zeo derivado de MuLV (amablemente proporcionado por G. Meneguzzi, Nice) (Michiels F. et al. (2000) Expression of Rho GTPases using retroviral vectors. *Regulators and Effectors of Small Gtpases*, Pt D 325, 295–302) entre los sitios de restricción EcoRI y SnaBI. Las construcciones retrovirales se generaron digiriendo el vector y el inserto con las enzimas de restricción adecuadas, purificación en gel y ligación con ADN ligasa de T4 (New England Biolabs) durante tres horas a temperatura ambiente. Los plásmidos se amplificaron en la cepa de *E. coli* XL10-Gold (Stratagene), se purificaron con un kit QIAquick (Qiagen) y se sometieron a secuenciación.

Transfección de la diana y RTM en células HEK 293FT

Las células HEK 293FT se usaron para experimentos de corte y empalme en *trans* por su falta de ARNm de COL7A1 endógeno. Las transfecciones dobles de la diana de LacZ y los plásmidos de RTM (2 µg cada uno) se realizaron usando reactivo LipofectaminePlus (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. El día antes de la transfección, 3×10^5 células se sembraron en placas de 60 mm y se cultivaron en DMEM exento de antibiótico durante 24 horas. Las células se analizaron 48 horas después de la transfección. 1 µg de la diana fluorescente y 3 µg de una biblioteca de RTM fluorescente preparada, o más bien un vector de RTM fluorescente, que consiste en un solo dominio de unión, se transfectaron transitoriamente en células 293FT utilizando EcoTransfect™ (OZ Biosciences). Se utilizaron 10^6 células para las transfecciones de acuerdo con el protocolo del fabricante. El análisis en microscopio de fluorescencia y FACS se realizó 48 horas después de la transfección.

Análisis del corte y empalme en *trans* en el sistema modelo de LacZ**Preparación de proteína y ensayo con β -gal**

La proteína total de las células transfectadas se aisló mediante un procedimiento de congelación y descongelación. Para la determinación de la actividad de β -gal, los inventores usaron el kit de ensayo de β -gal Invitrogen (Invitrogen).
 5 La concentración de la proteína total se midió mediante el ensayo de fijación de colorante de acuerdo con Bradford utilizando el reactivo de ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad).

Tinción *In situ* para β -gal

La expresión de β -gal funcional se controló usando un kit de tinción de β -gal (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. El porcentaje de células positivas a β -gal se determinó contando las células teñidas frente a las no teñidas en cinco campos seleccionados al azar. (Dallinger G. et al. (2003) Development of spliceosome-mediated RNA trans-splicing (SMaRT) for the correction of inherited skin diseases. *Experimental Dermatology* 12, 37–46).
 10

Análisis del corte y empalme en *trans* en el sistema modelo fluorescente**Visualización del corte y empalme en *trans* en microscopio de fluorescencia y FACS**

El corte y empalme en *trans* en las células se verificó en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioskop (Carl Zeiss). Para el análisis corte y empalme en *trans* en FACS, se lavaron 10^6 células con tampón de FACS frío (PBS de (Dulbecco, 3 % de FCS) y se resuspendieron en 1 ml de tampón de FACS y se mantuvieron en hielo. Antes del análisis se tiñeron las células con 10 μ l de 7-AAD (Beckman Coulter) durante 5 minutos en hielo y se analizaron 25.000 acontecimientos usando el Beckman Coulter FC500. Para el análisis de datos se usó el software CXP.
 15

Análisis del corte y empalme en *trans* preciso a nivel de ARNm

El corte y empalme en *trans* preciso entre la diana fluorescente y los vectores de RTM se analizó mediante secuenciación. El ARN total de las células HEK 293FT se cotransfectó transitoriamente con la diana y la RTM se aisló 48 horas después de la transfección utilizando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). El corte y empalme en *cis* de la diana analizó mediante RT-PCR (SuperScript One-Step RT-PCR, Invitrogen), utilizando un cebador directo (# 666 D: 5' – GCCACTACGGCAAGC – 3'; SEQ ID No. 19) complementario a una secuencia del GFP en 5' y un cebador inverso (# 667 I: 5' – CCGTCTTCTCCAGGGTC – 3'; SEQ ID No. 20) complementario a una secuencia del exón 65 de COL7A1 en la diana.
 20
 25

Cultivo celular y análisis del modelo de corte y empalme en *trans* endógeno**Infección retroviral de queratinocitos humanos con el vector pLZRS-RTM**

Se usaron células de concentrado Amphotropic Phoenix (Phoenix-ampho) para generar partículas retrovirales infecciosas (Michiels et al. 2000). El plásmido pLZRS-PTM recombinante se introdujo en las células Phoenix-ampho mediante transfección con fosfato de calcio transitoria. Los virus pLZRS-PTM recombinantes se recogieron del medio de cultivo celular 48 horas después de la transfección transitoria (título de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ UFC/ml) (Gache et al. 2004). Los cultivos de queratinocitos EADR ROB k(2×10^5 células/cm²) infectaron con la suspensión viral en presencia de 5 μ g/ml de polibreno a 32 °C en atmósfera húmeda, 5 % de CO₂. Se añadió medio de cultivo recién preparado 2 horas más tarde y las células se incubaron durante la noche a 32 °C. Los queratinocitos se seleccionaron en presencia de 200 μ g/ml de ceocina (Invitrogen) durante 7 días. Las células seleccionadas se pasaron y se procesaron para estudios posteriores.
 30
 35

Aislamiento de células clonogénicas

Los cultivos subconfluentes de queratinocitos RO EADR transducidos en el pase 2 después de la selección con ceocina se utilizaron para el aislamiento de tipos de células clonales individuales. Para este fin, se sembraron diluciones de 10^3 , 2×10^3 y 5×10^3 queratinocitos RO transducidos en placas de Petri de 75 cm² sobre capas de alimentación normal para el crecimiento en cultivo durante 14 días. Las colonias celulares con perímetros regulares y diámetros grandes (de aproximadamente 1 cm²) se aislaron, se trataron con tripsina, y se expandieron para su análisis posterior.
 40

Análisis de la integración de RTM en el genoma de los queratinocitos**Preparación de ADN genómico de las células**

Se lavaron 5×10^6 células con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se trataron con tripsina utilizando 1 % de tripsina-EDTA (Biochrom) y se sedimentaron por centrifugación. El ADN genómico se aisló con el kit Dneasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se diluyó en 200 μ l de tampón de elución.
 45
 50

Análisis de PCR del ADN genómico

Los inventores usaron 1 μ l del ADN genómico aislado para la reacción de PCR usando Expand Long Range dNTPack (Roche). Un fragmento de 3,6 kb se amplificó con cebadores específicos del vector. El cebador directo (# 2221 F 5' – AGACGGCATCGCAGCTTGG – 3'; SEQ ID No. 21) se une a la secuencia de la estructura principal del vector pLZRS–PTM aguas arriba del dominio de unión a RTM, y el cebador inverso (# 816 F 5' – TCTAGAGAATTCTCAGTCCTGGGCAGTACCTG – 3'; SEQ ID No. 22) es complementario del último exón de COL7A1 en el vector pLZRS–PTM. Se realizó una segunda PCR para verificar la integración en el cromosoma de pLZRS–PTM y excluir la posibilidad de amplificación de un vector pLZRS–PTM episomal replicado. Para este ensayo, los inventores usaron cebadores que se unen fuera de la región LTR del vector de RTM retroviral (EBNA–1 D: 5' – ATGTCTGAGAGGGGCCAG – 3'; SEQ ID No. 23; EBNA–1 I: 5' – CTCCTGCTCCTGTTCCACC – 3'; SEQ ID No. 24). Un fragmento de 280 pb se amplificaría si el genoma viral estaba presente en la configuración episomal. Para los controles positivos, los inventores usaron 1 μ l de una preparación de plásmido pLZRS–PTM respectivamente. Los fragmentos se analizaron en un gel de agarosa al 1 %.

Análisis de la expresión de RTM a nivel de ARN

15 Preparación de ARN total de las células

Las células (4×10^6) en el pase 2 después de la infección se lavaron con PBS una vez, se digirieron con tripsina, se sedimentaron y el ARN total se aisló usando el kit RNAqueous (Ambion). El plásmido contaminada y el ADN genómico se eliminaron mediante tratamiento con DNasa I (Sigma-Aldrich).

Análisis de secuenciación

A partir del análisis de secuenciación de pLZRS–PTM, los inventores conocieron que el vector alberga dos polimorfismos en la secuencia de COL7A1, que no se detectaron en el transcrito COL7A1 endógeno de queratinocitos RO EADR. Para verificar si la RTM se expresa en las células transducidas, los inventores realizaron análisis de secuenciación de la región COL7A1 deseada utilizando ARN total de células RTM transducidas y no transducidas. Los cebadores se diseñaron para amplificar un producto de RT-PCR de 532 pb, incluyendo los polimorfismos en las posiciones 8.274 y 8.615 del transcrito de COL7A1 (P2 D: 5' – CAAGGGTGACCAGGGCGA – 3'; SEQ ID No. 25, y P2R: 5' – CCAAGGAGCTTCAGGGTCC – 3'; SEQ ID No. 26).

Ejemplo 1

Corte y empalme en *trans* en el sistema modelo de LacZ

La viabilidad del corte y empalme en *trans* en 3' en la corrección del gen COL7A1 se ha establecido usando el sistema de reparación modelo de corte y empalme en *trans* de LacZ. En este sistema, los inventores utilizaron el intrón 43 de COL7A1 como la diana para el corte y empalme en *trans*. El intrón está flanqueado por el exón en 5' del gen LacZ y el exón en 3' que contiene dos codones de terminación en el marco. Debido a los codones de terminación, el corte y empalme en *cis* de la diana conduce a un transcrito de ARN defectuoso y, por lo tanto, no produce β -galactosidasa funcional. La segunda construcción del sistema de reparación modelo de LacZ es el RTM, que consiste en un dominio de unión antisentido de 43 pb para el intrón 43 y el exón LacZ en 3' sin los codones de terminación. El corte y empalme en *trans* preciso entre la diana y la RTM en las células sometidas a transfección doble reemplaza el exón en 3' mutante de la diana y, por lo tanto, restaura la actividad β -gal.

Análisis de la restauración de la función proteica

Los inventores cotransfectaron de forma transitoria células 293FT con diana y plásmido de RTM para la investigación de la reparación del pre-ARNm de LacZ defectuoso mediante SMART y la producción de la proteína β -gal funcional. La tinción in situ de las células 293FT cotransfectadas reveló un 10 % de células positivas para β -gal del total de células, lo que indica ARN corregido producido mediante corte y empalme en *trans* funcional entre la diana y RTM. Por el contrario, las células transfectadas con LacZ–diana o RTM sola no produjeron ninguna β -gal funcional como indica la ausencia total de células positivas para β -gal. Para la cuantificación posterior de la cantidad de β -gal producida, se midió la actividad de la enzima β -gal en un ensayo colorimétrico utilizando lisados de células 293FT 48 horas después de la transfección. La actividad de β -gal en los extractos proteicos preparados a partir de células transfectadas con 2 μ g del LacZ–diana RTM sola casi correspondió al nivel de fondo. Por el contrario, las células co-transfectadas con ambas construcciones mostraron un aumento de 20 veces la actividad de β -gal en comparación con los controles. Véase también en la Figura 6 los resultados.

50 Ejemplo 2

Corte y empalme en *trans* en el sistema modelo fluorescente

La capacidad de corte y empalme en *trans* para reparar el pre-ARNm de COL7A1 se examinó adicionalmente en un ensayo de cotransfección transitoria basado en fluorescencia. En este *modelo de corte y empalme en trans*, una proteína de fluorescencia verde (GFP) se expresa en caso de *corte y empalme en trans preciso*. Para este sistema,

los inventores construyeron un vector diana que comprende la mitad 5' de un exón GFP, el intrón 64 de COL7A1, y el exón 65 de COL7A1. La RTM consiste en un dominio de unión (diseñado al azar, véase más adelante), complementario de una secuencia del intrón 64 de COL7A1, el dominio de corte y empalme en 3' que incluye el punto de ramificación (PR) y el tracto de polipirimidina (TPP), seguido de la mitad en 3' de GFP. Aguas abajo del exón de hemi-GFP, los inventores insertaron un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y un gen de DsRed de longitud completa, que actúa como indicador de control en las células transfectadas. El corte y empalme en *trans* preciso entre la diana y la RTM en las células cotransfectadas conduce a un exón de GFP entero y funcional, que puede examinarse directamente en un microscopio de fluorescencia o en FACS.

Análisis de la restauración de la función proteica

La viabilidad del corte y empalme en *trans* del gen COL7A1 en el intrón 64 se ha demostrado en un ensayo de cotransfección en células HEK 293FT. Los inventores transfectaron de forma transitoria el vector diana que comprende la secuencia del intrón 64 y una parte de la proteína de fluorescencia verde con una sola molécula de RTM que consiste en un dominio de unión antisentido de 42 pares de bases y la segunda parte de la proteína de fluorescencia verde, así como un gen DsRed completo (GFP-PTM-1). El dominio de unión se diseñó de forma manual para unirse a través de apareamiento de bases en la región 5' del intrón. El análisis de las células cotransfectadas con un microscopio de fluorescencia 48 horas después de la transfección reveló una eficiencia del corte y empalme en *trans* de aproximadamente un 10 % de todas las células transfectadas. Véase también en la Figura 7 los resultados.

Análisis del corte y empalme en *trans* preciso a nivel de ARN

Para verificar si el corte y empalme en *trans* entre GFP-diana y GFP-PTM-1 conduce a un exón de GFP sometido correctamente a corte y empalme en *trans*, el ARN producido se examinó mediante análisis de secuenciación. Las células HEK 293FT se transfectaron con GFP-diana solos, así como se cotransfectaron con GFP-diana y GFP-PTM-1, que consiste en un DU de 43 pb para el intrón 64 de COL7A1. El ARN total se aisló 48 horas después de la transfección y el análisis de RT-PCR se realizó usando un par de cebadores específico de *cis* o específico de *trans*. La secuenciación del producto de RT-PCR sometido a corte y empalme en *trans* demostró que el corte y empalme en *trans* era preciso entre GFP-diana y GFP-RTM.

Corte y empalme en *trans* endógeno en el gen COL7A1

La construcción PTM-6 se seleccionó para la aplicación en el corte y empalme en *trans* endógeno del pre-ARNm de COL7A1 en los queratinocitos del paciente con EAD. Para lograr transfecciones eficientes de las células, los inventores clonaron el dominio de unión y los elementos de corte y empalme en 3' de PTM-6, seguido de la secuencia de ADNc de tipo silvestre del exón 65 de COL7A1 al exón 118, en el vector retroviral pLZRS-IRES-Zeo (pLZRS-PTM).

Infeción de queratinocitos humanos con el vector pLZRS-PTM

El corte y empalme en *trans* en el gen de COL7A1 endógeno se evaluó en queratinocitos deficientes en colágeno de tipo VII derivados de dos pacientes de EADR diferentes, llamados KU y RO. Los queratinocitos KU son homocigotos para una mutación sin sentido en el exón 105 de COL7A1 105 y, por lo tanto, presentan células diana óptimas para corte y empalme en *trans* en 3' en el intrón 64. Los queratinocitos RO llevan dos mutaciones sin sentido heterocigotas en los exones 14 y 104 de COL7A1. Los queratinocitos primarios KU y RO, así como los queratinocitos RO inmortalizados se infectaron con partículas de virus que codifican la RTM.

Selección de queratinocitos EADR transducidos con RTM

Después de la selección con antibióticos de queratinocitos transfectados de forma estable, se amplificaron las células para una serie de análisis para revelar el éxito del corte y empalme en *trans*. Por desgracia, los queratinocitos primarios KU transducidos y seleccionados murieron en cultivo después de pasarlos dos veces, de modo que los inventores no pudieron realizar el siguiente análisis de corte y empalme en *trans* en dichas células de los pacientes tratados. Para lograr una propagación en serie a largo plazo de los queratinocitos RO transducidos para su posterior análisis de corte y empalme en *trans*, los inventores llevaron a cabo clonación de una célula individual en conjuntos de células para aislar los queratinocitos, que muestran la diferenciación y el potencial clonogénico de células clonogénicas epidérmicas (Barrandon Y. y Green H. (1987) Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. Proc Natl Acad Sci USA 84, 2302-2306). Los inventores pudieron aislar y expandir 7 clones a partir de los queratinocitos primarios RO transducidos.

Análisis de la expresión de RTM en queratinocitos transducidos

El análisis de secuenciación del vector pLZRS-PTM antes de la infección comunicó dos polimorfismos (silenciosos) en la secuencia de codificación de COL7A1 de la RTM, que no estaban presentes en la secuencia de COL7A1 endógena de los queratinocitos RO. Esta información se utilizó para detectar a nivel de ARNm de si la RTM se expresaba en las células transducidas. Los inventores realizaron RT-PCR del ARNm preparado a partir de queratinocitos RO no transducidos y transducidos con secuenciación adyacente de la región polimórfica deseada.

La secuencia resultante de células RO transducidas con RTM y la línea celular fue homocigota para los polimorfismos. Este resultado no proporciona la información si *el corte y empalme en trans se producía* en los queratinocitos transducidos, pero confirma que la RTM se expresa de forma endógena en dichas células.

Tinción de inmunofluorescencia de células cultivadas

5 Para verificar si la expresión de proteínas en los queratinocitos transducidos podría restaurarse mediante corte y empalme en *trans*, los inventores llevaron a cabo una tinción de inmunofluorescencia del colágeno de tipo VII en los conjuntos de células cultivadas. La tinción del colágeno de tipo VII fue positiva en muchos de los queratinocitos transducidos analizados. Este experimento demostró que los queratinocitos RO deficientes en colágeno de tipo VII recuperaron su capacidad de producir una proteína de colágeno de tipo VII funcional debido al corte y empalme en *trans* preciso entre el pre-ARNm de COL7A1 endógeno y la RTM introducida.

Análisis de transferencia Western de queratinocitos invertidos

15 Los análisis de transferencia Western se realizaron para confirmar la restauración de un colágeno de tipo VII funcional en queratinocitos transducidos con RTM mediante corte y empalme en *trans*. Los análisis de inmunotransferencia se realizaron utilizando los medios de células cultivadas para detectar la expresión del colágeno de tipo VII como una proteína secretada de 290 kDa. Se pudo detectar una banda leve en el tamaño adecuado en el medio gastado de los queratinocitos de tipo silvestre cultivados utilizados como control positivo. Esta banda estaba completamente ausente en la línea celular parental de EADR RO y células primarias. Se detectó una fuerte banda específica en los queratinocitos RO invertidos inmortalizados y primarios. Estos resultados dan pruebas de que el corte y empalme en *trans* en los queratinocitos RO infectados con RTM da lugar a la expresión de la proteína del colágeno de tipo VII de 290 kDa.

Tinción de inmunofluorescencia de equivalentes de piel generados

25 En la siguiente etapa, los inventores construyeron equivalentes de la piel (EP) para comprobar si los queratinocitos invertidos recuperaban su capacidad de secretar y depositar colágeno de tipo VII en la unión dermo-epidérmica. Los inventores prepararon pieles artificiales mediante la siembra de queratinocitos invertidos sobre una matriz de fibrina que contiene fibroblastos de EADR deficientes en colágeno de tipo VII humano. Para un control negativo, los inventores construyeron EP con los queratinocitos RO inmortalizados no transducidos parentales y para un control positivo los inventores sembraron queratinocitos de tipo silvestre sobre una matriz de gel de fibrina con fibroblastos de tipo silvestre embebidos. La tinción inmunofluorescente de los EP utilizando un anticuerpo anti-colágeno de tipo VII se realizó cuatro semanas después de levantar la piel a la interfaz de aire-líquido. La tinción del colágeno de tipo VII en equivalentes de piel compuestos por conjuntos celulares de queratinocitos RO primarios transducidos (Fig. 8 C), así como el clon 1 de las células RO transducidas (datos no mostrados) fue positiva, lo que indica el depósito de colágeno de tipo VII en la membrana basal.

35 Como puede verse a partir de los experimentos anteriores, la presente invención permite el uso de una RTM de la presente invención derivada del grupo de CFTR, integrinas, TNF-alfa, interleucinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas, calicreínas, metaloproteinasas de la matriz, queratinas, colágenos, y laminina para el tratamiento de la epidermolisis ampollosa y enfermedades relacionadas, tales como distrofia muscular, cáncer y síndrome de Ehlers-Danlos (véase Pfindner, E.; Uitto, J.: Plectin gene mutations can cause epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J. Invest. Derm.* 124: 111–115, 2005, y las referencias citadas en la misma, Varki, R.; Sadowski, S.; Uitto, J.; Pfindner, E.: Epidermolysis bullosa. Type VII collagen mutations and phenotype-genotype correlations in the dystrophic subtypes. *J. Med. Genet.* 44: 181–192, 2007, 2007 y las referencias citadas en la misma; Jonkman, M. F.; Pas, H. H.; Nijenhuis, M.; Kloosterhuis, G.; van der Steege, G.: Deletion of a cytoplasmic domain of integrin beta-4 causes epidermolysis bullosa simplex. *J. Invest. Derm.* 119: 1275–1281, 2002, y las referencias citadas en la misma, y Wally V, Klausegger A, Koller U, Lochmüller H, Krause S, Wiche G, Mitchell LG, Hintner H, Bauer JW. 1: *J Invest Dermatol.* 5' trans-splicing repair of the PLEC1 gene. 2008 Mar; 128(3): 568–74. Publicación electrónica de 8 de noviembre de 2007, en particular para corte y empalme en 5'; Hengge UR. SMART technology enables gene expression repair in skin gene therapy. *J Invest Dermatol.* 2008 Mar; 128(3): 499–500). Los datos apoyan adicionalmente y permiten una función similar de los genes que se encuentran en el mismo grupo (véanse las tablas anteriores) como los genes de queratina 5, laminina A3, B3, g2, integrina β 4 y α 6 en la epidermolisis ampollosa y enfermedades relacionadas, tales como enfermedades de adhesión a la piel.

50 Basado en la divulgación anterior y las referencias citadas en el presente documento, el experto podrá fácilmente diseñar y utilizar construcciones de RTM similares a las de ejemplo descritas anteriormente con el fin de proporcionar moléculas de RTM eficaces para el tratamiento de enfermedades que están relacionadas con genes de mamíferos del grupo de CFTR, integrinas, TNF-alfa, interleucinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas, calicreínas, metaloproteinasas de la matriz, queratinas, colágenos, lamininas y, como se ha descrito anteriormente.

55

Ejemplo 3**Corte y empalme en *trans* eficiente en el exón 9 de PLEC1 y el exón 52 de COL17A1, en comparación con la eficiencia del corte y empalme intrónico/exónico.**

5 Se utilizó un sistema indicador fluorescente para identificar las RTM más funcionales específicas del exón/intrón 9 de PLEC1 y el exón/intrón 52 de COL17A1, en el que se estableció un sistema de cribado generado por una molécula diana específica del intrón y una biblioteca de PTM. La RTM contiene un dominio de unión variable que se aparea con el intrón diana o el exón aguas arriba, de modo que se induce la recombinación de los pre-ARNm mediante corte y empalme en *trans* (véase la Figura 9).

10 La evaluación de la *eficiencia* del corte y empalme en *trans* se realizó mediante análisis FACS y PCR en tiempo real. Al menos dos días después de la introducción de las moléculas de cribado en las células HEK293, el análisis por microscopia de fluorescencia y "clasificación de células activadas por fluorescencia" (FACS) reveló la funcionalidad de las RTM de acuerdo con sus propiedades de unión al intrón diana. La expresión de GFP debe representar la cantidad total de los acontecimientos de corte y empalme en *trans* específicos, mientras que la expresión de dsRED se correlacionó con los acontecimientos de corte y empalme en *trans* no específicos. Además del análisis FACS, la funcionalidad de las RTM con un comportamiento de unión diferente al del intrón diana puede investigarse a nivel de ARNm mediante PCR en tiempo real. Las recombinaciones inducidas mediante corte y empalme en *trans* del ARN de la molécula diana y la RTM condujeron a la fusión de la parte de GFP en 5' de la PTM a la parte de GFP en 3' de la molécula diana. Por tanto, la amplificación de las moléculas de ARNm de fusión de GFP incorpora la eficiencia del corte y empalme en *trans* de RTM individuales.

20 PLEC1

Después de una evaluación de la eficiencia del corte y empalme en *trans* mediante análisis FACS después de una doble transfección de células HEK293 con una sola RTM y la molécula diana, se encontró sorprendentemente que la eficiencia para la construcción de PTM2 (específica del exón/intrón 9 de PLEC1) fue del 89 % (es decir, el 89 % de las células transfectadas con RTM expresaba GFP), mientras que la eficiencia para la construcción PTM13 (específica para el exón 9 de PLEC1) fue del 99 % (es decir, el 99 % de las células transfectadas con RTM expresaban GFP).

30 Como resultado, las RTM más eficientes, identificadas por "clasificación de células activada por fluorescencia" (FACS) son capaces de inducir corte y empalme en *trans* endógeno a nivel del pre-ARNm manifestado en la fusión del pre-ARNm de GFP dividido con la secuencia exónica en 3' del gen diana PLEC1 (véanse las Figuras 10 y 11 para las posiciones y los resultados de los clones).

COL17A1

35 Similar a PLEC1, después de una evaluación de la eficiencia del corte y empalme en *trans* mediante análisis FACS después de una doble transfección de células HEK293 con una sola RTM y la molécula diana, se encontró sorprendentemente que la eficiencia para la construcción de PTMN4 (específica del intrón 52 de COL17A1) fue del 79 % (es decir, el 79 % de las células transfectadas con RTM expresaba GFP), mientras que la eficiencia para la construcción PTMN9 (específica para el exón 52 de COL17A1) fue del 99 % (es decir, el 99 % de las células transfectadas con RTM expresaba GFP).

40 Como resultado, las RTM más eficientes, identificadas por "clasificación de células activada por fluorescencia" (FACS) son capaces de inducir corte y empalme en *trans* endógeno a nivel del pre-ARNm manifestado en la fusión del pre-ARNm de GFP dividido con la secuencia exónica en 3' del gen diana COL17A1 (véase la Figura 12 para las posiciones de los clones). Ambos genes y experimentos proporcionan una prueba de concepto de que las secuencias exónicas proporcionan un punto de partida más potente y eficaz para las RTM de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo 4**45 Corte y empalme en *trans* endógeno del gen de ICAM-1 a IL-10**

La figura 13 muestra una visión general esquemática de la construcción como se produce según este ejemplo. La construcción de la RTM endógena se utilizó para analizar los dominios de unión más eficientes y los elementos de corte y empalme para la regulación por disminución de la expresión de ICAM-1 y la producción endógena de la citocina IL-10.

50 18 horas después de la transfección de células con un vector que contiene RTM o un vector simulado HaCaTs se estimularon con TNF-alfa e IFN-gamma para expresar ICAM-1. Tras otras 26 horas se realizaron PCR en tiempo real con el fin de detectar la expresión endógena de ICAM-1. Adicionalmente se realizaron ensayos de ELISA con IL-10. Los resultados se muestran en las tablas 12 y 13, respectivamente.

Tabla 12 Transfección del vector que contiene una RTM con un dominio de unión para el intrón 1 de ICAM-1 fusionado a IL-10 produce regulación por disminución de ICAM-1: Resultados de PCR en tiempo real

	endog. RTM sin DU con IL-10 26 horas	simulado (MCS, IRES, enlazador)_26 horas	endog. RTM 56_26 horas	endog. RTM 18_26 horas
ICAM delta ct	20,43	22,15	22,84	23,16
ICAM delta delta	1,72	0,00	-0,70	-1,02
Cantidad de cambios	3,29	1,00	0,62	0,49

5 **Tabla 13 Transfección del vector que contiene una RTM con un dominio de unión para el intrón 1 de ICAM-1 y un ADNc de codificación conduce a la expresión de la proteína IL-10: Resultados del ensayo ELISA de IL-10**

	Sobrenadante 11	Sobrenadante 12	Sobrenadante 13	Sobrenadante 14
	endog. RTM sin DU /con IL-10 26 horas	Simulado 26 horas	endog. RTM 56_26 horas	endog. RTM 18_26 horas
DO	0,054	0,033	0,189	0,063
DO-LW (0,049)	0,005	-0,016	0,14	0,014
IL-10 [ng/ul]	0	0,00	164,56	7,0625

Leyendas de la tabla:

10 Simulado: Transfección con el vector que solo contiene múltiples sitios de clonación (MSC), sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y enlazador
 DO: densidad óptica
 DO-LW: valor básico de la densidad óptica

15 LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Johann Bauer

<120> Moléculas de molécula corte y empalme en *trans* de pre-ARNm (RTM) mejoradas y sus usos

20 <130> FB24208

<150> EP 08013671.6
 <151> 30-07-2008

25 <160> 29

<170> PatentIn versión 3.4

30 <210> 1
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 1
 ggatccgtaa acccactggc tgcaatg 27

<210> 2
 <211> 27
 <212> ADN
 40 <213> *Homo sapiens*

ES 2 579 477 T3

<400> 2
 ggttacctgg aggagaggaa gggaaga 27

 5 <210> 3
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 10 <400> 3
 ccgtccccac ccacctgcac agctcttccc ttcctctct ccag 44

 <210> 4
 <211> 27
 <212> ADN
 15 <213> *Homo sapiens*

 <400> 4
 gagaacatta ttatagcgtt gctcgag 27

 20 <210> 5
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 25 <400> 5
 tcttctttt ttctg 16

 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 30 <213> *Homo sapiens*

 <400> 6
 caccatggtg agcaaggg 18

 35 <210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 40 <400> 7
 gatatctctt acctcggcgc gactt 25

 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 45 <400> 8
 gatatcgtga gtgtgtccag ggca 24

 <210> 9
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 50 <400> 9
 gcggccgcct tcctcccgtc ttctcc 26

 <210> 10
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 55 <400> 10
 ggtacctctt cttttttc tgcaggtgaa gttcgagggc gat 43

 60 <400> 10
 ggtacctctt cttttttc tgcaggtgaa gttcgagggc gat 43

 65 <400> 10
 ggtacctctt cttttttc tgcaggtgaa gttcgagggc gat 43

ES 2 579 477 T3

<210> 11
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 11
 aagcttacac cagacaagtt ggtaatg 27
 <210> 12
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 10
 <400> 12
 caccgaattc atc gatgta acgagaacat tattatagcg ttg 43
 <210> 13
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 20
 <400> 13
 gctcacttgt acagct 16
 <210> 14
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 14
 ggatccgata tcatccgcc ctcctc 26
 <210> 15
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 15
 cccgggaggt tgggccata ttatcatc 28
 <210> 16
 <211> 222
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 16
 ctctctcccg tcttctccag ggtccccaggt ttctccctgt gggcagagga ctcacatcag 60
 cccaaacatt cactggtgtc tggctgcaag acactacctt gctagatttc agatgactgt 120
 gactgtatct ctgtgctgt agctatggtt gtgtgtgtct tggagcatgg cctgtggccg 180
 tctgagtgag ctgctacatg tctaggggtg tgcctgcata gg 222
 50
 <210> 17
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <400> 17
 aacgagaaca ttattatagc gttgctcgag 30
 <210> 18
 <211> 16

	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 18 tctctttt ttctg	16
	<210> 19	
	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 19	
	gccactacgg caagc	15
	<210> 20	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 20	
	ccgtctctc cagggtc	17
	<210> 21	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 21	
	agacggcatc gcagcttg	19
	<210> 22	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 22	
	tctagagaat tctcagtct gggcagtacc tg	32
	<210> 23	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 23	
	atgtctgaga gggccag	18
	<210> 24	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 24	
	ctctgctcc tgtccacc	19
	<210> 25	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 25	
	caagggtgac cagggcga	18
	<210> 26	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 26	
	<210> 26	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 26	
	<210> 26	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 26	
	<210> 26	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 26	
	<210> 26	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<400> 26	
	<210> 26	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 579 477 T3

<400> 26
 ccaaggagct tcagggtcc 19

5
 <210> 27
 <211> 141
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10
 <400> 27
 ccaaaggact cctccagac actcatggag ggagtctttt ttctttttct ttttcggaga 60
 gacggatatca gccactgca gcctggacct cctggactca agcgatcctc ccatctcagc 120
 cttctgcata gctggaacta c 141

15
 <210> 28
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 28
 ctggagggga acctgcgttc ctcaaaggcg gccgtgtggt gtcgcatcca ctgaagcagc 60
 agcagcacca gctcccggta ctctgccag cgcagctgca g 101

25
 <210> 29
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 29
 tccagcaaag tcagctccca atagtcggcc attgccagca tacatgccgc cttctgctgc 60
 tgccccatag cctccgcctg ggccgatgtc agtgccatag ggacccctgt ctctgcagc 120
 ttcactaaag gcaccgcctg caccagggga gcctgcacca cctcctcctg tgctcatgga 180
 agagctgtag gagctgcccc gcctgacaga tgagctgtgt gaggaggagt tgctaccca 240
 actgtgggag gcatccgtgg acaggaggcg gctgtcccca gggggtcctt gcggcccagg 300
 agggcctggg gggcc 315

30

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de corte y empalme en *trans* de pre-ARNm (RTM), que comprende:
 - a) al menos un dominio de unión que dirige la unión de la molécula de ácido nucleico a un pre-ARNm expresado dentro de una célula; en el que dicho dominio de unión consiste en una secuencia que es complementaria a una secuencia de exón de mamífero,
 - b) al menos un dominio de corte y empalme que contiene motivos necesarios para que se produzca *la reacción de corte* y empalme en *trans*, y
 - c) al menos un dominio codificante, en el que dicho dominio codificante codifica al menos un exón de un gen de mamífero seleccionado del grupo de CFTR, integrinas, TNF-alfa, interleucinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas, calicreínas, metaloproteinasas de matriz, queratinas, colágenos, y lamininas.
2. La RTM de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho dominio de unión es una secuencia complementaria a un exón de un gen de mamífero.
3. La RTM de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el gen se selecciona del grupo de los genes plectina, queratina 14, queratina 5, queratina 6, colágeno de tipo 7, colágeno de tipo 17, laminina A3, laminina B3, g2, la integrina $\beta 4$, $\alpha 6$, CFTR, ICAM-1, e interleucina-10 (IL-10), preferiblemente al menos uno de plectina, queratina 14, COL7A1, COL17A1 e IL-10, en la que dichos genes se expresan en células de la piel.
4. La RTM de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha RTM comprende un dominio codificante de los exones x a y, en la que x es un número entero seleccionado de 1 o 2 al número máximo de exones, e y es un número entero seleccionado de 0 y x + 1, estando x + 1 limitado por el número máximo de exones de dicho gen.
5. La RTM de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende además al menos una secuencia de seguridad en dicho dominio de corte y empalme y/o al menos una secuencia complementaria a las secuencias de exones adyacentes.
6. La RTM de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la unión de la molécula de ácido nucleico al pre-ARNm diana está mediada por la complementariedad, la formación de una triple hélice o la interacción proteína-ácido nucleico.
7. La RTM de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el exón que se va a someter a corte y empalme en *trans* comprende codones de terminación de origen natural o introducidos artificialmente con el fin de reducir la expresión génica o contiene otras secuencias que producen un efecto similar al ARNi.
8. La RTM de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además una UTR en 3' que mejora la eficiencia del corte y empalme en *trans*, la expresión o la estabilidad del ARN.
9. Un vector de expresión recombinante, que comprende una RTM de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. El vector de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho vector es un vector de expresión eucariota, preferiblemente un vector que comprende secuencias derivadas de virus.
11. El vector de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en el que dicho vector comprende además células de la piel y preferiblemente elementos reguladores específicos de queratinocitos o de células endoteliales para la regulación de la expresión del transgén.
12. Una célula de la piel recombinante aislada, preferiblemente un queratinocito, un fibroblasto o una célula endotelial recombinante, que comprende una molécula de RTM de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o un vector de expresión recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.
13. Una preparación farmacéutica, que comprende un vehículo fisiológicamente aceptable y la molécula de RTM de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, el vector de expresión recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, o la célula de la piel recombinante de acuerdo con la reivindicación 12.
14. Una molécula de RTM de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, el vector de expresión recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, la célula de la piel recombinante de acuerdo con la reivindicación 12, o la preparación farmacéutica según la reivindicación 13 para su uso como medicamento.
15. Uso de una molécula de RTM de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, el vector de expresión recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, la célula de la piel recombinante de acuerdo con la reivindicación 12, o la preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 para la producción de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada de trastornos genéticos de la piel y del epitelio, tales como epidermólisis ampollosa, fibrosis quística, paquioniquia congénita, enfermedades inmunológicas, tales como psoriasis o neurodermitis, y cánceres de la piel, en el que dicho medicamento se aplica preferiblemente a la

piel o a la circulación sistémica.

Figura 1

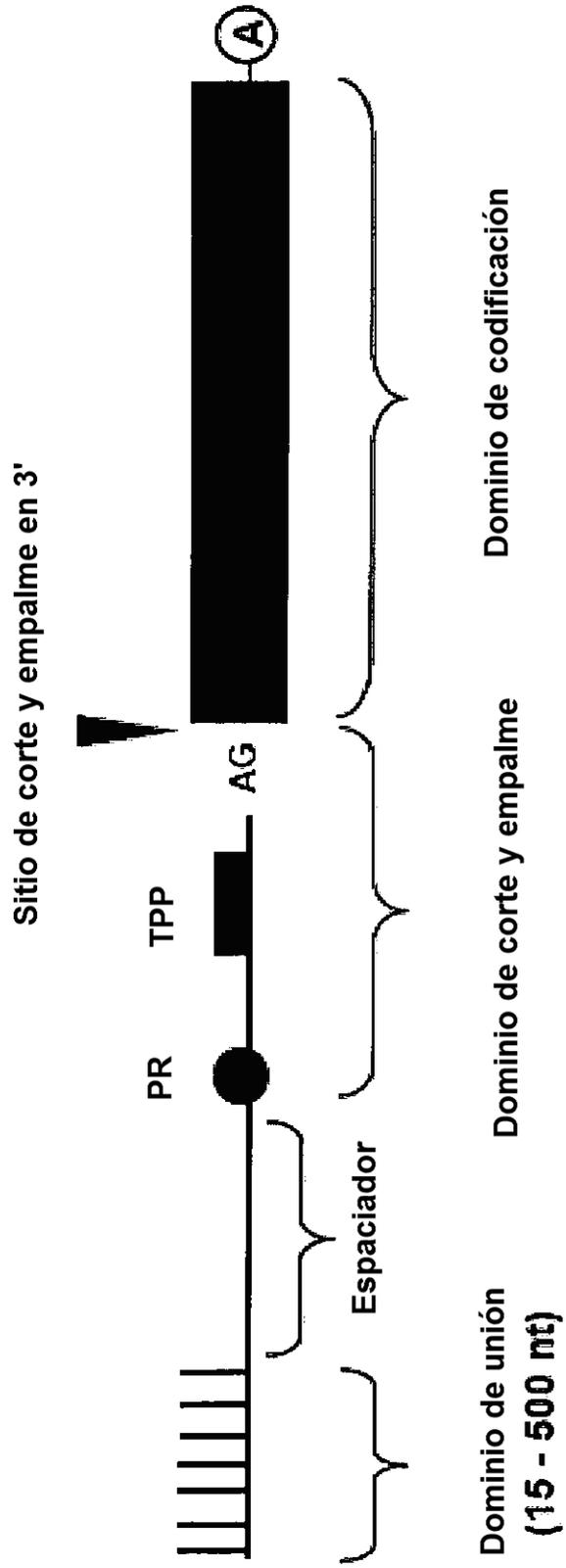


Figura 2

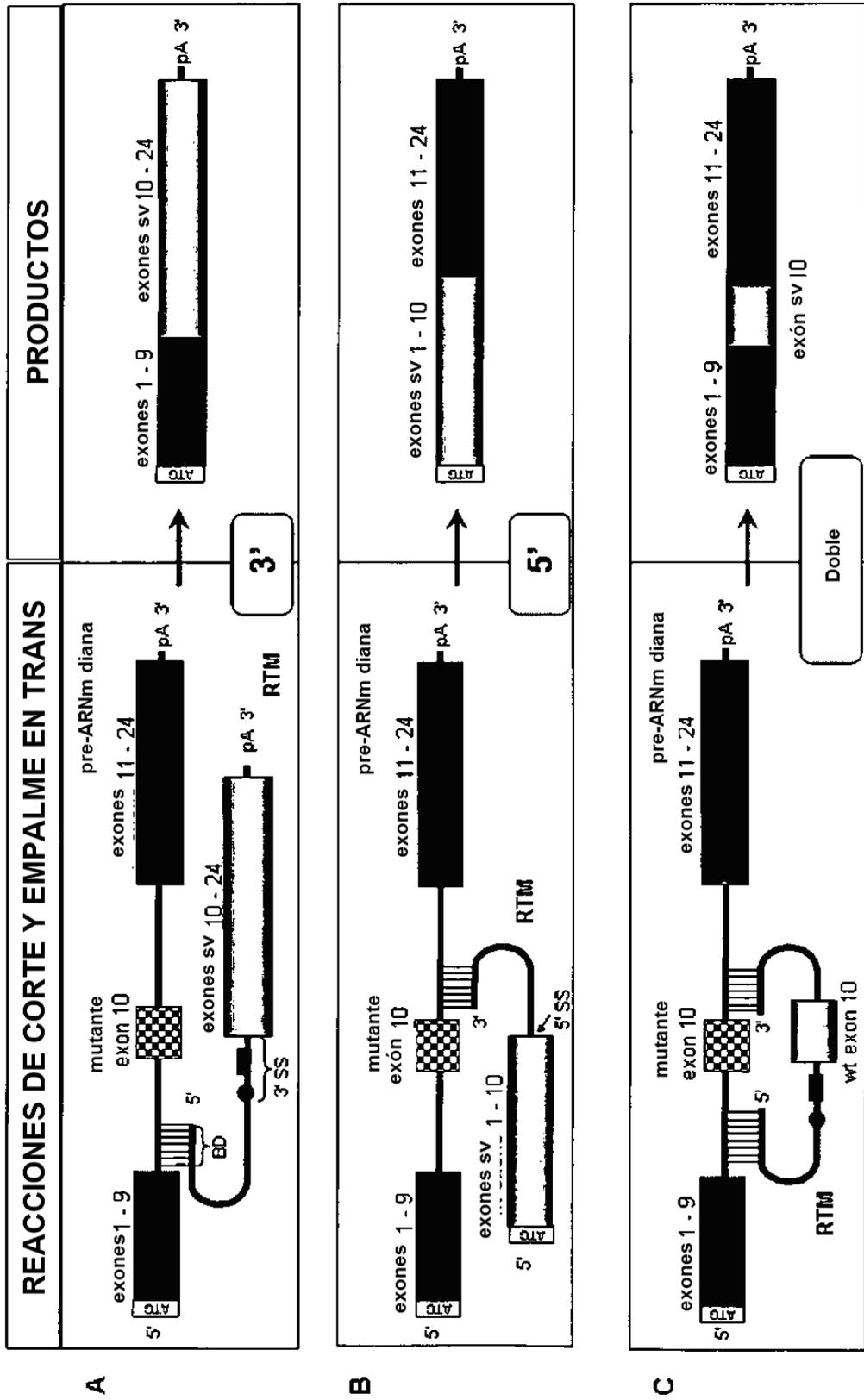


Figura 3

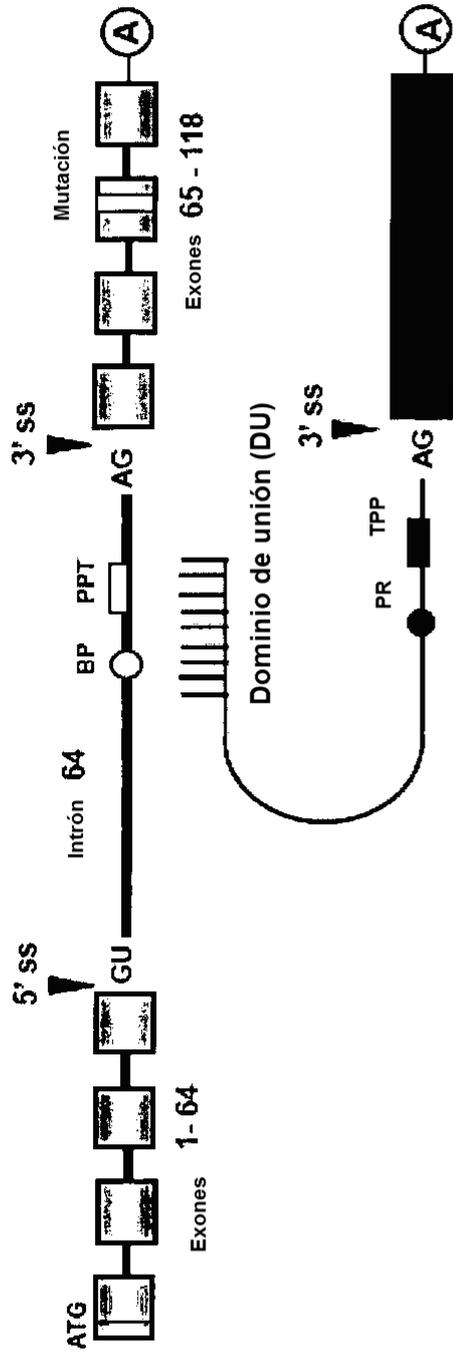


Figura 4

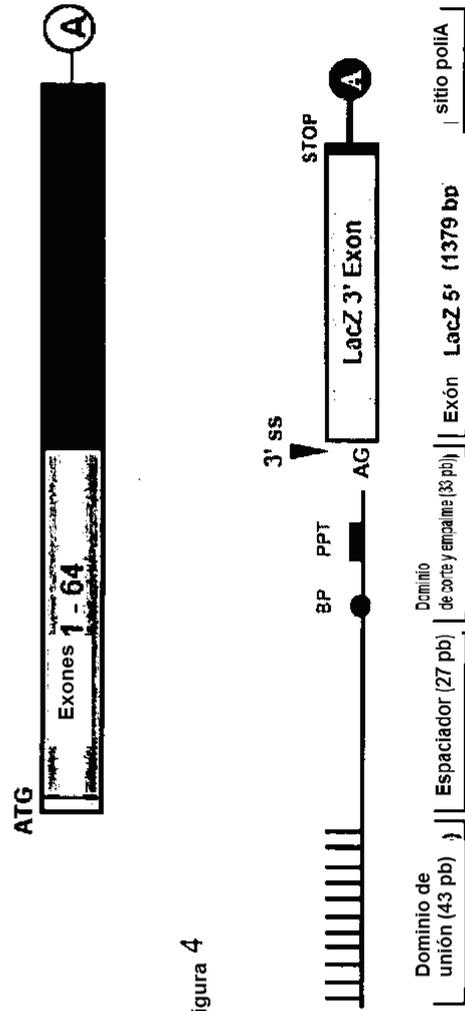


Figura 5

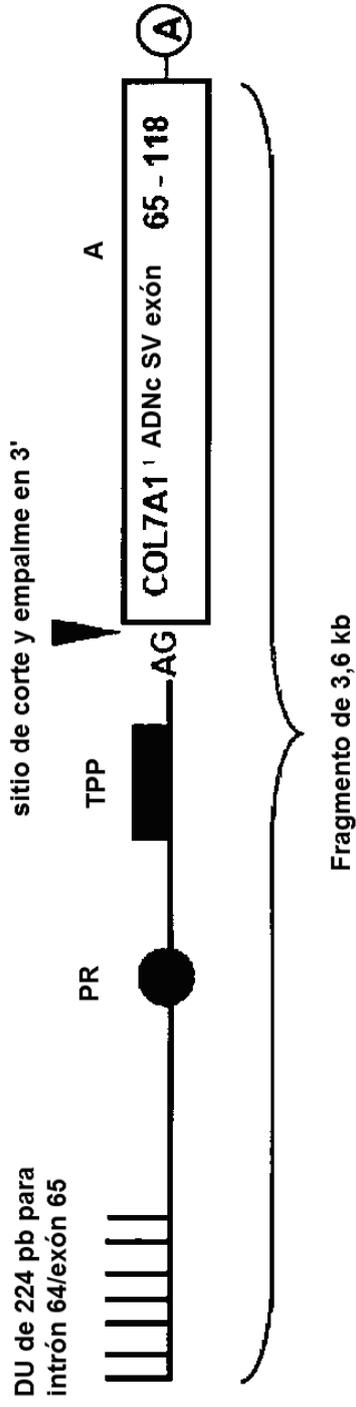


Figura 6

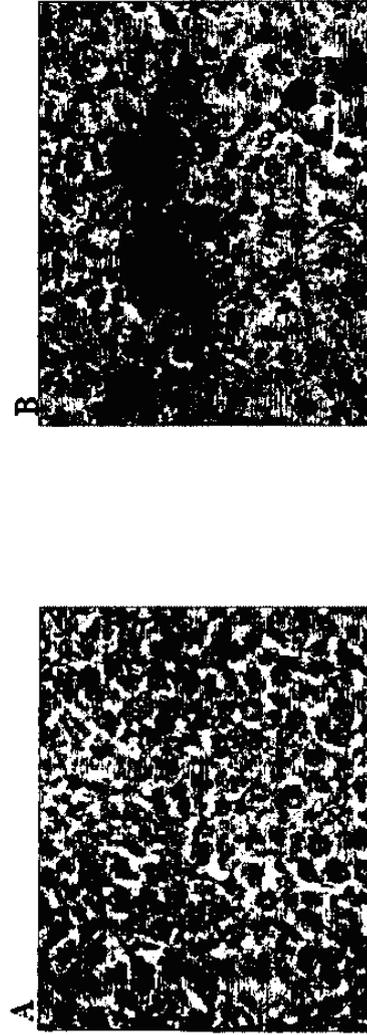


Figura 7



Figura 8

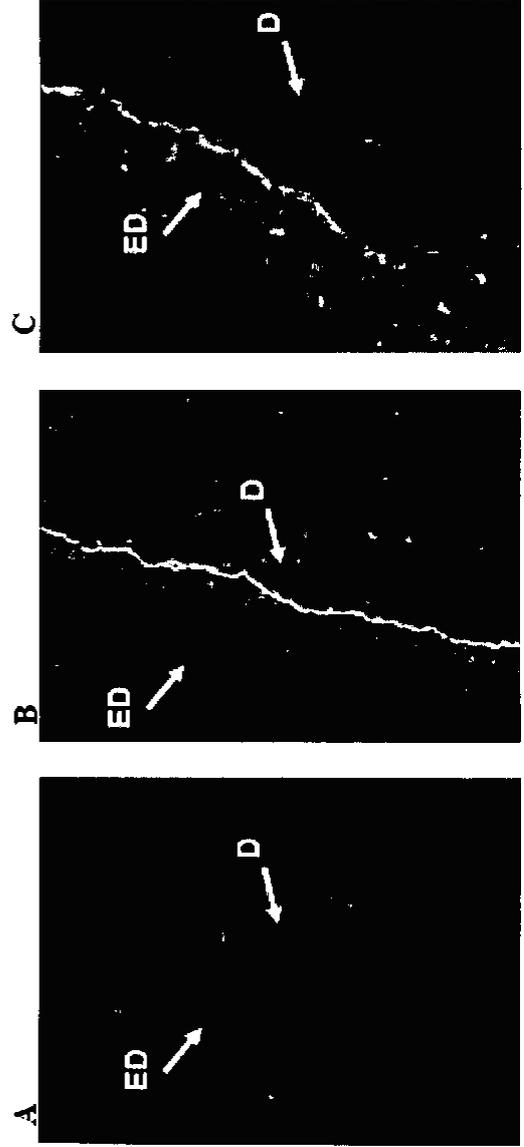


Figura 9

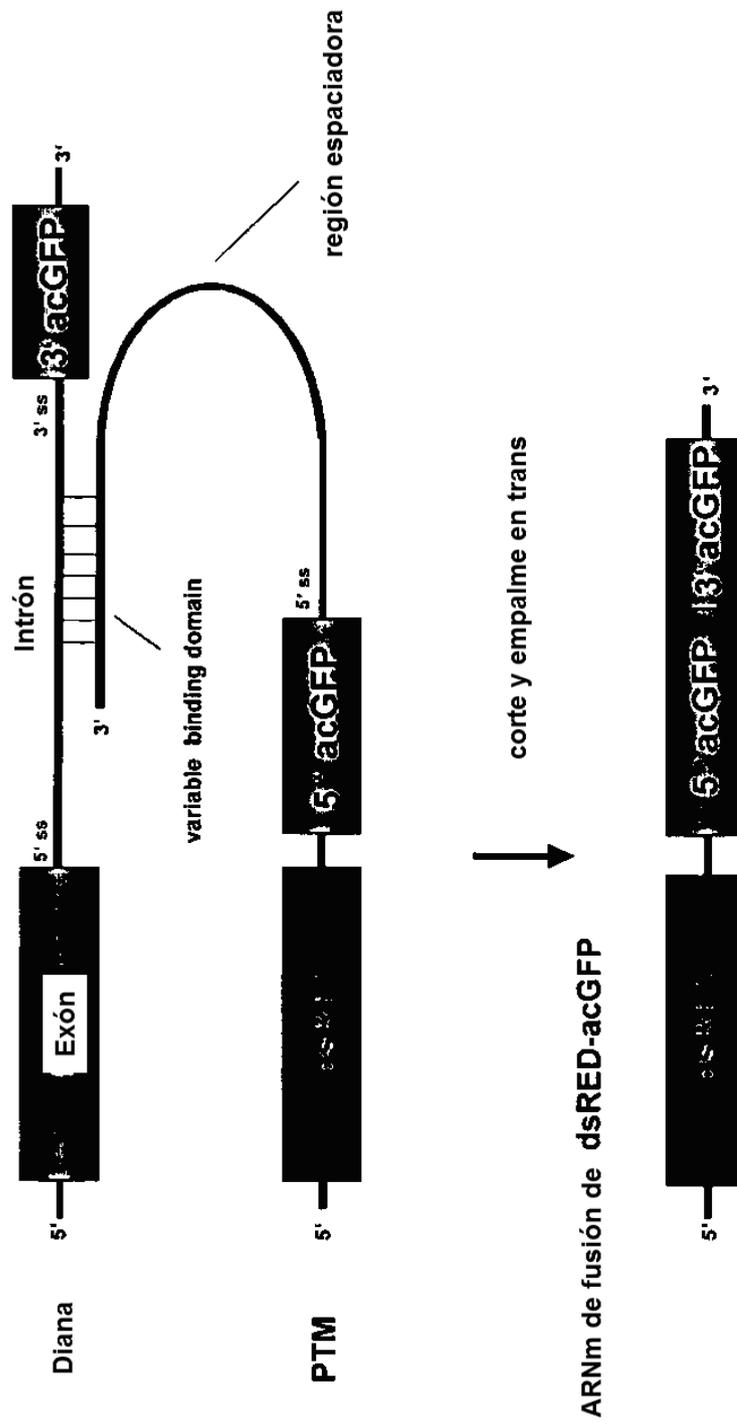


Figura 10

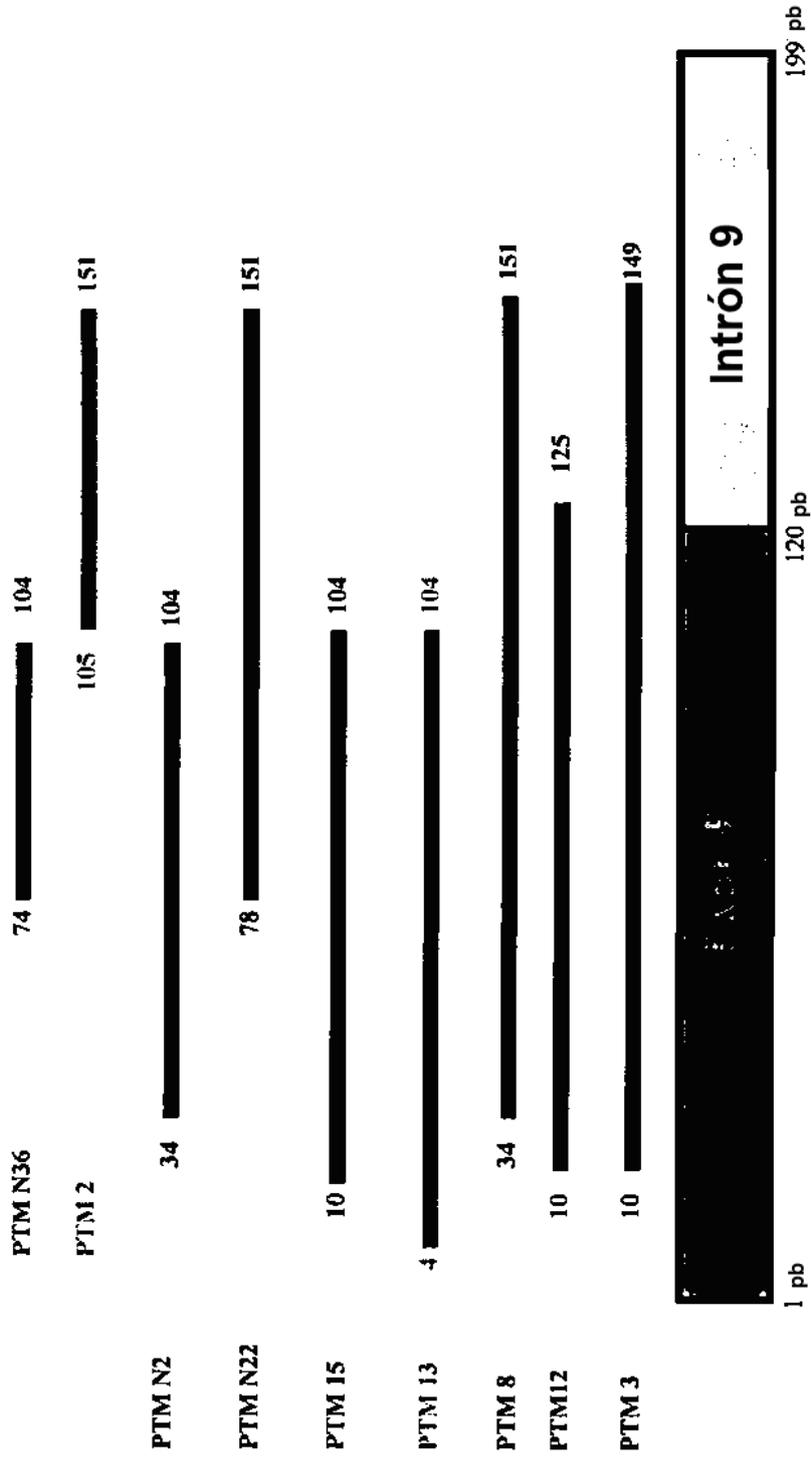


Figura 11

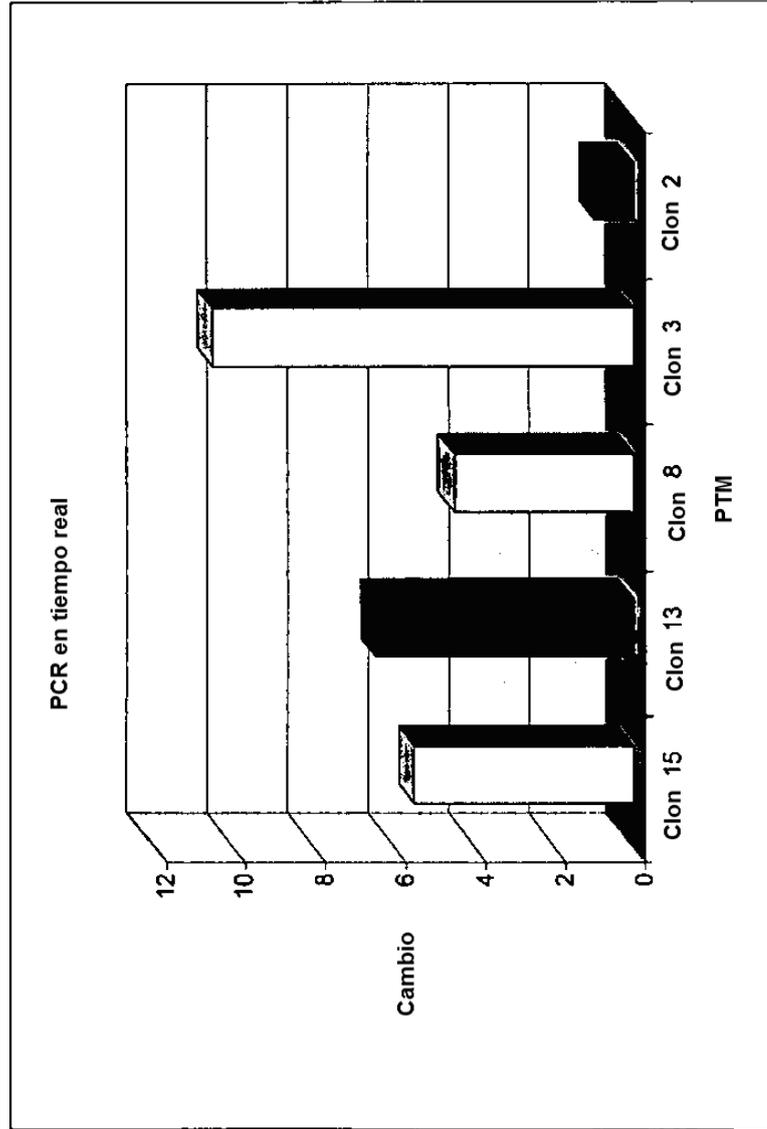


Figura 12

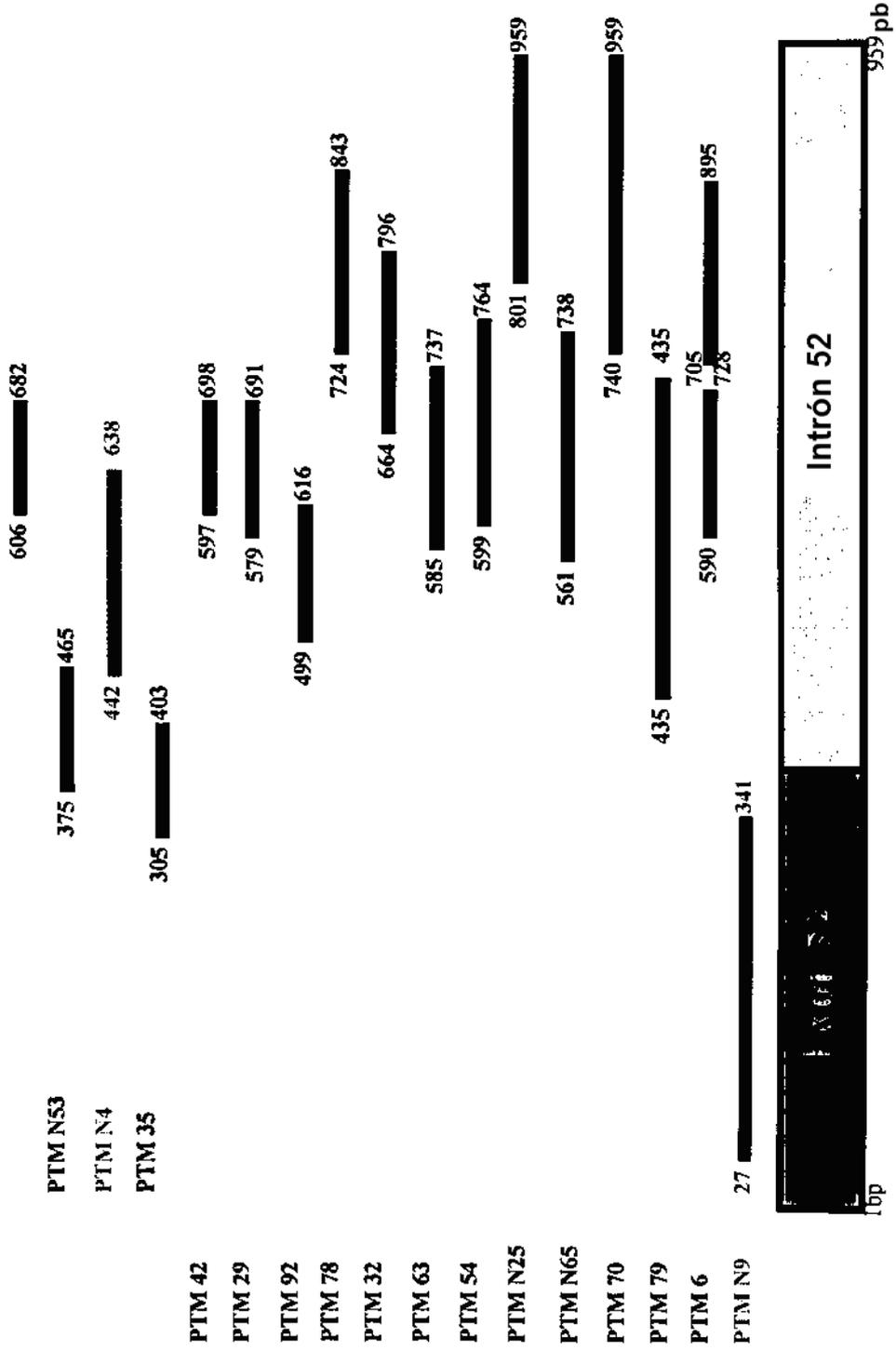


Figura 13

