

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 856**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2013 E 13760133 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2852668**

54 Título: **Oligonucleótidos para realizar un cambio en la secuencia de una molécula de ARN diana presente en una célula viva**

30 Prioridad:

12.07.2012 US 201261670681 P
26.10.2012 US 201261718801 P
03.05.2013 EP 13166465
18.06.2013 EP 13172515
26.06.2013 EP 13173818

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.09.2016

73 Titular/es:

PROQR THERAPEUTICS II B.V. (100.0%)
Darwinweg 24
2333 CR Leiden, NL

72 Inventor/es:

DE BOER, DANIEL ANTON y
RITSEMA, TITA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 584 856 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).

Oligonucleótidos para realizar un cambio en la secuencia de una molécula de ARN diana presente en una célula viva

Descripción

5

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención está relacionada con el campo de la terapia génica y, más específicamente, con los oligonucleótidos utilizados para realizar un cambio en la secuencia de una molécula de ARN diana presente en una célula viva.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Numerosas enfermedades genéticas están causadas por mutaciones en el genoma. Se han encontrado diversos tipos de modificaciones que causan mutaciones en el genoma: la supresión de uno o varios pares de bases, uno o más desajustes en la secuencia del gen, la inserción de uno o varios nucleótidos, o la repetición reiterativa de tripletes y la ausencia o la duplicación de un gen completo o de una parte de él.

15

[0003] Las enfermedades genéticas provocadas por el desajuste (o incompatibilidad), la supresión o la inserción de uno o varios pares de bases incluyen fibrosis quística, distrofia muscular, anemia de células falciformes, hemofilia, beta-talasemia y síndrome del X frágil (SXF).

20

[0004] La reparación de ARN puede usarse para reparar defectos genéticos a nivel del ARN.

[0005] Los oligonucleótidos y sus compuestos se han utilizado como moléculas terapéuticas para reparar modificaciones de ADN (I Papaioannou, JP Simons, JS Owen 'Oligonucleotide-directed gene-editing technology: mechanisms and future prospects' Expert Opin. Biol. Ther. (2012) 12(3):329-342). Estos oligómeros pueden contener nucleótidos de ARN y/o ADN, o nucleótidos modificados de ARN o ADN. Se emplean para conseguir una reparación específica del sitio de ADN defectuoso. Se predijo que la reparación tendría lugar mediante la activación de mecanismos de reparación de ADN endógenos después del reconocimiento del desajuste introducido.

25

30

[0006] Los oligonucleótidos que forman ADN tricatenario (o de triple hélice) también se han utilizado como herramientas de secuencia específica para la técnica 'gene targeting'. Los oligonucleótidos que forman ADN tricatenario se unen con una afinidad elevada en el surco mayor de ADN bicatenario. Debido a esta característica, se ha sugerido que los oligonucleótidos que forman ADN tricatenario pueden ser herramientas útiles para las correcciones específicas del sitio de genes diana (Knauert et al., Hum Mol Genet. (2001) 10, 2243-2251; Richardson et al, 'Drug Target' (2002) 10, 133-134; Thoung et al., (1993) Angewandte Chemie. Intl. Ed. Eng., 32, 666-690.). Los métodos actuales para la reparación de genes diana no son muy eficaces, y/o no se ha demostrado que funcionen 'in situ' en células vivas, lo que deja lugar para otros mecanismos para la reparación de defectos de genes.

35

40

[0007] Se ha informado sobre la reparación de genes defectuosos a nivel del ARN. Por ejemplo, la reparación específica de ARNm mediante un complejo de oligonucleótidos duplicados ('duplexed oligonucleotides', en inglés) se utilizó para insertar nucleótidos 'in vitro' en el ARNm de CFTR con $\Delta F508$. Se ha postulado que el mecanismo que actúa es la degradación mediante la ARNasa H, seguida de la reparación del ARN (PC Zamecnik, MK Raychowdhury, DR Tabatadze, HF Cantiello 'Reversal of cystic fibrosis phenotype in a cultured $\Delta F508$ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cell line by oligonucleotide insertion' Proc Natl Acad Sci 2004 101(21) 8150-8155; WO2005094370, 'oligonucleotide complex compositions and methods of use as gene alteration tools').

45

[0008] 'Mutation Research' (2011), 717(1-2): 91-98, de Ying Shen et al., describe el uso de un oligonucleótido de ARN monocatenario, flanqueado por regiones de ADN, como una herramienta para la alteración de genes en células humanas y bacterianas.

50

DESCRIPCION DE LA INVENCION

[0009] La presente invención se define en las reivindicaciones y atañe a métodos para la reparación dirigida de genes en células vivas y, más preferiblemente, en células vivas de un organismo pluricelular ('in vivo'). Más específicamente, la invención está relacionada con la realización 'in vivo' de cambios en un ARN diana en células vivas de organismos pluricelulares, más particularmente en animales, más particularmente en mamíferos, e incluso más específicamente en humanos. A pesar de los informes previos sobre la reparación de genes en células vivas, se cree que la presente invención desvela por primera vez la posibilidad de realizar cambios 'in vivo' en una molécula de ARN diana en una célula viva, cambiando así el fenotipo de ese organismo, mediante el uso de oligonucleótidos, preferiblemente oligonucleótidos monocatenarios o de una sola hélice, más preferiblemente oligorribonucleótidos monocatenarios, e incluso más específicamente oligorribonucleótidos monocatenarios químicamente modificados. De manera sorprendente, los oligonucleótidos conformes a la presente invención pueden administrarse 'in vivo' sin pérdida de actividad y en unas cantidades que permiten recuperar sustancialmente el fenotipo enfermo del organismo tratado. La invención se ilustra mediante la administración -en el pulmón de un

55

60

65

organismo que sufre de fibrosis quística (abreviada como "CF")- de un oligorribonucleótido químicamente modificado que es capaz de restablecer la secuencia de codificación de ARN de CFTR, restableciendo así la función proteínica de CFTR y restableciendo el fenotipo de CF, o mejorando al menos las condiciones del organismo.

5 **[0010]** Durante la introducción de este oligonucleótido -preferiblemente, monocatenario antisentido- en una célula, preferiblemente en una célula de un mamífero, más preferiblemente en una célula humana, este se dirige al ARN -o a un precursor o a una plantilla del mismo-, a un lugar en el que el ARN necesita ser reparado, y actúa posiblemente como una hebra sentido ('guide strand', en inglés) para la reparación de ARN. Se desconoce el mecanismo específico de reparación, pero el oligonucleótido conforme a la presente invención, preferiblemente una molécula de
10 reparación monocatenaria, preferiblemente no asigna una función a la ARNasa H en el proceso de reparación. El cambio realizado en el ARN diana puede darse directamente a nivel del ARN o indirectamente a través del ADN, que posteriormente se transcribe en la molécula de ARN o en un precursor de esta. Generalmente, los oligonucleótidos aquí descritos hacen referencia al oligonucleótido conforme a la presente invención, y pueden utilizarse en todas las realizaciones de la presente invención.

15 **[0011]** Todas las realizaciones de la presente invención pueden usarse 'in vitro', 'in vivo' o 'ex vivo'.

[0012] De manera conveniente, la presente invención puede usarse para el tratamiento de la fibrosis quística, preferiblemente mediante la reparación de la mutación deltaF508 en el exón 10 del CFTR (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística o 'cystic fibrosis transmembrane conductance regulator', en inglés). El modo de acción de un oligonucleótido ejemplar conforme a la presente invención, la molécula representada en la SEQ ID NO: 1 (Identificador de secuencia nº 1), se representa en las figuras 1-3 y 7A. La actividad de un oligonucleótido ejemplar conforme a la presente invención, la molécula representada en la SEQ ID NO: 1 comparada con el dúplex previamente descrito (Zamecnik et al, ver más arriba), se ilustra en la figura 4. La
20 figura muestra que el oligonucleótido antisentido monocatenario (AON) descrito es al menos tan activo -y parece ser más activo- reparando CFTR como la molécula dúplex previamente descrita (PC Zamecnik, MK Raychowdhury, DR Tabatadze, HF Cantiello 'Reversal of cystic fibrosis phenotype in a cultured ΔF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cell line by oligonucleotide insertion' Proc Natl Acad Sci 2004 101(21) 8150-8155; WO2005094370, 'oligonucleotide complex compositions and methods of use as gene alteration tools'). La actividad de la SEQ ID NO: 1 se determinó utilizando el ensayo comparativo descrito en Zamecnik et al (ver más arriba); ver, entre otros, la Figura 4 en la página 8153.

[0013] La presente invención también puede usarse de manera conveniente para realizar un cambio en otra molécula de ARN diana y/o en el tratamiento de otras enfermedades relacionadas con trastornos genéticos, como -pero no limitados a- el albinismo, la deficiencia de alfa-1 antitripsina, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, el asma, la beta-talasemia, la CADASIL, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la atrofia muscular espinal distal (AMED o DSMA), la distrofia muscular de Duchenne/Becker, la epidermólisis ampollar distrófica, la epidermólisis ampollar, la enfermedad de Fabry, la poliposis adenomatosa familiar, la galactosemia, la enfermedad de Gaucher, la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la hemofilia, la hemocromatosis hereditaria, el síndrome de Hunter, la enfermedad de Huntington, el síndrome de Hurler, la enfermedad inflamatoria intestinal, el síndrome de poliaglutinación heredado, el síndrome de Lesch-Nyhan, el síndrome de Lynch, el síndrome de Marfan, la mucopolisacaridosis, la distrofia muscular, la distrofia miotónica tipo I y tipo II, la enfermedad de Niemann-Pick tipos A, B y C, el cáncer relacionado con NY-eso1, la enfermedad de Parkinson, el síndrome de Peutz-Jeghers, la fenilcetonuria, la enfermedad de Pompe, la discinesia ciliar primaria, la hipertensión pulmonar, la retinitis pigmentosa, la enfermedad de Sandhoff, la inmunodeficiencia combinada grave (SCID), la anemia de células falciformes, la atrofia muscular espinal, la enfermedad de Stargardt, la enfermedad de Tay-Sachs, la inmunodeficiencia ligada al cromosoma X, diversos tipos de cáncer (por ejemplo, cáncer de mama relacionado con BRCA1 y 2 y cáncer de ovarios), y similares.

50 **[0014]** De acuerdo con una realización preferida de la invención, el cambio en la secuencia de ARN diana comprende la inserción de uno o más nucleótidos en el ARN diana. En una realización más preferida, la inserción de uno o más nucleótidos conlleva la inserción de al menos una secuencia de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos codificada por la secuencia del ARN diana. De acuerdo con una realización más preferida, la inserción de una secuencia de aminoácidos provoca que el polipéptido codificado vuelva a ser un polipéptido de funcionamiento normal en el organismo pluricelular. Por tanto, las realizaciones preferidas de la invención son aquellas en las que la secuencia del ARN diana en un organismo pluricelular está asociada con un trastorno causado por el mal funcionamiento de la secuencia del ARN diana y el trastorno genético se selecciona del grupo de trastornos causados por las secuencias de ARN diana que carecen de uno o más nucleótidos en comparación con las secuencias de ARN diana que funcionan con normalidad. Las preferidas de acuerdo con la presente invención son aquellas secuencias de ARN diana que carecen de al menos una parte de un codón, que se restaura o restablece realizando un cambio en la secuencia de ARN utilizando un oligonucleótido conforme a la presente invención.

65 **[0015]** La presente invención demuestra que la reparación de ARN puede realizarse 'in vivo' mediante la administración sistémica de un oligonucleótido conforme a la presente invención. Dependiendo del tejido u órgano involucrados en el trastorno, o, más generalmente, en cuál se va a realizar un cambio en un ARN diana, el modo de

administración puede adaptarse para optimizar la administración del oligonucleótido conforme a la presente invención. En los trastornos pulmonares y otros males respiratorios, los oligonucleótidos conformes a la presente invención pueden administrarse, de manera conveniente, directamente en los pulmones, por ejemplo mediante inhalación. De manera alternativa, dependiendo del trastorno y/o el tejido diana, la administración puede realizarse de manera tópica (por ejemplo, en la piel) o sistémica, como intradérmicamente, subcutáneamente, intramuscularmente, de manera intravenosa, oralmente, rectalmente, intracranalmente y similares.

[0016] La invención usa oligonucleótidos monocatenarios en los que todos los nucleósidos son 2'-O alquilo ribosa ribonucleósidos. El oligonucleótido conforme a la presente invención puede comprender, por ejemplo, una inosina y/o puede comprender nucleótidos modificados, preferiblemente seleccionados de un grupo que consiste en 2'-O-metil ribosa, fosforotioato, metilfosfonato, 5-metil-dC, 2-amino-dA y C5-pirimidina. Uno de estos ejemplos preferidos de un nucleótido estabilizado es un nucleótido modificado de 2'-O-metilo. Otros medios para mejorar la estabilidad podrían ser, por ejemplo, los enlaces de fosforotioato entre nucleótidos. Los oligonucleótidos conformes a la presente invención pueden prepararse conforme a cualquier método conocido en este ámbito. Las personas versadas en la materia sabrán cómo sintetizar los oligonucleótidos conformes a la presente invención.

[0017] Por tanto, un oligonucleótido conforme a la presente invención preferiblemente está modificado químicamente para resistir las endonucleasas, exonucleasas y la ARNasa H, y para estimular la unión (de ARN) y la estabilidad de los dúplex. Las características particulares de la química (o productos químicos) elegida afectan, al menos en parte, a la administración -a un objetivo- de un oligonucleótido conforme a la presente invención: la vía de administración, la bioestabilidad, la biodistribución, la distribución intratisular, y la absorción y el tráfico celular. Además, puede usarse una mayor optimización de las características químicas del oligonucleótido para mejorar la afinidad de enlace y la estabilidad, aumentar la actividad, mejorar la seguridad y/o reducir el coste de los productos reduciendo la duración o mejorando la síntesis y/o los procesos de depuración. Existen múltiples modificaciones químicas generalmente y/o comercialmente disponibles para las personas versadas en la materia (como 2'-O-metil ARN y pirimidinas 5-sustituidas y 2,6-diaminopurinas).

[0018] Un oligonucleótido conforme a la presente invención puede tener al menos un soporte y/o al menos una modificación de la base.

[0019] Una modificación de la base incluye una versión modificada de las bases naturales de purina y pirimidina (por ejemplo, adenina, uracilo, guanina, citosina y timina), como hopxantina, ácido orótico, agmatidina, lisidina, 2-tiopirimidina (por ejemplo, 2-tiouracilo, 2-tiotimina), G abrazadera y sus derivados, pirimidina 5-sustituida (por ejemplo, 5-halouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propinilcitosina, 5-aminometiluracilo, 5-hidroximetiluracilo, 5-aminometilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, super T), 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, 7-aza-2,6-diaminopurina, 8-aza-7-deazaguanina, 8-aza-7-deazaadenina, 8-aza-7-deaza-2,6-diaminopurina, super G, super A y N4-etilcitosina, o derivados de estos compuestos; N²-ciclopentilguanina (cPent-G), N²-ciclopentil-2-aminopurina (cPent-AP) y N²-propil-2-aminopurina (Pr-AP), o derivados de estos compuestos; y bases degeneradas o universales, como 2,6-difluorotolueno o bases ausentes como sitios abásicos (por ejemplo, 1-deoxirribosa, 1,2-dideoxirribosa, 1-deoxi-2-O-metilribosa; o derivados de pirrolidina en los que el oxígeno del anillo se ha sustituido con nitrógeno (azarrubosa)). Se pueden encontrar ejemplos de derivados de Super A, Super G y Super T en la Patente de EE UU 6,683,173 (Epoch Biosciences). 'cPent-G, cPent-AP and Pr-AP were shown to reduce immunostimulatory effects when incorporated in siRNA' (Peacock H. et al. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200).

[0020] Una modificación del azúcar incluye una versión modificada del 2'-O-alquilo de la fracción o parte ('moiety', en inglés) de ribosilo, por ejemplo, 2'-O-metilo, 2'-O-(2-cianoetilo), 2'-O-(2-metoxi)etilo (2'-MOE), 2'-O-(2-tiometil)etilo, 2'-O-butililo, 2'-O-propargilo, 2'-O-alilo, 2'-O-(2-amino)propilo, 2'-O-(2-(dimetilamino)propilo), 2'-O-(2-amino)etilo, 2'-O-(2-(dimetilamino)etilo); 2'-deoxi (ADN); 2'-O-(haloalcoxi)metilo (Arai K. et al. Bioorg. Med. Chem. 2011, 21, 6285), por ejemplo, 2'-O-(2-cloroetoxi)metilo (MCEM), 2'-O-(2,2-dicloroetoxi)metilo (DCEM); 2'-O-alcoxycarbonilo, por ejemplo, 2'-O-[2-(metoxycarbonil)etilo] (MOCE), 2'-O-[2-(N-metilcarbamoil)etilo] (MCE), 2'-O-[2-(N,N-dimetilcarbamoil)etilo] (DCME); y sus derivados. Otra modificación incluye ácido nucleico 'puenteado' o 'bicíclico' (BNA), por ejemplo, ácido nucleico 'cerrado' (LNA), *xil*-LNA, α -L-LNA, β -DLNA, cEt (2'-O,4'-C etilo limitado) LNA, cMOEt (2'-O,4'-C metoxietilo limitado) LNA, ácido nucleico puenteado con etileno (ENA), ADN tricíclico; y sus derivados. La invención también abarca la introducción de más de una modificación del azúcar diferente en un oligonucleótido conforme a la invención. Los derivados de BNA, por ejemplo, se describen en WO 2011/097641.

[0021] Una modificación del esqueleto o estructura central ('backbone', en inglés) incluye una versión modificada del fosfodiéster, como fosforotioato (PS), fosforotioato quiralmente puro, fosforditioato (PS2), fosfonoacetato (PACE), fosfonoacetamida (PACA), tiofosfonoacetato, tiofosfonoacetamida, profármaco de fosforotioato, H-fosfonato, metil fosfonato, metil fosfonotioato, metil fosfato, metil fosforotioato, etil fosfato, etil fosforotioato, borano fosfato, boranofosforotioato, metil boranofosfato, metil boranofosforotioato, metil boranofosfonato, metil boranofosfonotioato, y sus derivados. Otra modificación incluye fosforamidita, fosforamidato, N3'→P5' fosforamidato, fosfordiamidato, fosfortiodiamidato, sulfamato, dimetilenesulfóxido, sulfonato, triazol, oxalilo, carbamato, metileneimino (MMI), y ácido nucleico de tioacetamida (TANA); y sus derivados. La invención también abarca la introducción de más de una modificación diferente del esqueleto en un oligonucleótido conforme a la invención.

- 5 **[0022]** Un oligonucleótido conforme a la invención contiene una secuencia complementaria al ARN diana que se va a reparar y codifica preferiblemente la secuencia de polipéptidos de tipo natural (de tipo natural=WT). Por lo tanto, debido a la degeneración de los codones, el oligonucleótido puede comprender uno o más codones degenerados complementarios. Los nucleótidos complementarios pueden estar presentes en cualquier lado del sitio que se va a reparar, es decir, la secuencia que flanquea la secuencia que se va a alterar está, preferiblemente, en el sitio 3' o 5' o en ambos sitios 3' y 5' de la secuencia que se va a alterar. La reparación de ARN se activa mediante el emparejamiento de bases de estas secuencias complementarias.
- 10 **[0023]** Preferiblemente, la secuencia del ARN diana difiere de la secuencia reparada o de tipo natural. El ARN diana no reparado es preferiblemente una secuencia mutada. Preferiblemente, la mutación es una sustitución, supresión (o eliminación) o inserción de una secuencia normal de tipo natural. El ARN diana reparado es preferiblemente una secuencia de tipo natural de un gen u otra secuencia de referencia deseada.
- 15 **[0024]** Un oligonucleótido conforme a la presente invención tiene, preferiblemente, una longitud de 15 a 100 nucleótidos y tiene, preferiblemente, una longitud de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ó al menos 40 nucleótidos, al menos 10 de los cuales son complementarios a la secuencia del ARN diana. Se pueden usar otros nucleótidos como plantilla (o inductor) para la reparación. El emparejamiento de bases con la secuencia del ARNm diana ocurre preferentemente en la célula. La célula puede ser una célula de mamífero y puede estar presente en un cultivo celular ('in vitro') o dentro de un cuerpo ('in vivo').
- 20 **[0025]** La presente invención está relacionada preferiblemente con un método para tratar la fibrosis quística, de manera que el trastorno genético es preferiblemente la mutación delta F508 y la secuencia que se va a alterar es preferiblemente el (pre-)ARNm del CFTR que alberga la mutación delta F508. La presente invención se usa preferiblemente para reparar el ARN de pacientes con la mutación delta F508 ($\Delta F508$) del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). La introducción de 5'-UUU-3' ó 5'-CUU-3' en lugar de los tres nucleótidos eliminados dará como resultado un ARN reparado que restablece el aminoácido de fenilalanina (F o Phe) que falta en la secuencia de proteínas y, por lo tanto, da como resultado la formación de una proteína de tipo natural.
- 25 **[0026]** El ARN de CFTR con $\Delta F508$ puede repararse, por ejemplo, poniendo en contacto y/o transfectando células -preferiblemente células de mamífero, más preferiblemente células humanas- 'in vitro' o 'in vivo' con un oligonucleótido conforme a la invención.
- 30 **[0027]** Un oligonucleótido preferido conforme a la presente invención es complementario a una secuencia que tiene al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, ó 100% de igualdad de secuencia o identidad de secuencia ('sequence identity', en inglés) con los nucleótidos 16-30 y 34-48 de la SEQ ID NO: 6 y la secuencia alterada se selecciona preferiblemente de 5'-UUU-3' y 5'-CUU-3', preferiblemente 5'-CUU-3'. Un oligonucleótido más preferido conforme a la invención es un oligonucleótido que comprende o consta de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3, preferiblemente la SEQ ID NO: 1; o un oligonucleótido que comprende o consta de una variación acortada de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3, preferiblemente la SEQ ID NO: 1. Esta variación acortada ha eliminado algunos nucleótidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12) del extremo-3' y/o el extremo 5' de la SEQ ID NO: 1 ó la SEQ ID NO: 3. Una variación de oligonucleótidos preferida de acuerdo con la invención comprende los nucleótidos 7 a 29 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3, preferiblemente la SEQ ID NO: 1.
- 35 **[0028]** SEQ ID NO: 1; 5'-AUCAUAGGAAACACCAAAGAUGAUUUUUCUUU-3' (los nucleótidos CAPS son preferiblemente ARN modificado de 2'-O-Me).
- 40 **[0029]** SEQ ID NO: 3; 5'-AUCAUAGGAAACACCAAAAUGAUUUUUCUUU-3' (los nucleótidos CAPS son preferiblemente ARN modificado de 2'-O-Me).
- 45 **[0030]** Un oligonucleótido más preferido conforme a la invención incluye un oligonucleótido que comprende o consta de un oligonucleótido con una secuencia seleccionada del grupo de la SEQ ID NO: 16 a la SEQ ID NO: 24, o un oligonucleótido que comprende o consta de una variación acortada de un oligonucleótido con una secuencia seleccionada del grupo de la SEQ ID NO: 16 a la SEQ ID NO: 24. Esta variación acortada ha eliminado algunos nucleótidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12) del extremo-3' y/o el extremo 5' de la SEQ ID NO: 16 a la SEQ ID NO: 24. Estos oligonucleótidos pueden usarse convenientemente para realizar un cambio en la secuencia de una molécula de ARN diana, por ejemplo mediante una inserción en el marco de lectura de 1 ó 2 pares de bases en el codón borrado o eliminado para fenilalanina -a título ilustrativo-, una inserción estructural (o inserción dentro del marco, 'in frame insertion', en inglés) de un triplete de nucleósidos que crea un codón para fenilalanina en la posición de aminoácido 508 de la proteína de CFTR, una inserción dentro del marco de un triplete de nucleósidos que crea un codón para leucina en la posición de aminoácidos 508 o en otra posición de aminoácidos de la proteína de CFTR, o para insertar un codón de parada en la secuencia de codificación de CFTR. El modo de acción de estos oligonucleótidos ejemplares conformes a la invención, las moléculas representadas en las SEQ ID NO: 16 a 24, se representa en las figuras 7B-8F.
- 50 **[0031]** Todos los nucleósidos del oligonucleótido son 2'-O alquil ribosa ribonucleósidos, preferiblemente 2'-O metil
- 55
- 60
- 65

ribosa nucleósidos. Otras características para mejorar la estabilidad, tal y como se han descrito aquí previamente, pueden añadirse a las secuencias, como, por ejemplo, enlaces de fosforotioato entre algunos o todos los nucleótidos. Todas o algunas de las modificaciones descritas podrían combinarse en una molécula antisentido.

5 **[0032]** Las modificaciones previamente descritas pueden aumentar la absorción en células epiteliales. De manera alternativa, la molécula puede acortarse eliminando algunos nucleótidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12) del extremo-3' y/o el extremo-5' para aumentar la absorción en las células.

10 **[0033]** Para la aplicación 'in vivo', un oligonucleótido conforme a la presente invención puede empaquetarse para ser liberado (administrado) en un liposoma, un polisoma, una nanopartícula u otra partícula adecuada, como una partícula vírica. De manera alternativa, o en combinación con los vehículos de administración, las moléculas de reparación pueden usarse con polietilénimina (PEI) y/o polietilenglicol (PEG). Los oligonucleótidos conformes a la presente invención pueden sintetizarse dentro de una célula, incluso 'in vivo', por ejemplo infectando células con un virus o una partícula tipo virus que codifica el oligonucleótido. Alternativamente, las células vivas se pueden transfectar 'in vitro' o 'in vivo' con ADN (vírico) o un plásmido o similares. Tras la infección o transfección de la célula viva, el oligonucleótido conforme a la invención se sintetiza dentro de la célula viva mediante transcripción y/o replicación normales.

20 **[0034]** Por lo tanto, un oligonucleótido conforme a la invención puede administrarse como tal, directamente en la célula, tejido u órgano de un organismo pluricelular. Un oligonucleótido conforme a la invención también puede administrarse indirectamente utilizando cualquier medio adecuado conocido en este campo. Por ejemplo, un oligonucleótido conforme a la invención puede ser suministrado a una célula, tejido u órgano de un organismo pluricelular en forma de vector o en forma de vector de expresión, de manera que el vector o vector de expresión comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el oligonucleótido. Preferiblemente, el vector de expresión se introduce en una célula, tejido u órgano de un organismo pluricelular mediante un vehículo para la administración de genes. En una realización, se proporciona un vector vírico que comprende un cassette de expresión o un cassette de transcripción que dirige la expresión o transcripción del oligonucleótido conforme a la invención. Un vehículo de administración preferido es un vector vírico como un vector de virus adeno-asociados (AAV), o un vector retroviral como un vector de lentivirus y similares.

30 **[0035]** Una realización de la invención atañe al uso de un vector que comprende una molécula de ácido nucleico tal y como se ha descrito previamente, de manera que el vector es un vector que es apropiado para la terapia génica. Los vectores que son apropiados para la terapia génica se describen en Anderson 1998, Nature 392: 25-30; Walther y Stein, 2000, Drugs 60: 249-71; Kay et al, 2001, Nat. Med. 7: 33-40; Russell, 2000, J. Gen. Virol. 81 : 2573-604; Amado y Chen, 1999, Science 285: 674-6; Federico, 1999, Curr. Opin. Biotechnol.10: 448-53; Vigna y Naldini, 2000, J. Gene Med. 2: 308-16; Marin et al, 1997, Mol. Med. Today 3: 396-403; Peng y Russell, 1999, Curr. Opin. Biotechnol. 10: 454-7; Sommerfelt, 1999, J. Gen. Virol. 80: 3049-64; Reiser, 2000, Gene Ther. 7: 910-3; y en las referencias citadas en dichos documentos.

40 **[0036]** Un vector de terapia génica particularmente apropiado incluye un vector de adenovirus y un vector de virus adeno-asociados (AAV). Estos vectores infectan un gran número de tipos de células que se dividen y células que no se dividen. Además, los vectores de adenovirus pueden alcanzar altos niveles de expresión transgénica. Sin embargo, debido a la naturaleza episomal de los vectores de adenovirus y de AAV tras su entrada en la célula, estos vectores víricos están más indicados para las aplicaciones terapéuticas que requieren solo la expresión transitoria del transgén (Russell, 2000, J. Gen. Virol. 81 : 2573-2604; Goncalves, 2005, Virol J. 2(1):43), tal y como se ha indicado previamente. Los vectores de adenovirus preferidos se modifican para reducir la respuesta del huésped, tal y como demostró Russell (2000, ver más arriba).

50 **[0037]** Un vector retrovírico (o vector retroviral) preferido para la aplicación en la presente invención es un constructo (o construcción) de expresión basado en lentivirus. Los vectores lentivirales tienen la capacidad única de infectar células que no se dividen (Amado y Chen, 1999 Science 285: 674-6). Los métodos para la construcción y el uso de constructos de expresión basados en lentivirus se describen en las Patentes de EE UU N° 6,165,782, 6,207,455, 6,218,181, 6,277,633 y 6,323,031 y en Federico (1999, Curr Opin Biotechnol 10: 448-53) y Vigna et al. (2000, J Gene Med 2000; 2: 308-16).

55 **[0038]** De manera general, los vectores de terapia génica se considerarán vectores de expresión como los descritos previamente en el sentido de que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica un oligonucleótido - conforme a la invención- que se va a expresar, a través del cual la mencionada molécula de ácido nucleico se liga operativamente con las secuencias reguladoras apropiadas. Dicha secuencia reguladora comprenderá al menos una secuencia promotora. Los promotores apropiados para la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de vectores de terapia génica incluyen, por ejemplo, un promotor temprano intermedio de citomegalovirus (CMV), promotores virales de repetición terminal larga (LTR), como los del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV), el virus del sarcoma de Rous, o HTVL-1, el promotor temprano del virus del simio 40 (SV 40) y el promotor en el gen timidina quinasa del virus del herpes simple.

65 **[0039]** Muchos medicamentos previstos para el pulmón pueden aplicarse por vía aérea. Uno de estos medicamentos

podría estar constituido por la molécula de reparación de ARN, es decir, el oligonucleótido conforme a la invención. Preferiblemente se usa un nebulizador para administrar en un aerosol el oligonucleótido conforme a la presente invención en las células epiteliales de la vía aérea. Alternativamente, se podría usar una preparación de inhalación de polvo seco. El uso de oligonucleótidos monocatenarios conformes a la presente invención en un sistema de administración por vía aérea disminuye las posibilidades de desintegración de la molécula usando fuerzas transversales durante la administración.

[0040] En muchas enfermedades, la capa mucosa muestra un aumento de grosor, lo que conlleva una menor absorción de medicamentos a través del pulmón. Una de estas enfermedades es la bronquitis crónica y otro ejemplo es la fibrosis quística (CF). Hay disponibles varias formas de normalizadores mucosos, como las ADNAsas, el suero fisiológico hipertónico (o solución salina hipertónica) o el manitol, que está disponible comercialmente con el nombre de Bronchitol. Cuando los normalizadores mucosos se usan en combinación con compuestos de reparación de ARN, como los oligonucleótidos conformes a la invención, pueden aumentar la eficacia de estos medicamentos. Por lo tanto, la administración a un sujeto, preferiblemente un humano, de un oligonucleótido conforme a la invención se combina preferiblemente con normalizadores mucosos, preferiblemente los normalizadores mucosos aquí descritos. Además, la administración de los oligonucleótidos conformes a la invención puede combinarse con la administración de pequeñas moléculas para el tratamiento de CF, como compuestos potenciadores, por ejemplo, Kalydeco (ivacaftor; VX-770), o compuestos correctores, por ejemplo, VX-809 (Lumacaftor) y/o VX-661.

[0041] Alternativamente, o en combinación con los normalizadores mucosos, se puede realizar una administración de partículas que penetran en la mucosa o de nanopartículas para que se dé una administración eficaz de moléculas de reparación de ARN en células epiteliales de, por ejemplo, los pulmones o el intestino. Por lo tanto, la administración de un oligonucleótido conforme a la invención en un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, preferiblemente hace uso de partículas que penetran en la mucosa o de nanopartículas.

[0042] Las infecciones de pulmón crónicas y agudas están a menudo presentes en pacientes con enfermedades como la fibrosis quística. Los tratamientos con antibióticos reducen las infecciones bacterianas y sus síntomas, como el aumento de grosor de la mucosidad y/o la formación de biopelículas. El uso de antibióticos en combinación con moléculas de reparación de ARN podría aumentar la eficacia de la reparación de ARN debido a un acceso más fácil para la molécula de reparación a las células diana. Por tanto, la administración en un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, de un oligonucleótido conforme a la invención se combina preferiblemente con un tratamiento de antibióticos para reducir las infecciones bacterianas y sus síntomas, como el aumento de grosor de la mucosidad y/o la formación de biopelículas. Los antibióticos pueden administrarse sistémicamente o localmente o ambas.

[0043] Para aplicar en, por ejemplo, pacientes con fibrosis quística los oligonucleótidos conformes a la invención, u oligonucleótidos empaquetados o complejos conformes a la invención, estos pueden combinarse con cualquier normalizador mucoso como una ADNasa, manitol, suero fisiológico hipertónico y/o antibióticos y/o una molécula pequeña para el tratamiento de CF, como compuestos potenciadores, por ejemplo, Kalydeco (ivacaftor; VX-770), o compuestos correctores, por ejemplo, VX-809 (Lumacaftor) y/o VX-661.

[0044] Para mejorar el acceso a las células diana, podría aplicarse un lavado broncoalveolar (BAL) para limpiar los pulmones antes de la administración de oligonucleótidos conformes a la invención.

[0045] Se puede usar una cápsula de liberación prolongada para administrar oligonucleótidos conformes a la invención en las células epiteliales del intestino. La reparación de CFTR en estas células podría aumentar la absorción de nutrientes. Esto podría combinarse con el uso de preparaciones de enzimas pancreáticas de origen biológico o sintético, como pancrelipasa o Creon, que están disponibles comercialmente y normalmente son usados por pacientes de CF para ayudar en la digestión.

[0046] En todas las realizaciones de la presente invención, el oligonucleótido conforme a la invención puede estar presente en una composición o compuesto de solución salina hipertónica (o suero fisiológico hipertónico), esto es, una composición que comprende un oligonucleótido conforme a la invención y que además comprende 2% - 9% de solución salina, preferiblemente 3% - 8% de solución salina, más preferiblemente 4% - 8% de solución salina, más preferiblemente 5% - 8% de solución salina, más preferiblemente 6% - 8% de solución salina (como 6,1%, 6,2%, 6,3%, 6,4%, 6,5%, 6,6%, 6,7%, 6,8%, 6,9%, 7,0%, 7,1%, 7,2%, 7,3%, 7,4%, 7,5%, 7,6%, 7,7%, 7,8%, 7,9% u 8,0%), más preferiblemente 6% - 7% de solución salina, incluso más preferiblemente alrededor de 7% de solución salina, y más preferiblemente 7% de solución salina. En este caso, el porcentaje de solución salina se define como el peso de solución salina / el volumen total de la composición, es decir, 7% de solución salina corresponde a una composición de 70 g de solución salina / litro. Preferiblemente, la solución salina es básicamente una solución de NaCl.

[0047] En cualquier realización de la presente invención, el oligonucleótido y/o composición conforme a la invención puede administrarse de acuerdo con cualquier método que resulte conocido a una persona versada en la materia, incluyendo -pero sin limitarse a- la administración en el pulmón, preferiblemente por las vías aéreas, y la administración sistémica, preferiblemente la administración intravenosa, intramuscular, intradérmica o subcutánea.

[0048] Las personas versadas en la materia comprenderán que los métodos de administración, vehículos y

combinaciones de administración previamente descritos además pueden combinarse de acuerdo con la presente invención; por ejemplo, un oligonucleótido conforme a la invención y/o una composición que comprende este oligonucleótido pueden combinarse con un compuesto de administración como los descritos en el presente texto, pueden empaquetarse en un vehículo de administración como los descritos en el presente texto y/o pueden empaquetarse en una cápsula de liberación prolongada.

[0049] Un método preferido de administración es en forma de partícula vírica o en forma de secuencia de ácido nucleico vírico que codifica un oligonucleótido conforme a la invención, de manera que el mencionado oligonucleótido se expresa tras la infección de una célula viva con la partícula vírica o la transfección de la célula viva con una secuencia de ácido nucleico vírico; preferiblemente, tal y como se ha descrito previamente en el presente texto.

[0050] La administración de un oligonucleótido conforme a la presente invención puede realizarse en el pulmón, preferiblemente a través de las vías aéreas, y/o en el intestino. La administración puede combinarse con normalizadores mucosos, preferiblemente tal y como se ha descrito en el presente texto, y/o con un tratamiento antibiótico, preferiblemente tal y como se ha descrito en el presente texto, y/o puede combinarse con la administración de preparaciones de enzimas pancreáticas, preferiblemente tal y como se ha descrito en el presente texto, y/o puede combinarse con un lavado broncoalveolar para mejorar el acceso a las células diana.

[0051] Las personas versadas en la materia comprenderán que pueden combinarse dos o más oligonucleótidos conformes a la invención. Las personas versadas en la materia comprenderán que, cuando en el presente texto se hace referencia a un oligonucleótido conforme a la invención, una composición o una composición farmacéutica conforme a la invención, preferiblemente pueden usarse indistintamente en los métodos y usos de acuerdo con la invención.

[0052] En un aspecto, la presente invención proporciona un oligonucleótido para realizar un cambio en la secuencia de una molécula de ARN diana presente en una célula viva, lo cual comprende el paso de suministrar el oligonucleótido a la célula viva en unas condiciones que hacen posible la absorción del mencionado oligonucleótido por parte de la célula viva, de manera que el mencionado oligonucleótido comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria a la molécula de ARN diana, y de manera que la hibridación del oligonucleótido con el ARN diana, o un precursor de este o una plantilla, tiene lugar en la mencionada célula viva, permitiendo que los mecanismos bioquímicos presentes en la mencionada célula viva copien una diferencia en la secuencia del oligonucleótido -en relación con la secuencia de la molécula de ARN diana- en la molécula de ARN, ya sea directamente o mediante un precursor o una plantilla, de manera que se produzca el cambio en la secuencia del mencionado ARN diana.

[0053] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido es un oligonucleótido como el descrito previamente en el presente texto.

[0054] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido es un oligorribonucleótido.

[0055] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se suministra a la célula viva en forma monocatenaria.

[0056] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, la célula viva forma parte de un organismo pluricelular.

[0057] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, la célula viva es una célula animal, más preferiblemente una célula humana.

[0058] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio en la secuencia del ARN diana provoca que se altere el fenotipo de la célula.

[0059] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio en el mencionado ARN diana se confirma determinando la secuencia del mencionado ARN diana, o de un precursor o plantilla de este.

[0060] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio en el mencionado ARN diana se confirma determinando la secuencia de un producto de polipéptido o de una secuencia de ácido nucleico que codifica el mencionado polipéptido codificado por el mencionado ARN diana.

[0061] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio en el mencionado ARN diana se confirma determinando un cambio fenotípico en la mencionada célula viva, o en el organismo que comprende la mencionada célula.

[0062] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio es una mejora en un trastorno causalmente relacionado con la secuencia del ARN diana previamente al cambio.

[0063] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el trastorno es un trastorno genético.

[0064] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido de este aspecto tiene una longitud de 15 - 100 nucleótidos. Más preferiblemente, la longitud del oligonucleótido es de entre 20 y 50 nucleótidos, más preferiblemente de entre 25 y 45, y más preferiblemente de entre 27 y 35.

[0065] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido comprende una inosina y/o comprende nucleótidos modificados, preferiblemente seleccionados de un grupo que consta de 5-metil-dC, 2-amino-dA, C5-pirimidina y/o enlaces de internucleósidos modificados seleccionados de un grupo que comprende enlaces de fosforotioato y enlaces de metilfosfonato.

[0066] Todos los nucleósidos del oligonucleótido son nucleósidos de 2'-O alquil ribosa, preferiblemente nucleósidos de 2'-O metil ribosa.

[0067] Todos los nucleósidos son ribonucleósidos.

[0068] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio en la secuencia de la molécula de ARN diana comprende una inserción o sustitución de uno o más nucleósidos.

[0069] En todas las realizaciones conformes a la invención, los oligonucleótidos conformes a la invención se administran normalmente en dosis que van de 1 µg a 1000 mg, más preferiblemente de 10 µg a 100 mg, más preferiblemente de 100 µg a 10 mg, y más preferiblemente de 500 µg a 5 mg, dependiendo de la célula (tejido) que se va a tratar, el peso del organismo, el modo y/o sitio de administración (local vs. sistémico), el sitio de administración (intraperitoneal, intramuscular, pulmonar, etc.), el trastorno que se va a tratar, el régimen que se va a aplicar (un solo bolo o bolos repetidos o dosis continuas) y similares. Una persona que tenga capacidades ordinarias en este campo será capaz de establecer la dosis óptima utilizando un método de ensayo y error.

[0070] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el ARN diana codifica CFTR humano y el cambio da como resultado la creación o restablecimiento de un triplete de nucleósidos que codifica fenilalanina en la posición de aminoácidos 508 de la proteína de CFTR.

[0071] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el cambio comprende la inserción de un triplete de nucleósidos seleccionado de un grupo que comprende 5'-UUU-3' y 5'-CUU-3'.

[0072] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido es complementario a una secuencia que tiene al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ó 99% de igualdad de secuencia o identidad de secuencia con los nucleótidos 16-30 y 34-48 de la SEQ ID NO: 6 y el cambio comprende la inserción de un triplete de nucleósidos seleccionado de un grupo que comprende 5'-UUU-3' y 5'-CUU-3'.

[0073] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido comprende o está constituido de los nucleótidos 7-29, preferiblemente los nucleótidos 1-33, de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3, preferiblemente la SEQ ID NO: 1. Otro oligonucleótido preferido incluye un oligonucleótido que comprende o está constituido por un oligonucleótido con una secuencia seleccionada del grupo de la SEQ ID NO: 16 a la SEQ ID NO: 24, o un oligonucleótido que comprende o está constituido por una variante o variación acortada de un oligonucleótido con una secuencia seleccionada del grupo de la SEQ ID NO: 16 a la SEQ ID NO: 24. Esta variación acortada ha eliminado algunos nucleótidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12) del extremo-3' y/o el extremo 5' de la SEQ ID NO: 16 a la SEQ ID NO: 24.

[0074] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se suministra en un vehículo, preferiblemente un liposoma, un polisoma o una nanopartícula y/o de manera que el oligonucleótido se combina con un compuesto de administración, preferiblemente polietilénimina (PEI) y/o polietilenglicol (PEG), y/o está unido a un esteroide, preferiblemente colesterol.

[0075] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se suministra al tracto respiratorio o el pulmón, preferiblemente a través de las vías aéreas, en una formulación seca o en un aerosol, preferiblemente usando un nebulizador, y preferiblemente el oligonucleótido se suministra junto con un mediador de transfección y/o un medicamento para la fibrosis quística conocidos para alguien versado en la materia, preferiblemente una ADNasa, manitol (preferiblemente Bronchitol) y/o una molécula pequeña para el tratamiento de CF, preferiblemente Kalydeco (ivacaftor; VX-770), VX-809 (Lumacaftor) y/o VX-661.

[0076] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se suministra en una composición de solución salina hipertónica, preferiblemente con una concentración de 2% - 9% de solución salina, preferiblemente 3% - 8% de solución salina, más preferiblemente 4% - 8% de solución salina, más preferiblemente 5% - 8% de solución salina, más preferiblemente 6% - 8% de solución salina, más preferiblemente 6% - 7% de solución salina, e incluso más preferiblemente alrededor de 7% de solución salina, de manera que la solución salina hipertónica es preferiblemente una solución aceptable fisiológica y farmacéuticamente.

[0077] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, la solución salina hipertónica es básicamente una solución de NaCl.

5 [0078] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se suministra en una partícula que penetra en la mucosa, preferiblemente en una nanopartícula que penetra en la mucosa.

[0079] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, la administración del oligonucleótido se combina con un tratamiento antibiótico para reducir las infecciones bacterianas y sus síntomas, como el aumento del grosor de la mucosidad y/o la formación de biopelículas.

10 [0080] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, se aplica un lavado broncoalveolar (BAL) antes de la administración del oligonucleótido conforme a la invención.

15 [0081] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, el oligonucleótido se administra en una cápsula de liberación prolongada para facilitar la liberación en las células intestinales.

[0082] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, la administración del oligonucleótido se combina con la administración de una composición de enzimas pancreáticas sintética o biológica, como pancrelipasa o Creon.

20 [0083] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido como se ha explicado en el aspecto previo de la presente invención, un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable y/o una solución salina hipertónica fisiológica y farmacéuticamente aceptable, preferiblemente con una concentración de 2% - 9% de solución salina, preferiblemente 3% - 8% de solución salina, más preferiblemente 4% - 8% de solución salina, más preferiblemente 5% - 8% de solución salina, más preferiblemente 6% - 8% de solución salina, más preferiblemente 6% - 7% de solución salina, e incluso más preferiblemente alrededor de 7% de solución salina.

25 [0084] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, la composición farmacéutica comprende además un mediador de transfección.

30 [0085] Preferiblemente, en las realizaciones de este aspecto, la composición farmacéutica comprende además un medicamento para la fibrosis quística conocido para alguien versado en la materia, preferiblemente una ADNasa, manitol y/o una molécula pequeña para el tratamiento de CF, preferiblemente Kalydeco (ivacaftor; VX-770), VX-809 (Lumacaftor) y/o VX-661.

35 [0086] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un oligonucleótido conforme a la invención como se ha explicado en los diversos aspectos y realizaciones del presente texto y/o una composición farmacéutica que comprende dicho oligonucleótido. Preferiblemente, el mencionado oligonucleótido, o la mencionada composición conforme a la invención, es un oligorribonucleótido monocatenario o una composición farmacéutica que comprende un oligorribonucleótido monocatenario que es complementario a una secuencia que tiene al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ó 99% de identidad de secuencia con los nucleótidos 16-30 y 34-48 de la SEQ ID NO: 6. Más preferiblemente, el mencionado oligonucleótido, o la mencionada composición conforme a la invención, es un oligorribonucleótido monocatenario o una composición farmacéutica que comprende un oligorribonucleótido monocatenario que comprende los nucleótidos 7-29, preferiblemente los nucleótidos 1-33, de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3, preferiblemente la SEQ ID NO: 1. Otro oligonucleótido preferido incluye un oligonucleótido que comprende o está constituido por un oligonucleótido con una secuencia seleccionada del grupo de la SEQ ID NO: 16 a la SEQ ID NO: 24, o un oligonucleótido que comprende o está constituido por una variante o variación acortada de un oligonucleótido con una secuencia seleccionada del grupo de la SEQ ID NO: 16 a la SEQ ID NO: 24. Esta variación acortada ha eliminado algunos nucleótidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12) del extremo-3' y/o el extremo 5' de la SEQ ID NO: 16 a la SEQ ID NO: 24.

40 [0087] En todas las realizaciones de la presente invención, puede usarse un excipiente que ayude (aún más) a mejorar la estabilidad, la solubilidad, la absorción, la biodisponibilidad, la actividad, la farmacocinética, la farmacodinámica y la administración de un oligonucleótido -conforme a la invención- en una célula y dentro de una célula; particularmente, excipientes capaces de formar complejos, vesículas, nanopartículas, micropartículas, nanotubos, nanogeles, hidrogeles, poloxámeros o plurónicos, polimersomas, coloides, microburbujas, micelas, lipoplexos y/o liposomas, que liberan compuestos, sustancias y/o oligonucleótido(s) incluidos o atrapados en las vesículas o liposomas a través de una membrana celular. Los ejemplos de nanopartículas incluyen nanopartículas de oro, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de sílice, nanopartículas de lípidos, nanopartículas de azúcar, nanopartículas de proteínas y nanopartículas de péptidos. Otro grupo de nanopartículas es el de las nanopartículas poliméricas. En este campo se conocen muchas de estas sustancias poliméricas. Las sustancias útiles comprenden, por ejemplo, polietilenimina (PEI), ExGen 500, polipropilenimina (PPI), poli(2-hidroxipropilenimina (pHP)), derivados del dextrano (por ejemplo, policationes como dietil amino etil amino etil (DEAE)-dextrano, que son bien conocidos como reactivos de transfección de ADN, pueden combinarse con butilcianoacrilato (PBCA) y hexilcianoacrilato (PHCA) para preparar nanopartículas catiónicas que pueden liberar los mencionados compuestos dentro de las células a través de las membranas celulares), butilcianoacrilato (PBCA), hexilcianoacrilato (PHCA), ácido poli(láctico-

coglicólico) (PLGA), poliaminas (por ejemplo, espermina, espermidina, putrescina, cadaverina), quitosano, poli(amido aminos) (PAMAM), poli(éster amina), polivinil éter, polivinil pirrolidona (PVP), ciclodextrinas de polietilenglicol (PEG), ácido hialurónico, ácido colomínico (y sus derivados), dendrímeros (por ejemplo, poli(amidoamina)), lípidos (por ejemplo, 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio propano (DODAP), dioleoil-dimetilamonio cloruro (DODAC), derivados de fosfatidilcolina [por ejemplo, 1,2- distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC)], derivados de liso-fosfatidilcolina [por ejemplo, 1-estearoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfocolina (S- Ly soPC)], esfingomiélin, 2- { 3 - [bi s- (3 -aminopropil)-amino] -propilamino } -Nditetradecil carbamoil metilacetamida (RPR209120), derivados de fosfoglicerol [por ejemplo, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol, sal de sodio (DPPG-Na)], derivados de ácido fosfatídico [1,2-distearoil-sn-glicero-3-ácido fosfatídico, sal de sodio (DSPA), derivados de fosfatidiletanolamina [por ejemplo, dioleoil-J-R-fosfatidiletanolamina (DOPE), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 2-difitanoi- sn- glicero-3-fosfoetanolamina (DphyPE)], JV-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida (DOSPER), (1,2-dimiristioilxipropil-3-dimetilhidroxi etil amonio (DMRIE), (N1-colesteriloxicarbonil-3,7-diazanonane-1,9-diamina (CD AN), dimetildioctadecilamonio bromuro (DDAB), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (POPC), b-L-Arginil-2,3-L-ácido diaminopropiónico-N-palmitil-N-oleilil-amida trihidrocloruro (Atu-FECTO)], derivados de N,N-dimetil-3-aminopropano [por ejemplo, 1,2-distearoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 1,2-dioleoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DoDMA), 1,2-dilinoleiloxi-N,N-3-dimetilaminopropano (DlinDMA), 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminometil [1,3]-dioxolano (Dlin-K-DMA), derivados de fosfatidilserina [1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina, sal de sodio (DOPS)], colesterol}, anfífilos sintéticos (SAINT-18), lipofectina, proteínas (por ejemplo, albúmina, gelatinas, atelocolágeno), péptidos (por ejemplo, PepFects, NickFects, poliarginina, polilisina, CADY, MPG), combinaciones de estos compuestos y/o proteínas de cápsidas víricas que pueden autoensamblarse en partículas que pueden liberar los mencionados compuestos u oligonucleótidos en una célula. La lipofectina representa un ejemplo de agente de transfección liposomal. Está compuesta de al menos dos componentes lipídicos, un lípido catiónico, N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio cloruro (DOTMA) (comparar con DOTAP, que es la sal de metilsulfato), y un lípido neutro, dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). El componente neutro media en la liberación intracelular. Además de estos materiales de nanopartículas, la protamina de péptidos catiónicos ofrece un enfoque alternativo para preparar oligonucleótidos como coloides. Este sistema coloidal de nanopartículas puede formar -las así llamadas- protículas ('proticles', en inglés), que pueden prepararse mediante un simple proceso de autoensamblaje para empaquetar y mediar en la liberación celular de un compuesto como el explicado en el presente texto. Una persona versada en la materia podrá seleccionar y adaptar cualquiera de los excipientes alternativos y sistemas de liberación o administración previamente mencionados (estén comercialmente disponibles o no) u otros cualesquiera.

[0088] En la descripción de la invención, la palabra 'genética/o' aparece entre corchetes para indicar que las mutaciones en una molécula de ARN diana no tienen que estar genéticamente codificadas necesariamente. Podrían deberse a una edición (incorrecta) de ARN, un procesamiento o empalme de pre-ARN anormal, o cualquier otro mecanismo (desconocido).

[0089] En el presente documento y en sus reivindicaciones, el verbo 'comprender' y sus conjugaciones se usan con un sentido no limitativo para señalar que se incluyen los ejemplos citados después de la palabra, pero que no se excluyen los ejemplos no mencionados de manera específica. Además, al hacer referencia a un elemento mediante el artículo indeterminado 'un' no se excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de estos elementos, a menos que el contexto establezca claramente que hay uno y solo uno de estos elementos. Por tanto, el artículo indefinido 'un' normalmente significa 'al menos uno'. Los términos 'alrededor de' o 'aproximadamente', cuando se usan junto con un valor numérico (por ejemplo, 'alrededor de 10'), significan preferiblemente que el valor puede ser el valor dado (por ejemplo, de 10) con una variación de $\pm 0,1\%$ respecto a dicho valor.

[0090] La información de la secuencia, tal y como se proporciona en el presente texto, no debería interpretarse tan estrictamente como para hacer necesaria la inclusión de los nucleótidos identificados erróneamente. Una persona versada en la materia es capaz de identificar dichos nucleótidos identificados erróneamente, y sabe cómo corregir estos errores. En el caso de errores de secuencia, deben prevalecer las secuencias del ADN genómico, el ARNm y los polinucleótidos del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR).

[0091] La presente invención se explica más a fondo por medio de los siguientes ejemplos, pero no debe interpretarse que dichos ejemplos limitan el alcance de la invención.

A menos que se exponga lo contrario, para la práctica de la invención se emplearán métodos estándares convencionales de biología molecular, microbiología y/o bioquímica. Estas técnicas se describen en Sambrook et al. (1989), 'Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press; en Sambrook y Russell (2001), 'Molecular Cloning: A Laboratory Manual', Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; en los Volúmenes 1 y 2 de Ausubel et al. (1994), 'Current Protocols in Molecular Biology', Current Protocols, EE UU; y en los Volúmenes I y II de Brown (1998), 'Molecular Biology LabFax', Segunda Edición, Academic Press (Reino Unido); 'Oligonucleotide Synthesis' (N. Gait editor); 'Nucleic Acid Hybridization' (Hames y Higgins, eds.).

Ejemplo 1

Evaluación 'in vivo' de QR-010

- 5 **[0092]** El fenotipo en la fibrosis quística (CF) está causado por la ausencia de una proteína de CFTR funcional, lo que conlleva un eflujo (o salida) de cloruro reducido. El CFTR también es un regulador negativo del canal de sodio ENaC. La ausencia de CFTR induce el ENaC, lo que da como resultado una hiperabsorción de sodio, desequilibrando además el equilibrio osmótico y empeorando el fenotipo de CF. La reparación del CFTR aumenta el transporte de cloruro y tiene el efecto adicional de disminuir la hiperabsorción de sodio.
- 10 **[0093]** La eficacia de un agente para tratar el CFTR puede medirse determinando la diferencia de potencial nasal (NPD) en un modelo de ratón con fibrosis quística (Leal et al, 2006, Lab animals 40: 43-52). Las mediciones de NPD son un modo de medir las corrientes en el epitelio nasal de humanos y animales. Así, en el rastro que se genera durante la medición, el transporte de sodio se determina calculando la diferencia entre la corriente al principio y después de añadir un bloqueador de ENaC. En cuanto a la actividad del CFTR, se determina la diferencia entre el pre y postcloruro-menos la solución amortiguadora ('buffer', en inglés) y/o la aplicación de forskolina.
- 15 **[0094]** Una disminución del potencial indica un tratamiento eficaz debido a la disminución de la hiperactividad del ENaC observada en la CF. El sodio es transportado por el ENaC, lo cual está regulado por el CFTR. Debido a la ausencia de CFTR funcional en la CF, el ENaC no se subregula, lo que da como resultado una hiperabsorción de sodio, lo cual, a su vez, empeora el fenotipo de la CF.
- 20 **[0095]** Un aumento del potencial por inducción de forskolina también indica un tratamiento eficaz. Normalmente, en ratones con CF no hay respuesta de cloruro-menos CFTR y no hay respuesta de CFTR inducida por la forskolina; si después del tratamiento se puede observar una corrección estadísticamente significativa de la respuesta de CFTR inducida por la forskolina, esto es señal de un tratamiento eficaz.
- 25 **[0096]** En resumen, se trató a ocho ratones CF-dF508 con la molécula QR-010 de ProQR (un oligonucleótido con la secuencia representada en la SEQ ID NO: 1). Los ratones recibieron múltiples administraciones intranasales de 40 µg de QR-010 disueltos en 2 µL de agua. A los ratones se les realizó una medición pretratamiento de la NPD en el día 0, se les administró la molécula en los días 2, 4 y 7, y se les realizó una medición postratamiento de la NPD en el día 9. Posteriormente, se administró la dosis a tres ratones en los días 10, 13 y 15 y se les realizó una medición postratamiento el día 17; la medición de la NPD se realizó como se señala a continuación, de acuerdo con Leal et al, 2006, Lab animals 40: 43-52, introduciendo algunas modificaciones y utilizando un voltímetro (Knick Portamesss 913, Elektronische Meßgeräte, Berlín, Alemania) con memoria de datos de alta impedancia (> 1.0 E+12 Ω). En resumen, se colocó a los ratones sobre sus espaldas en una almohadilla térmica, y las patas y la cola se pegaron fuera de la misma con cinta adhesiva. Un catéter intravenoso con alas (0,719mm, Insyte-Wt, Becton Dickinson, UT, EE UU), relleno con una crema de electrodos diluida (Signa [Parker Labs, Fairfield, NJ, EE UU] crema/KCl 1mol/L 1:1 vol/vol) e insertada subcutáneamente en una pata trasera, sirvió de puente para conectar el electrodo de Ag/AgCl de referencia (SLE Instruments, South Croydon, Reino Unido). Se colocó un catéter de doble lumen (diámetro exterior [OD] r0,3mm) en un conducto nasal, de manera que un lumen (o canal) se usó para la perfusión de soluciones salinas tamponadas isotónicas y el otro sirvió como electrodo de medición. Su impedancia era de <1.0 E+6 Ω. Se movió a un lado la lengua del animal y se introdujo una mecha -en punta- de papel de filtro en la boca -alrededor de 1 cm hacia la garganta- para absorber el exceso de líquido de la cavidad oral. El exceso de fluido que salía de la fosa nasal perfundida era absorbido por un papel de filtro sujeto en la punta de la nariz, de tal manera que la fosa nasal opuesta no recibía solución alguna. Normalmente, 5 minutos después de la inyección de los fármacos, la almohadilla térmica se inclinaba suavemente unos 30 grados, con la cabeza del animal hacia abajo, y comenzaba la perfusión nasal a un ritmo de 15 mL/min usando una bomba peristáltica (P1, Amersham Biosciences, Roosendaal, Países Bajos). Antes de comenzar la perfusión, se midió la NPD de referencia hasta obtener un valor estable. Las soluciones solo se cambiaron después de que el voltaje se hubo estabilizado. La solución salina isotónica básica estaba compuesta de (mmol/L): Na⁺ 140, Cl⁻ 120, K⁺ 5,2, HCO₃⁻ 25, UPO₄²⁻ 2,4, H₂PO₄⁻ 0,4, Ca²⁺ 1,2, y Mg²⁺ 1,2. La solución libre de cloruro utilizada para detectar el eflujo de cloruro del epitelio nasal se preparó sustituyendo el NaCl y el CaCl₂ por gluconato equimolar, y el MgCl₂ por MgSO₄. La osmolaridad fue de 275 mOsm/L y el pH fue de 7,4. El valor inicial de la NPD se debe principalmente a la corriente de sodio generada por el ENaC. Este canal se bloqueó con amilorida para reducir el potencial a cero. El 'buffer' (o solución tampón) libre de cloruro se añade para medir el cloruro transportado por el CFTR y la forskolina se usa para activar el CFTR. Al final del experimento, se administró una dosis fija de naloxona (4 mg), un antagonista competitivo de la morfina, y atipamezol, un antídoto específico para la medetomidina (5 veces la dosis de medetomidina), y se mantuvo al animal en una habitación oscura sobre una almohadilla térmica hasta su completa recuperación, lo que normalmente se produjo 3-4 h después.
- 55 Los resultados de las mediciones de NPD se representan en las figuras 5 y 6.
- 60 **[0097]** En la figura 5, se representa claramente que el transporte de sodio en los ratones con CF se altera con un tratamiento con QR-010 (p=0,0002; n=8), moviéndose hacia niveles de tipo natural. Esto es una señal concreta de que la actividad de CFTR se restablece tras el tratamiento con QR-010. En la figura 6, se representa claramente que la respuesta de CFTR inducida con forskolina mejora tras 3 dosis de QR-010 (p=0,019; n=8), con una mejora adicional tras 6 dosis de QR-010 (p=0,11, n=3). Normalmente, en ratones con CF no hay ninguna respuesta de CFTR inducida con forskolina; sin embargo, tras el tratamiento se observa una corrección de la respuesta de CFTR inducida con forskolina. Esto es una señal concreta de que la actividad de
- 65

CFTR se restablece tras el tratamiento con QR-010.

[0098] En general, el presente experimento demuestra claramente que un oligonucleótido conforme a la invención, como QR-010, es eficaz para reparar defectos genéticos.

Ejemplo 2

Actividad para restablecer la secuencia de ARN que codifica el CFTR de tipo natural de los oligonucleótidos representados en las SEQ ID NO's: 51, 56, 61 y 66.

[0099] Los oligonucleótidos representados en las SEQ ID NO's: 51, 56, 61 y 66 se analizan para conocer su actividad al restablecer la secuencia de ARN que codifica el CFTR de tipo natural en células epiteliales del pulmón primarias obtenidas de pacientes que portan la mutación diana en al menos un alelo. Las células se cultivan en un medio adecuado de acuerdo con los métodos conocidos para las personas versadas en la materia. Los oligonucleótidos conformes a la invención se introducen en las células mediante transfección. La transfección se realiza de acuerdo con los métodos conocidos para las personas versadas en la materia con la ayuda de lipofectamina, un reactivo de transfección, en concentraciones que van de 1 a 500 nM. El oligocomplejo reactivo de transfección se añade a las células en el medio adecuado y se elimina de las células tras una incubación de 24 h.

[0100] La actividad de los oligonucleótidos para restablecer la secuencia de ARN que codifica el CFTR de tipo natural se determina tras 1 a 4 días de cultivo celular después de la transfección. Se cosechan las células y se evalúa la actividad de los oligonucleótidos a nivel molecular usando la reparación de ARN como información principal. La reparación de ARN se determina mediante secuenciación y/o métodos de Q-PCR. El ARN se depura de las células usando un método conocido para las personas versadas en la materia. Posteriormente, la parte del ARN de CFTR en la que está presente la mutación diana se amplifica mediante RT-PCR. Los productos del RT-PCR se secuencian para determinar que la mutación se ha reparado como se representa en las figuras 9A-D.

LEYENDA DE LAS FIGURAS

[0101]

Figura 1. Secuencias parciales de ARN de CFTR de tipo natural (WT) y con $\Delta F508$ (Mut), en los alrededores del sitio de delección. Los tres nucleótidos suprimidos o eliminados en el mutante se representan en negrita en la secuencia WT.

Figura 2. Representación esquemática de la edición de ARN del ARN mutante de CFTR con $\Delta F508$ usando un oligonucleótido con la SEQ ID NO: 1. La molécula de ARN reparada (RS) tiene 3 nucleótidos insertados, lo que hace que la secuencia de ARN sea idéntica al CFTR de tipo natural (CFTR WT).

Figura 3. ARN parcial y secuencias proteicas de las moléculas reparadas, mutantes y de tipo natural. La mutante no tiene fenilalanina en la posición 508. El ARN reparado da lugar a la inserción de una fenilalanina, dando lugar a una secuencia proteica de tipo natural.

Figura 4. Actividad del oligonucleótido monocatenario en el CFTR mutante con $\Delta F508$ endógena que expresa cultivos celulares. Se comparan el oligonucleótido monocatenario y el oligonucleótido dúplex previamente descrito. La actividad se mide mediante la detección de la actividad del transportador de cloruro del CFTR.

Figura 5. La actividad del ENaC representada como el potencial (mV) para ratones de tipo natural (WT), ratones con CF (CF) y ratones con CF tratados con QR-010 (CF-treated). ** $P < 0,01$; ns=no significativo. Las barras muestran el error estándar de la media (SEM); los valores de p se obtuvieron con una prueba t para datos independientes.

Figura 6. La respuesta de CFTR inducida con forskolina se representa como el porcentaje relativo para ratones de tipo natural (Wild type), ratones con CF sin tratar (CF), ratones con CF tratados con 3 dosis de QR-010 (CF 3D) y ratones con CF tratados con 6 dosis de QR-010 (Cf 6D). Los ratones de tipo natural se representan con un porcentaje de 100%.

Figura 7A. Se representa la reparación de la mutación delta F508 de CFTR en un ARN diana junto al oligonucleótido 010g (SEQ ID NO: 1); se muestra parte del ARN en las cercanías del sitio de delección. El trinucleósido insertado CUU, que provoca la aparición de una fenilalanina (F) en la posición 508 (UUU), se resalta en **negrita**.

Figura 7B. Se representa la inserción de dos nucleósidos en la posición 508 del ARN diana de CFTR con delta F508 mediante un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO: 16; se muestra parte del ARN en las cercanías del sitio de delección. Se representa la inserción de dos nucleósidos CU en la posición 508, lo que

provoca un desplazamiento del marco en la secuencia de codificación.

Figura 7C. Se representa la inserción de un nucleósido en la posición 508 del ARN diana de CFTR con delta F508 mediante un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO: 17; se muestra parte del ARN en las cercanías del sitio de delección. Se representa la inserción del nucleósido C en la posición 508, lo que provoca un desplazamiento del marco en la secuencia de codificación y finalmente crea un codón de parada en la posición 512.

Figura 7D. Se representa la inserción de un nucleósido en la posición 508 del ARN diana de CFTR con delta F508 mediante un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO: 18; se muestra parte del ARN en las cercanías del sitio de delección. Se representa la inserción del nucleósido C en la posición 508, lo que provoca un desplazamiento del marco en la secuencia de codificación y finalmente crea un codón de parada en la posición 512.

Figura 8. Se representan diversas inserciones en la posición 508 en el ARN diana de CFTR de tipo natural.

Figura 8A. Se representa la inserción de un codón de parada en la posición 508 ((ATCATCT**GA**TTTGGTGTT); SEQ ID NO: 33) en el ARN diana de CFTR de tipo natural por medio de un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO: 19; se muestra parte del ARN en las cercanías de la posición 508. La inserción del codón de parada provoca una parada de la traducción tras I 507.

Figura 8B. Se representa la inserción de dos nucleósidos en la posición 508 del ARN diana de CFTR de tipo natural por medio de un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO: 20; se muestra parte del ARN en las cercanías de la posición 508. Se representa la inserción de dos nucleósidos GA en la posición 508, lo que provoca un desplazamiento del marco en la secuencia de codificación.

Figura 8C. Se representa la inserción de un nucleósido en la posición 508 del ARN diana de CFTR de tipo natural por medio de un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO: 21; se muestra parte del ARN en las cercanías de la posición 508. Se representa la inserción de un nucleósido A en la posición 508, lo que provoca un desplazamiento del marco en la secuencia de codificación y finalmente crea un codón de parada en la posición 513.

Figura 8D. Se representa la inserción de un codón de leucina (ATCATC**CTC**TTTGGTGTT; SEQ ID NO: 40) en la posición 508 del ARN diana de CFTR de tipo natural por medio de un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO: 22; se muestra parte del ARN en las cercanías de la posición 508. Se muestran la inserción del codón de leucina y el polipéptido resultante.

Figura 8E. Se representa la inserción de un codón de parada a medio camino del exón 10 del ARN diana de CFTR de tipo natural por medio de un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO: 23; se muestra parte del ARN en las cercanías de la posición 508. La inserción del codón de parada provoca una parada de la traducción tras la posición de aminoácido F 494.

Figura 8F. Se representa la introducción de un codón de leucina (CUU) en el exón 10 del ARN diana de CFTR de tipo natural por medio de un oligonucleótido con la secuencia de SEQ ID NO: 24. Se muestran la introducción del codón de leucina y el polipéptido resultante.

Figura 9A. Se representa la reparación de la mutación R117H del CFTR en un ARN diana por medio del oligonucleótido CFTR-R117 (SEQ ID NO: 51); se muestra parte del ARN en las cercanías del sitio de mutación. La sustitución de "A" por "G" transforma el codón CAC (His) en un codón CGC (Arg) y está resaltada en **negrita**.

Figura 9B. Se representa la reparación de la mutación G542X del CFTR en un ARN diana por medio del oligonucleótido CFTR-G542 (SEQ ID NO: 56); se muestra parte del ARN en las cercanías del sitio de mutación. La sustitución de "U" por "G" transforma el codón UGA (Parada) en un codón GGA (Gly) y está resaltada en **negrita**.

Figura 9C. Se representa la reparación de la mutación W1282X del CFTR en un ARN diana por medio del oligonucleótido CFTR-W1282 (SEQ ID NO: 61); se muestra parte del ARN en las cercanías del sitio de mutación. La sustitución de "A" por "G" transforma el codón UGA (Parada) en un codón UGG (Tryp) y está resaltada en **negrita**.

Figura 9D. Se representa la reparación de la mutación N1303K del CFTR en un ARN diana por medio del oligonucleótido CFTR-N1303 (SEQ ID NO: 66); se muestra parte del ARN en las cercanías del sitio de mutación. La sustitución de "G" por "C" transforma el codón AAG (Lys) en un codón AAC (Asn) y está resaltada en **negrita**.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0102]

- 5 <110> ProQR Therapeutics B.V.
 <120> Oligonucleótidos para realizar un cambio en la secuencia de una molécula de ARN diana presente en una célula viva
- 10 <130> P6042219PCT
 <160> 70
 <170> PatentIn version 3.3
- 15 <210> 1
 <211> 33
 <212> ARN
 <213> Artificial
- 20 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 1
 aucauaggaa acaccaaaga ugauauuuuc uuu 33
- 25 <210> 2
 <211> 11
 <212> ARN
 <213> Artificial
- 30 <220>
 <223> Oligonucleótido
- 35 <220>
 <221> misc_feature ('características diversas')
 <222> (1)..(1)
 <223> U está fosforilado
- 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> U está fosforilado
- 45 <400> 2
 ucacuuuuugg u 11
 <210> 3
 <211> 33
 <212> ARN
- 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
- 55 <400> 3
 aucauaggaa acaccaaaaa ugauauuuuc uuu 33
 <210> 4
 <211> 11
 <212> ARN
- 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
- 65 <220>

ES 2 584 856 T3

<221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> U está fosforilado

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> U está fosforilado

10 <400> 4
 ucaucuugg u 11

<210> 5
 <211> 63

15 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Parte del exón 10 de la transcripción de CFTR

20 <400> 5
uaugccuggc accauuaag aaaauaucu cuuugguguu uccuaugaug aaauagaua 60

25 **cag 63**

<210> 6
 <211> 60
 <212> ARN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Parte del exón 10 de la transcripción de CFTR

35 <400> 6
 uaugccuggc accauuaag aaaauaucu ugguguuucc uaugaugaau auagauacag 60

<210> 7

40 <211> 30
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Parte del exón 10 de la transcripción de CFTR

45 <400> 7
 uaugccuggc accauuaag aaaauaucu 30

50 <210> 8
 <211> 30
 <212> ARN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Parte del exón 10 de la transcripción de CFTR

<400> 8
 ugguguuucc uaugaugaau auagauacag 30

60 <210> 9
 <211> 63
 <212> ARN
 <213> Artificial

65 <220>

ES 2 584 856 T3

<223> Parte del exón 10 de la transcripción de CFTR

<400> 9

5 **uaugccuggc accauuaag aaaauaucu cuuugguguu uccuaugaug aauauagaua 60**

cag 63

<210> 10

10 <211> 60

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Parte del exón 10 de la transcripción de CFTR

<400> 10

augccuggca ccuuuaaga aaauaucu uuugguguu ccuaugauga auauagauac 60

20 <210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Péptido

<400> 11

30 **Met Pro Gly Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile Phe Gly Val Ser Tyr Asp**

1 5 10 15

Glu Tyr Arg Tyr

35 **20**

<210> 12

<211> 57

<212> ARN

40 <213> Artificial

<220>

<223> Parte del exón 10 de la transcripción de CFTR

45 <400> 12

augccuggca ccuuuaaga aaauaucu gguguuuccu augaugaaua uagauac 57

<210> 13

<211> 19

50 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

55 <400> 13

Met Pro Gly Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile Gly Val Ser Tyr Asp Glu

1 5 10 15

60 **Tyr Arg Tyr**

<210> 14

65 <211> 60

<212> ARN

ES 2 584 856 T3

<213> Artificial

<220>
<223> Parte del exón 10 de la transcripción de CFTR

5 <400> 14
augccuggca ccauuaaaga aaauaucauc uuugguuu ccaugauga auauagauac 60

10 <210> 15
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Péptido

<400> 15

20 **Met Pro Gly Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile Phe Gly Val Ser Tyr Asp**
1 5 10 15

Glu Tyr Arg Tyr
20

25 <210> 16
<211> 32
<212> ARN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido dF-ins1

<400> 16
aucauaggaa acaccaagau gauuuuucu uu 32

35 <210> 17
<211> 31
<212> ARN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido dF-ins1

<400> 17
45 aucauaggaa acaccagau auuuuucu u 31

<210> 18
<211> 33
<212> ARN
50 <213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido dF-ins1 33b

55 <400> 18
caucauagga aacaccagau gauuuuucu uua 33

<210> 19
<211> 33
60 <212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido CFTR WT (WT=de tipo natural) X

65 <400> 19

auaggaaaca ccaaucaga ugauuuuuc uu 33
 <210> 20
 <211> 32
 5 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CFTR WT Ins2
 10 <400> 20
 auaggaaaca ccaaucgau gauuuuucu uu 32
 <210> 21
 <211> 31
 15 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido CFTR WT Ins1
 <400> 21
 auaggaaaca ccaaugaug auuuuucu u 31
 25 <210> 22
 <211> 33
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido CFTR WT L
 <400> 22
 35 auaggaaaca ccaagagga ugauuuuuc uu 33
 <210> 23
 <211> 33
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido CFTR WT OX
 <400> 23
 45 aggcuaauc caggaucaaa acugagaaca gaa 33
 <210> 24
 <211> 33
 <212> ARN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido CFTR WT OL
 55 <400> 24
 auggugccag gcauaaggau ccaggaaaac uga 33
 <210> 25
 <211> 42
 60 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Parte de ARN con deltaF508
 65 <400> 25

ES 2 584 856 T3

accauuaaag aaaauaucou ugguguuucc uaugaugaau au 42

<210> 26
 <211> 14
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Parte de polipéptido con delta F508

10 <400> 26

Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile Gly Val Ser Tyr Asp Glu Tyr
 1 5 10

15 <210> 27
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Parte de ARN WT (WT=de tipo natural)

<400> 27

25 accauuaaag aaaauaucou cuuugguguu uccuaugaug aauau 45

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Artificial

<220>
 <223> Parte de polipéptido WT

35 <400> 28

Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile Phe Gly Val Ser Tyr Asp Glu Tyr
 1 5 10 15

40 <210> 29
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Parte de ARN con delta F508 con inserción de CU

<400> 29

50 accauuaaag aaaauaucou cuugguguuu ccuaugauga auaua 45

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Parte de polipéptido con delta 508, con desplazamiento de marco

<400> 30

60 **Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile Leu Val Phe Pro Met Met Asn Ile**
 1 5 10 15

65 <210> 31
 <211> 43

ES 2 584 856 T3

<212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> Parte de ARN con delta F508, con inserción de C

<400> 31
 accauuaag aaaauaucu cugguguuuc cuaugaugaa uau 43

10 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Parte de polipéptido con delta F508, con parada prematura

<400> 32

20 **Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile Trp Cys Phe Leu**
1 5 10

<210> 33
 <211> 18
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Parte de ADN con delta F508, con codón de parada en la posición 508

30 <400> 33 18
 atcatctgat ttgtgtt 18

<210> 34
 <211> 45
 35 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 40 <223> Parte de ARN con delta F508, con codón de parada en la posición 508

<400> 34
 accauuaag aaaauaucu cugauuuggu guuuccuaug augaa 45

45 <210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Parte de polipéptido de CFTR WT con codón de parada insertado en la posición 508

<400> 35

55 **Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile**
1 5

<210> 36
 <211> 45
 60 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 65 <223> Parte de ARN de CFTR WT con inserción de GA

ES 2 584 856 T3

<400> 36
 accauuaaag aaaauaucou cgauuuggug uuuccuauga ugaau 45

5 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Parte de polipéptido de CFTR WT con desplazamiento de marco inducido por inserción de GA

<400> 37

15 **Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile Asp Leu Val Phe Pro Met Met Asn**
1 5 10 15

<210> 38
 <211> 45
 <212> ARN
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Parte de ARN de CFTR WT con inserción de A

25 <400> 38
 accauuaaag aaaauaucou cauuuggugu uuccuaugau gaaua 45

<210> 39
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Parte de polipéptido de CFTR WT con desplazamiento de marco inducido por codón de parada en la posición
 35 513

<400> 39

40 **Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile Ile Trp Cys Phe Leu**
1 5 10

<210> 40
 <211> 18
 <212> ADN
 45 <213> Artificial

<220>
 <223> Parte de ADN de CFTR con un codón de leucina insertado en la posición de codón 508

50 <400> 40
 atcatcctct ttggtgtt 18

<210> 41
 <211> 45
 55 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Parte de ARN de CFTR WT con una inserción de codón de leucina (CUC) en la posición 508

60 <400> 41
 accauuaaag aaaauaucou ccucuuggu guuuccuaug augaa 45

65 <210> 42
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 584 856 T3

<213> Artificial

<220>
<223> Parte de polipéptido de CFTR WT con leucina insertada en la posición 508

5
<400> 42

Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile Leu Phe Gly Val Ser Tyr Asp Glu
1 5 10 15

10
<210> 43
<211> 45
<212> ARN
<213> Artificial

15
<220>
<223> Parte de ARN de CFTR WT (WT=de tipo natural)

<400> 43
20 auuucauucu guucucaguu uuccuggauu augccuggca ccauu 45

<210> 44
<211> 15
<212> PRT
25 <213> Artificial

<220>
<223> Parte de polipéptido de CFTR WT

30 <400> 44

Ile Ser Phe Cys Ser Gln Phe Ser Trp Ile Met Pro Gly Thr Ile
1 5 10 15

35 <210> 45
<211> 45
<212> ARN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Parte de ARN de CFTR WT con inserción de codón de parada en la posición de codón 495

<400> 45
45 auuucauucu guucucaguu uugauccugg auaugccug gcacc 45

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Parte de polipéptido de CFTR WT truncado debido a la inserción de un codón de parada en la posición 495

<400> 46

55

Ile Ser Phe Cys Ser Gln Phe
1 5

60 <210> 47
<211> 48
<212> ARN
<213> Artificial

65 <220>
<223> Parte de ARN de CFTR WT

ES 2 584 856 T3

<400> 47
uucuguucuc aguuuuccug gauuaugccu ggcaccauaa aagaaaau 48

5 <210> 48
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Parte de polipéptido de CFTR WT

<400> 48

15 **Phe Cys Ser Gln Phe Ser Trp Ile Met Pro Gly Thr Ile Lys Glu Asn**
1 5 10 15

<210> 49
<211> 48
20 <212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Parte de ARN de CFTR WT con inserción de codón de leucina en la posición 498

25 <400> 49
uucuguucuc aguuuuccug gaucuuuauug ccuggcacca uaaaagaa 48

<210> 50
30 <211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> Parte de polipéptido de CFTR WT con inserción de leucina en la posición 498

<400> 50

40 **Phe Cys Ser Gln Phe Ser Trp Ile Leu Met Pro Gly Thr Ile Lys Glu**
1 5 10 15

<210> 51
<211> 33
45 <212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido CFTR-R117

50 <400> 51
auaaaucgcg auagagcguu ccuccuuguu auc 33

<210> 52
<211> 45
55 <212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Parte de ARN 117H

60 <400> 52
gacccggaua acaaggagga acacucuauc gcgauuuauuc uaggg 45

<210> 53
65 <211> 15
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
 <223> Parte de polipéptido 117H

5 <400> 53

Asp Pro Asp Asn Lys Glu Glu His Ser Ile Ala Ile Tyr Leu Gly
1 5 10 15

10 <210> 54
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Parte de ARN de CFTR WT

<400> 54
 gacccggaua acaaggagga acgcucuauc gcgauuuuau uaggc 45

20 <210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Parte de polipéptido de CFTR WT

<400> 55

30 **Asp Pro Asp Asn Lys Glu Glu Arg Ser Ile Ala Ile Tyr Leu Gly**
1 5 10 15

35 <210> 56
 <211> 33
 <212> ARN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido CFTR-G542

<400> 56
 gugauuccac cuucuccaag aacuaauuug ucu 33

45 <210> 57
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Parte de ARN de 542X

<400> 57
 gagaaagaca auauaguucu uugagaaggu ggaucacac ugagu 45

55 <210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Parte de polipéptido truncado de 542X

<400> 58

65

Glu Lys Asp Asn Ile Val Leu
1 5

5 <210> 59
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Parte de ARN de CFTR WT

<400> 59
 gagaaagaca auauaguucu uggagaaggu ggaaucacac ugagu 45

15 <210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Parte de polipéptido de CFTR WT

<400> 60

25 **Glu Lys Asp Asn Ile Val Leu Gly Glu Gly Gly Ile Thr Leu Ser**
1 5 10 15

30 <210> 61
 <211> 33
 <212> ARN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido CFTR-W1282

<400> 61
 cuccaaaggc uuuccuccac uguugcaaag uua 33

40 <210> 62
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Parte de ARN de 1282X

<400> 62
 gauucaauaa cuuugcaaca gugaaggaaa gccuuuggag ugaua 45

50 <210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Parte de polipéptido truncado 1282X

<400> 63

60 **Asp Ser Ile Thr Leu Gln Gln**
1 5

65 <210> 64
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Artificial

ES 2 584 856 T3

<220>
 <223> Parte de ARN de CFTR WT

<400> 64
 5 gauucaauaa cuuugcaaca guggaggaaa gccuuuggag ugaua 45

<210> 65
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Parte de polipéptido de CFTR WT

15 <400> 65

	Asp	Ser	Ile	Thr	Leu	Gln	Gln	Trp	Arg	Lys	Ala	Phe	Gly	Val	Ile
	1				5					10					15

20 <210> 66
 <211> 33
 <212> ARN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido CFTR-N1303

<400> 66
 30 guucauaggg auccaaguuu uuucuaaag uuc 33

<210> 67
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Parte de ARN de 1303K

<400> 67
 40 uuucuggaa cauuuagaaa aaaguuggau ccuauagaac agugg 45

<210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 45 <213> Artificial

<220>
 <223> Parte de PP 1303K

50 <400> 68

	Phe	Ser	Gly	Thr	Phe	Arg	Lys	Lys	Leu	Asp	Pro	Tyr	Glu	Gln	Trp
	1				5					10					15

55 <210> 69
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Parte de ARN de CFTR WT

<400> 69
 65 uuucuggaa cauuuagaaa aaacuuggau ccuauagaac agugg 45

<210> 70

ES 2 584 856 T3

<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Parte de polipéptido de CFTR WT

<400> 70

10	Phe	Ser	Gly	Thr	Phe	Arg	Lys	Asn	Leu	Asp	Pro	Tyr	Glu	Gln	Trp
	1				5					10					15

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un oligonucleótido monocatenario, en el que todos los nucleósidos del oligonucleótido son 2'-O-alkil ribosa ribonucleósidos, para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal; el mencionado oligonucleótido puede realizar un cambio en la secuencia de una molécula de ARN diana presente en una célula viva del mencionado cuerpo humano o animal suministrando el oligonucleótido a la célula viva en condiciones que permiten que la célula viva absorba el mencionado oligonucleótido; el mencionado oligonucleótido comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria a la molécula de ARN diana, de manera que la hibridación del oligonucleótido con el ARN diana, o un precursor de este o una plantilla para este, tiene lugar en la mencionada célula viva, permitiendo que los mecanismos bioquímicos presentes en la mencionada célula viva copien una diferencia en la secuencia del oligonucleótido -en relación con la molécula de ARN diana- en la molécula de ARN, ya sea directamente o mediante un precursor o plantilla, a efectos de provocar el cambio en el mencionado ARN diana.
2. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que: (a) el cambio en la secuencia del ARN diana provoca que la célula altere su fenotipo; (b) el cambio en la secuencia del mencionado ARN diana se confirma determinando la secuencia del mencionado ARN diana, o de un precursor o plantilla de este; (c) el cambio en la secuencia del mencionado ARN diana se confirma determinando la secuencia de un producto de polipéptidos codificado por el mencionado ARN diana; (d) el cambio en la secuencia del mencionado ARN diana se confirma determinando un cambio fenotípico en la mencionada célula viva, o en el organismo que comprende la célula, de manera que, idealmente, el cambio fenotípico es una mejora de un trastorno causalmente relacionado con la secuencia del ARN diana previamente al cambio (por ejemplo, el trastorno es un trastorno genético).
3. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2; el oligonucleótido tiene una longitud de 15 - 100 nucleótidos; por ejemplo, la longitud del oligonucleótido es de entre 20 y 50 nucleótidos, más preferiblemente entre 25 y 45 nucleótidos, y más preferiblemente entre 27 y 35 nucleótidos.
4. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que el oligorribonucleótido comprende una inosina y/o comprende nucleótidos modificados, seleccionados preferiblemente de un grupo que comprende 5-metil-dC, 2-amino-dA, C5-pirimidina y/o enlaces entre nucleósidos modificados seleccionados de un grupo que comprende enlaces de fosforotioato y enlaces de metilfosfonato.
5. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que todos los nucleósidos del oligonucleótido son 2'-O-metil ribosa nucleósidos.
6. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que el cambio en la secuencia de la molécula de ARN diana incluye la inserción o sustitución de uno o más nucleósidos; por ejemplo, el ARN diana codifica CFTR humano y el cambio da como resultado la creación o el restablecimiento de un triplete de nucleósidos que codifica fenilalanina en la posición de aminoácido 508 de la proteína de CFTR (por ejemplo, el cambio comprende la inserción de un triplete de nucleósidos seleccionado de un grupo que comprende 5'-UUU-3' y 5'-CUU-3').
7. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, de manera que el oligonucleótido es complementario a una secuencia que tiene al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ó 99% de igualdad de secuencia o identidad de secuencia con los nucleótidos 16-30 y 34-48 de la SEQ ID NO: 6 y el cambio comprende la inserción de un triplete de nucleósidos seleccionado de un grupo que comprende 5'-UUU-3' y 5'-CUU-3'.
8. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que el oligonucleótido comprende o consta de los nucleótidos 7-29, preferiblemente los nucleótidos 1-33, de la SEQ ID NO: 1 o de la SEQ ID NO: 3, preferiblemente de la SEQ ID NO: 1.
9. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que el oligonucleótido se suministra en un vehículo, preferiblemente un liposoma, un polisoma o una nanopartícula y/o de manera que el oligonucleótido se combina con un compuesto de administración, preferiblemente polietilimina (PEI) y/o polietilenglicol (PEG), y/o está unido a un esteroide, preferiblemente colesterol.
10. Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que el oligonucleótido se suministra al tracto respiratorio o el pulmón, preferiblemente a través de las vías aéreas, en una formulación seca o en un aerosol, preferiblemente usando un nebulizador, y preferiblemente el oligonucleótido se suministra junto con un mediador de transfección y/o un medicamento para la fibrosis quística (CF) conocidos para alguien versado en la materia, preferiblemente una ADNasa, manitol (preferiblemente Bronchitol) y/o una molécula pequeña para el tratamiento de CF, preferiblemente Kalydeco (ivacaftor; VX-770), VX-809 (Lumacaftor) y/o VX-661; de manera que, por ejemplo, el oligonucleótido se suministra en una composición de solución salina hipertónica, preferiblemente con una concentración de 2% - 9% de solución salina, preferiblemente 3% - 8% de solución salina, más preferiblemente 4% - 8% de solución salina, más preferiblemente 5% - 8% de solución salina, más preferiblemente 6% - 8% de solución salina, más preferiblemente 6% - 7% de solución salina, e incluso más preferiblemente alrededor de 7% de solución salina, de manera que la solución salina hipertónica es preferiblemente

una solución fisiológica y farmacéuticamente aceptable (de manera que, por ejemplo, la solución salina hipertónica es, básicamente, una solución de NaCl).

5 **11.** Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, de manera que el oligonucleótido se suministra en una partícula que penetra en la mucosa, preferiblemente una nanopartícula que penetra en la mucosa.

10 **12.** Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, de manera que (i) la administración del oligonucleótido se combina con un tratamiento antibiótico para reducir las infecciones bacterianas y sus síntomas, como el aumento del grosor de la mucosidad y/o la formación de biopelículas; y/o (ii) de manera que se aplica un lavado broncoalveolar (BAL) antes de la administración del oligonucleótido conforme a la invención.

15 **13.** Un oligonucleótido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que el oligonucleótido se administra en una cápsula de liberación prolongada para facilitar la liberación en células del intestino; y de manera que, opcionalmente, la administración del oligonucleótido se combina con la administración de composiciones de enzimas pancreáticas de origen biológico o sintético, como pancrelipasa o Creon.

20 **14.** Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido para usarse tal y como se ha explicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, un portador farmacéuticamente aceptable y/o una solución salina hipertónica fisiológica y farmacéuticamente aceptable, preferiblemente con una concentración de 2% - 9% de solución salina, preferiblemente 3% - 8% de solución salina, más preferiblemente 4% - 8% de solución salina, más preferiblemente 5% - 8% de solución salina, más preferiblemente 6% - 8% de solución salina, más preferiblemente 6% - 7% de solución salina, e incluso más preferiblemente alrededor de 7% de solución salina; de manera que, por ejemplo, la solución salina hipertónica es, básicamente, una solución de NaCl.

25 **15.** Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende además un mediador de transfección.

30 **16.** Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14 ó 15, que comprende además un medicamento para la fibrosis quística (CF), preferiblemente una ADNasa, manitol y/o una molécula pequeña para el tratamiento de CF, preferiblemente Kalydeco (ivacaftor; VX-770), VX-809 (Lumacaftor) y/o VX-661.

17. Un oligorribonucleótido monocatenario o una composición farmacéutica que comprende:

35 (a) un oligorribonucleótido monocatenario que es complementario a una secuencia que tiene al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ó 99% de identidad de secuencia con los nucleótidos 16-30 y 34-48 de la SEQ ID NO: 6, de manera que todos los nucleósidos del oligorribonucleótido son 2'-O alquil ribosa ribonucleósidos; o

40 (b) un oligorribonucleótido monocatenario que comprende los nucleótidos 7-29, preferiblemente los nucleótidos 1-33, de la SEQ ID NO: 1 o de la SEQ ID NO: 3, preferiblemente de la SEQ ID NO: 1, de manera que todos los nucleósidos del oligorribonucleótido son 2'-O alquil ribosa ribonucleósidos.

40

45

50

55


60

Fig. 1

SEQ / D NO:5 WT UAUGCCUGGCACCAUUAAGAAAAUAUCAUCUUUGGUGUUUCCUAUGAUGAAUAUAGAUACAG
SEQ / D NO:6 Mut UAUGCCUGGCACCAUUAAGAAAAUAUCAUUGGUGUUUCCUAUGAUGAAUAUAGAUACAG

Fig. 2

SEQ / D NO:7 Mut UAUGCCUGGCACCAUUAAGAAAAUAUCAU UGGUGUUUCCUAUGAUGAAUAUAGAUACAG SEQ / D NO:8
SEQ / D NO:1 UUUUUUUUAUAGUAGAAAAACCACAAAGGAUACUA



SEQ / D NO:9 RS UAUGCCUGGCACCAUUAAGAAAAUAUCAUUGGUGUUUCCUAUGAUGAAUAUAGAUACAG

Fig. 3

SEQ ID NO:10	WT	augccuggcacc <u>uu</u> aaagaaaaaucaucuuuugguuguuuccuauugaauaauagauac
SEQ ID NO:11		M P G T I K E N I I F G V S Y D E Y R Y
SEQ ID NO:12	Mut	augccuggcacc <u>uu</u> aaagaaaaaucaucuuuugguuguuuccuauugaauaauagauac
SEQ ID NO:13		M P G T I K E N I I G V S Y D E Y R Y
SEQ ID NO:14	RS	augccuggcacc <u>uu</u> aaagaaaaaucaucuuuugguuguuuccuauugaauaauagauac
SEQ ID NO:15		M P G T I K E N I I F G V S Y D E Y R Y

Fig. 4

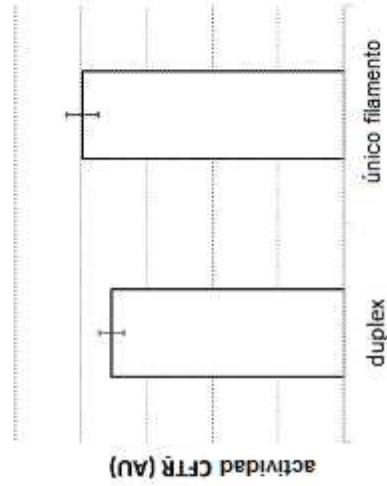


Fig. 5

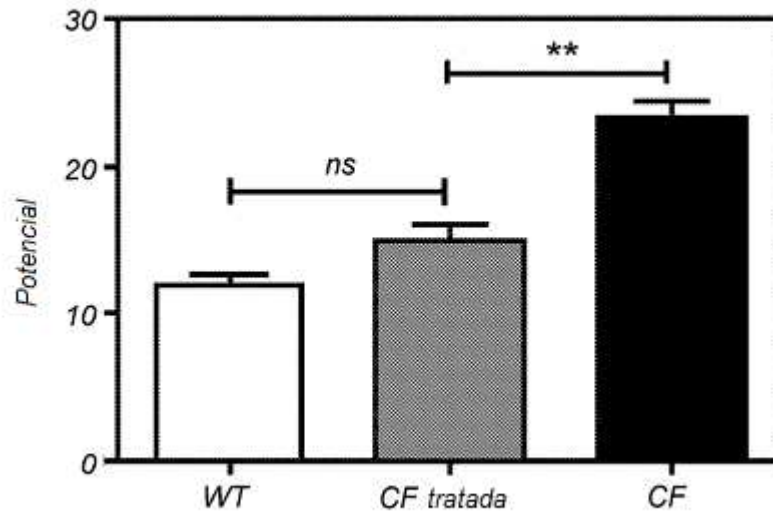


Fig. 6

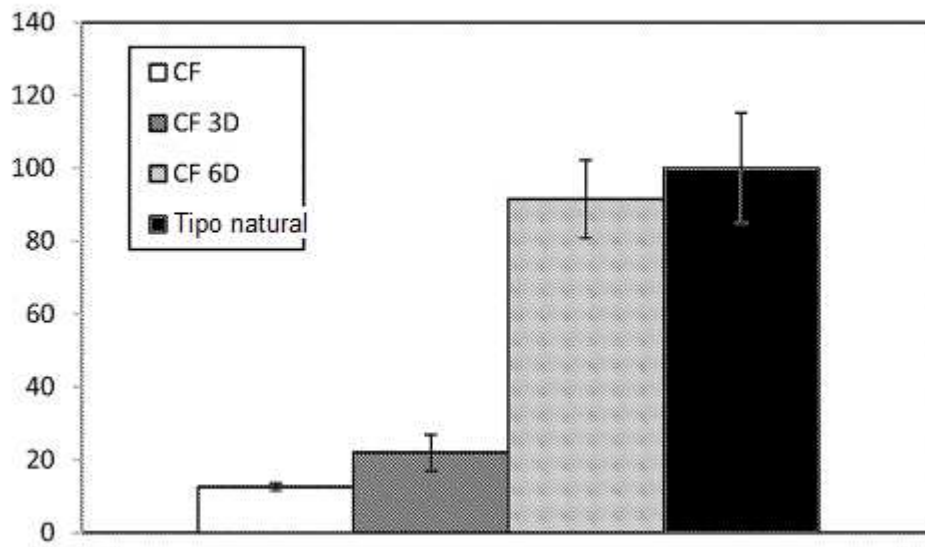


Fig 7a

5'-AUCAUAGGAAACACCAAGUGACAUUUUCUUU-3' oligonucleotide 010g; SEQ ID NO:1

5'-ACCAUUAAGAAAAUAUCAUUGGUGUUCCUAUGAUGAAU-3' Part of ΔF508 RNA; SEQ ID NO:25
 T I K E N I I G V S Y D E Y Part of polypeptide(PP); SEQ ID NO:26

↓

3'-UUUCUUUUAUGUAGAAACCACAAAGGAUACUA-5' oligonucleotide 010g; SEQ ID NO:1

5'-ACCAUUAAGAAAAUAUCAUCUUUGGUGUUCCUAUGAUGAAU-3' Part of WT RNA; SEQ ID NO:27
 T I K E N I I F G V S Y D E Y Part of WT PP; SEQ ID NO:28

508

Fig 7b

5'-AUCAUAGGAAACACCAAGUGAUUUUCUUU-3' oligonucleotide dF-ins2; SEQ ID NO:16

5'-ACCAUUAAGAAAAUAUCAUUGGUGUUCCUAUGAUGAAU-3' Part of ΔF508 RNA; SEQ ID NO:25
 T I K E N I I G V S Y D E Y Part of PP; SEQ ID NO:26

↓

3'-UUUCUUUUAUGUAGAAACCACAAAGGAUACUA-5' oligonucleotide dF-ins2; SEQ ID NO:16

5'-ACCAUUAAGAAAAUAUCAUCUUGGUGUUCCUAUGAUGAAU-3' Insertion of CU; SEQ ID NO:29
 T I K E N I I L V F P M M N I Frameshift in PP; SEQ ID NO:30

508

Fig 7c



Fig 7d

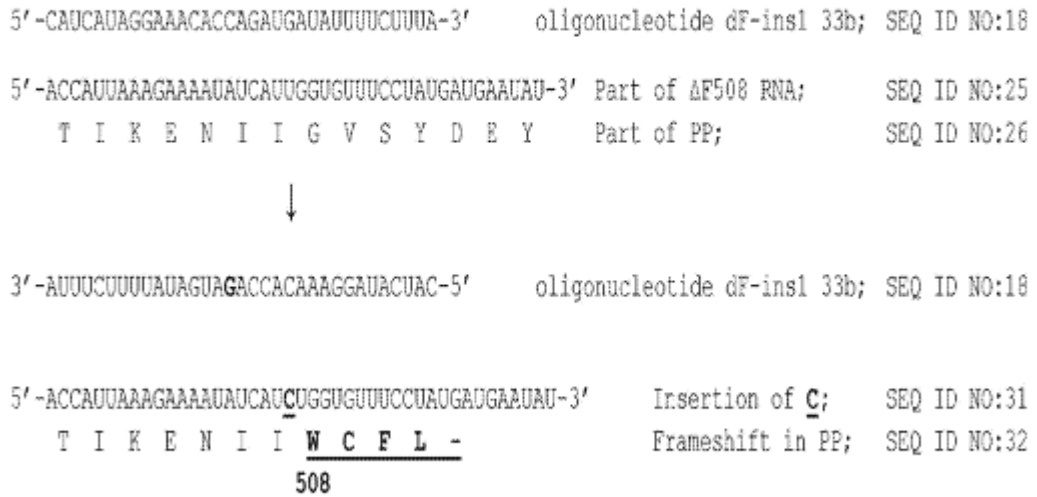


Fig 8a

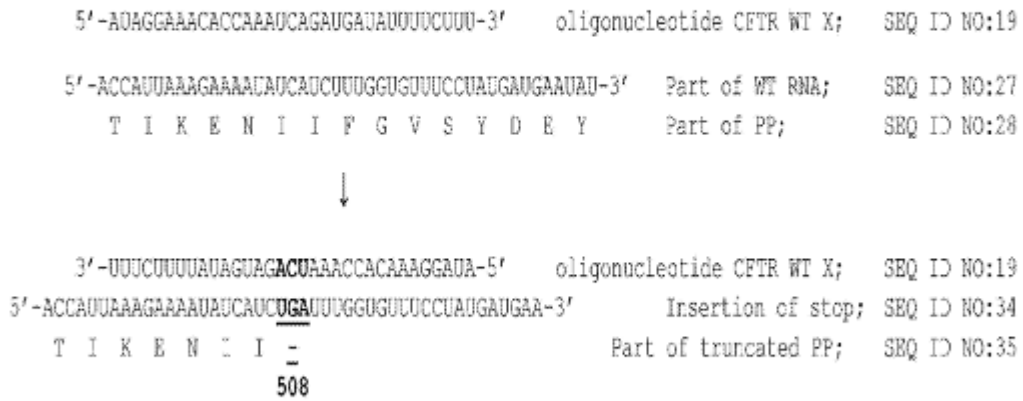


Fig 8b

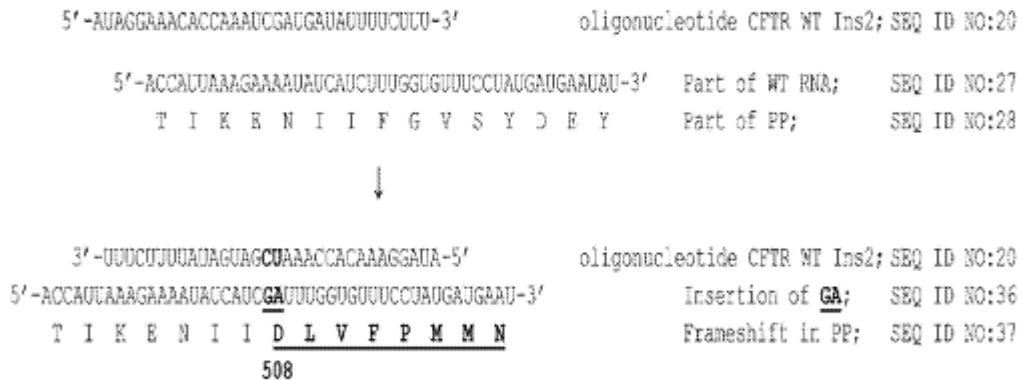


Fig 8c

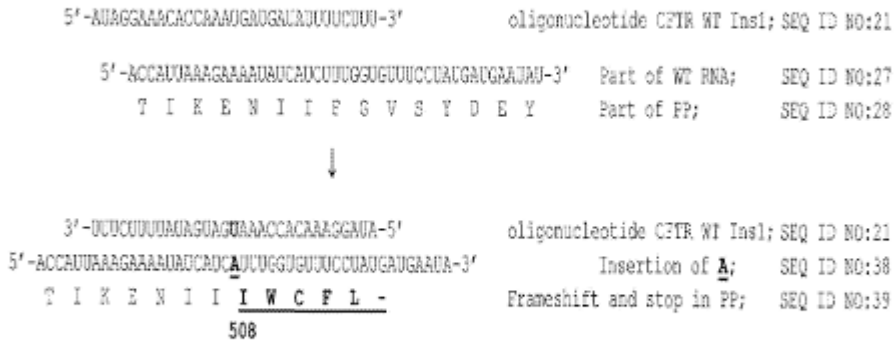


Fig 8d

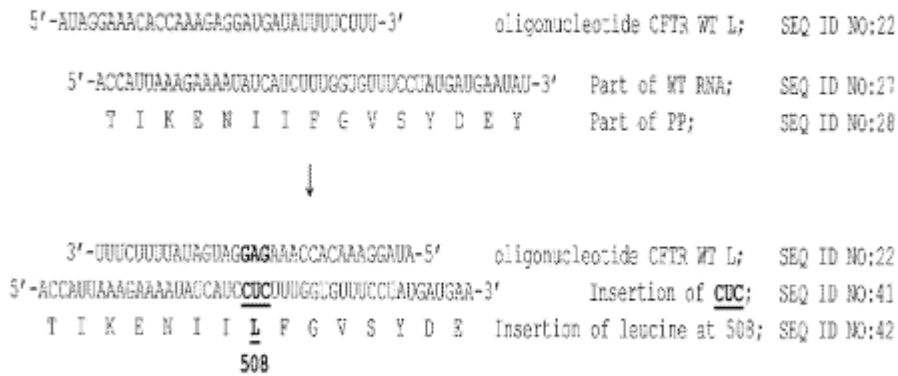


Fig 8e

5'-AGGCAUAAUCCAGGAUCAAAACUGAGAACAGAA-3'	oligonucleotide CFTR WT OX;	SEQ ID NO:23
5'-AUUUCAUUCUGUUCUCAGUUUCCUGGACUAMGCCUGGCACCAUU-3'	Part of WT RNA;	SEQ ID NO:43
I S F C S Q F S W I M P G T I	Part of PP;	SEQ ID NO:44
↓		
3'-AAGACAAGAGUCAAA <u>ACU</u> AGGACCUA <u>AAU</u> ACGGA-5'	oligonucleotide CFTR WT OX;	SEQ ID NO:23
5'-AUUUCAUUCUGUUCUCAGUUU <u>UGA</u> UCCUGGAUUAGGCCUGGCACC-3'	Insertion of stop;	SEQ ID NO:45
I S F C S Q F <u>-</u>	Part of truncated PP;	SEQ ID NO:46
495		

Fig 8f

5'-AUGGUGCCAGGCAUAAGGAUCCAGGAAACUGA-3'	oligonucleotide CFTR WT OL;	SEQ ID NO:24
5'-UUCUGUUCUCAGUUUCCUGGACUAMGCCUGGCACCAUUAAGAAAAU-3'	Part of WT RNA;	SEQ ID NO:47
F C S Q F S W I M P G T I K E E	Part of PP;	SEQ ID NO:48
↓		
3'-AGUCAARAGSACCU <u>AGGA</u> AUACGGACCGUGUA-5'	oligonucleotide CFTR WT OL;	SEQ ID NO:24
5'-UUCUGUUCUCAGUUUCCUGGACU <u>CCU</u> UAGGCCUGGCACCAUUAAGAA-3'	Insertion of <u>CCU</u> ;	SEQ ID NO:49
F C S Q F S W I <u>L</u> M P G T I K E	Insertion of leucine at 498;	SEQ ID NO:50
498		

Fig. 9a

5'-AUAUAUCGCGAUAGAGCGGUCCUUGUUAUC-3'	oligonucleotide CFTR-R117;	SEQ ID NO: 51
5'-GACCCGGAUAAACAAGGAGGAAACA <u>C</u> UCUCUAUCGGGAUUUAUCUAGGC-3'	Part of 117H RNA;	SEQ ID NO: 52
D P D N K E E <u>H</u> S I A I Y L G	Part of polypeptide(PP);	SEQ ID NO: 53
	↓	
3'-CUAUUGUCCUCCUUGCGAGAUAGCGCUAAAUA-5'	oligonucleotide CFTR-R117;	SEQ ID NO: 51
5'-GACCCGGAUAAACAAGGAGGAAAC <u>G</u> CUCUCUAUCGGGAUUUAUCUAGGC-3'	Part of WT RNA;	SEQ ID NO: 54
D P D N K E E <u>R</u> S I A I Y L G	Part of WT PP;	SEQ ID NO: 55

117

Fig. 9b

5'-GUGAUCCACCUUCUCCCAAGACUAUAUUGUCU-3	oligonucleotide CFTR-G542;	SEQ ID NO:56
5'-GAGAAAGACAAUAUAGUUCUU <u>U</u> GAGAGAGGUGGAUACACACUGAGU-3'	Part of 542X RNA;	SEQ ID NO:57
E K D N I V L =	Part of truncated PP;	SEQ ID NO:58
↓		
3'-UCUGUUAUAUCAAGAA <u>C</u> CUCUCCACCUUAGUG-5'	oligonucleotide CFTR-G542;	SEQ ID NO:56
5'-GAGAAAGACAAUAUAGUUCUU <u>U</u> GAGAGAGGUGGAUACACACUGAGU-3'	Part of WT RNA;	SEQ ID NO:59
E K D N I V L G E G G I T L S	Part of WT PP;	SEQ ID NO:60
542		

Fig. 9c

5'-CUCCAAAGGCUUCCUCCACUGUUGCAAAGUUA-3'	oligonucleotide CFTR-W1282;	SEQ ID NO: 61
5'-GAUUCAAUAACUUUGCAACACGUGA <u>A</u> GGAAGCCUUUGGAGUGAUA-3'	Part of 1282X RNA;	SEQ ID NO: 62
D S I T L Q Q -	Part of truncated PP;	SEQ ID NO: 63
	↓	
3'-AUUGAAACGUUGUCAC <u>C</u> UCCUUUCGGAACCUC-5'	oligonucleotide CFTR-W1282;	SEQ ID NO: 61
5'-GAUUCAAUAACUUUGCAACACAGUGG <u>A</u> GGAAGCCUUUGGAGUGAUA-3'	Part of WT RNA;	SEQ ID NO: 64
D S I T L Q Q <u>W</u> R K A F G V I	Part of WT PP;	SEQ ID NO: 65
	1282	

Fig. 9d

5'-GUUCAAGGGAUCCAAGUUUUUUCUAAAUGUUC-3'	oligonucleotide CFTR-N1303;	SEQ ID NO: 66
5'-UUUCUGGAACAUUUAGAAAAAAG <u>GUUGGAUCCCUAUGAACAGUGG</u> -3'	Part of 1303K RNA;	SEQ ID NO: 67
F S G T F R K <u>K</u> L D P Y E Q W	Part of 1303K PP;	SEQ ID NO: 68
	↓	
3'-CUUGUAAAUCUUUUU <u>GAACCUAGGGAUACUUG</u> -5'	oligonucleotide CFTR-N1303;	SEQ ID NO: 66
5'-UUUCUGGAACAUUUAGAAAAA <u>CUUGGAUCCCUAUGAACAGUGG</u> -3'	Part of WT RNA;	SEQ ID NO: 69
F S G T F R K <u>N</u> L D P Y E Q W	Part of WT PP;	SEQ ID NO: 70

1303